

Signaltransduktion des humanen Neuropeptidrezeptors SorLA

-

**γ -Secretase-abhängige Freisetzung der Intrazellulärdomäne des
Transmembranrezeptors SorLA**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

des Fachbereiches Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christopher Böhm

geboren in Lübeck

Hamburg 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. W. HAMPE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. E. MANDELKOW
Tag der Disputation: 17. Juni 2005

Hamburg, den 15. Mai 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

1. Einleitung	1
1.1 Aufbau des Neuropeptidrezeptors SorLA	1
1.2 Einordnung der Strukturmerkmale SorLAs	3
1.3 SorLA in der Signaltransduktion	5
1.4 SorLAs proteolytische Prozessierung	7
1.4.1 Notch	7
1.4.2 APP	9
1.4.3 γ -Secretase	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
1.5.1 Etablierung SorLAs als γ -Secretasesubstrat	13
1.5.2 Aufklärung eines γ -Secretase-abhängigen Signalweges	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Molekularbiologische Techniken	14
2.1.1 Verwendete Vektoren	14
2.1.2 Verdau und Reinigung von DNA	15
2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	15
2.1.4 Auffüllen 5'überhängender Enden und Ligation	15
2.1.5 Transformation von Bakterien	16
2.1.6 Plasmidisolierung	16
2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.1.8 Sequenzspezifische Mutagenese (Site-directed mutagenesis)	17
2.1.9 Sequenzierungen	17
2.1.10 Detaillierte Klonierungen	18
2.1.11 Semiquantitative RT-PCR	20
2.2 Proteintechniken	20
2.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.2.2 Western-Blot	22
2.2.3 Immunpräzipitation	23
2.3 Zellkultur	24

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	Zelllinien	24
2.3.2	Transfektion	25
2.3.3	Stabil transfizierte Zellen	25
2.3.4	Zellyse	26
2.3.5	Konfokalmikroskopie	26
2.4	Experimente zur γ-Secretase	27
2.4.1	Inhibierungsexperimente	27
2.4.2	In vitro- γ -Secretasetest	27
2.5	Lokalisierung des SorICD in der Zelle	28
2.6	Transkriptionsaktivierung	28
2.7	SorICD-Abbau	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Hinweise auf SorLA als neues γ-Secretasesubstrat	30
3.1.1	Einfluss eines γ -Secretase-Inhibitors auf SorLA-Stub	30
3.1.2	Die dominant negative Presenilinmutante D385N und SorLA-Stub	32
3.1.3	SorLA-Stub in Presenilin-Knock-out-Zellen	33
3.2	γ-Secretase-abhängige Freisetzung der Intrazellulärdomäne von SorLA	35
3.2.1	In vitro- γ -Secretaseexperiment mit swAPP-Stub	35
3.2.2	In vitro- γ -Secretaseexperiment mit SorLA-Stub-tags	37
3.3	SorLA unter dem Einfluss von Presenilin	39
3.3.1	SorLA und PS D385N	39
3.3.2	SorLA in Presenilin-knock-out-Zellen	42
3.4	Endogenes SorLA in NT2-Zellen	43
3.5	mRNA-Level nach Behandlung der Zellen mit DAPT	45
3.6	Detektion des Aβ-Äquivalents von SorLA (Sorβ)	46
3.7	Lokalisierung des SorICD	48

3.8 Proteolytischer Abbau des SorICD	52
3.9 Transkriptionsaktivierung durch SorICD	54
4. Diskussion	57
4.1 Etablierung SorLAs als γ -Secretasesubstrat	57
4.2 Aufklärung eines γ -Secretase-abhängigen Signalweges	61
4.3 Modell einer RIP-abhängigen Signalkaskade für SorLA	64
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	67
7. Anhang	74
7.1 Tabellen und Abbildungen	74
7.2 Vektorkarten	75
7.3 SorLAs C-Terminus in der Übersicht	77
7.4 Abkürzungsverzeichnis	78
7.5 Publikationen und Kongressbeiträge	79
7.6 Lebenslauf	80

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Aufbau des Neuropeptidrezeptors SorLA

SorLA (sorting-receptor related protein containing low-density lipoprotein receptor (LDLR) class A repeats), auch LR11 (LDLR relative with 11 binding repeats) genannt, gehört zur Gruppe der Typ-I-Transmembranrezeptoren und wurde erstmals 1996 beschrieben (Jacobsen et al., 1996).

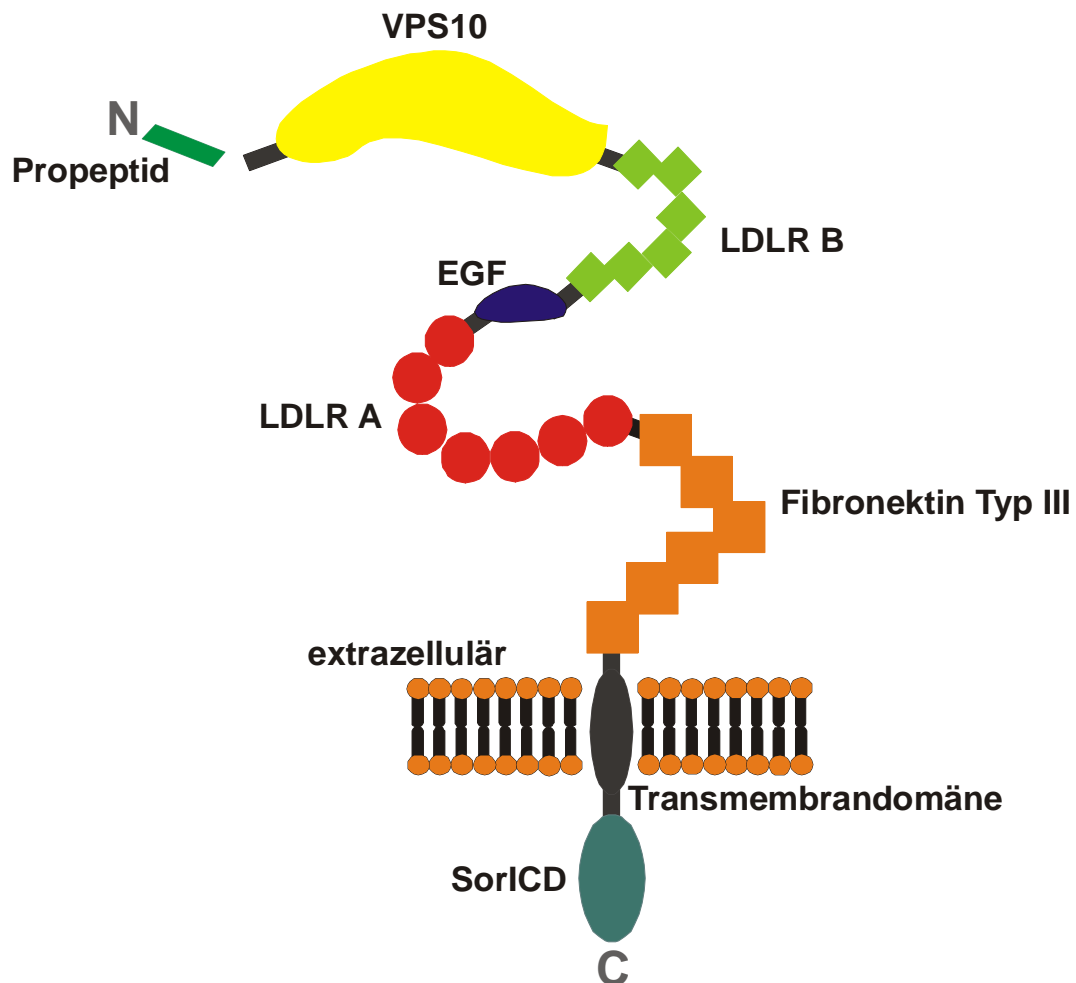


Abb. 1-1. Domänenstruktur von SorLA

SorLA wird als Proprotein gebildet. Das Propeptid kann durch die Protease Furin abgespalten werden.

VPS10 – vacuolar protein sorting protein 10 - Domäne; LDLRA/LDLRB – low-density lipoprotein receptor class A/B – Wiederholungen; EGF – epidermal growth factor like; SorICD – Intrazellulärdomäne SorLAs.

Der Rezeptor wird in einer Vielzahl von Geweben im menschlichen Organismus exprimiert, aber in größter Menge in Zellen des Zentralen Nervensystems.

1. Einleitung

SorLA ist ein Ortholog zum **head activator binding protein (HAB)**. HAB wurde über seine Affinität zum Neuropeptid **head activator (HA)** aus dem Süßwasserpolyphen *Hydra* isoliert. Unter Einfluss von HA können dekapitierte Polypen eine neue Kopfstruktur ausbilden und es wird vermutet, dass SorLA als Rezeptor bzw. Korezeptor das HA-Signal vermitteln kann (Hampe et al., 1999). SorLA wird als Proprotein am endoplasmatischen Retikulum gebildet. Im Golgi-Apparat wird das Propeptid (Abb. 1-1) durch die Protease Furin abgespalten (Hampe et al., 2000). Das reife SorLA (im Weiteren auch SorLA-Volllänge genannt) trägt in seinem N-terminalen Bereich eine Domäne mit Homologie zum Hefeprotein VPS10p (**vacuolar protein sorting 10 protein**), das in Hefe an der Proteinsortierungs-Maschinerie der Zelle beteiligt ist (Marcusson et al., 1994). Auf die VPS10-Domäne folgend findet man Elemente, die auch Mitglieder der **low density lipoprotein-receptor (LDLR)**-Familie aufweisen. Zu diesen Elementen gehören sowohl sechs LDLRB (**low-density lipoprotein receptor class B**) als auch 11 LDLRA genannte Sequenzwiederholungen. Die LDLRA-Motive sind Cystein-reich und übernehmen in anderen Rezeptoren der LDLR-Genfamilie die Ligandenbindung (Davis et al., 1987; Krieger and Herz, 1994). LDLRB, die ein YWTD-Motiv enthalten, hat, so wird vermutet, eine regulative Funktion als Säuresensor, der in Lysosomen für die Freisetzung gebundener Lipoproteine sorgt (Davis *et al.*, 1987). Zwischen diesen Domänen wurde noch ein Motiv mit Ähnlichkeit zum **epidermal growth factor (EGF)**, das ebenfalls in der LDLR-Familie auftritt, identifiziert. Nahe der Membran weist SorLA sechs Fibronectin-Typ-III-Domänen auf. Diese sind weit verbreitet unter Neurorezeptoren, so zum Beispiel im neuronalen Adhäsionsmolekül N-CAM (Brummendorf and Rathjen, 1993). Die Funktion wurde bisher nur ungenügend charakterisiert, aber man vermutet eine unterstützende Aufgabe bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten durch erhöhte Flexibilität des Rezeptors.

Im Anschluss an den Transmembranbereich findet man die mit 56 Aminosäurenresten relativ kurze Intrazellulärdomäne SorLAs. Typische Mitglieder der LDLR-Familie besitzen ein NPXY-Motiv (Lehrman et al., 1985), dieses fehlt aber in SorLA. Das NPXY-Motiv gilt als Internalisierungssignal, hat aber mittlerweile Bedeutung für Signalkaskaden gewonnen, da NPXY-Motive von Proteinen mit einer **Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB)** erkannt werden können (Trommsdorff et al., 1998; Howell et al., 1999). PTB-tragende Proteine sind vielfältig und Bestandteil diverser Signaltransduktionswege. Statt eines NPXY-Motivs besitzt SorLAs Intrazellulärdomäne mit FANSHY ein wahrscheinlich funktionsähnliches Tyrosin-haltiges Motiv (Jacobsen *et al.*, 1996), das in Analogie relevant sein kann für eine Rolle SorLAs in

1. Einleitung

endozytotischen Internalisierungs- und Sortierungsprozessen. Zusätzlich könnte es SorLA als mögliche Phosphorylierungs- und Bindestelle für Adaptorproteine auch das Potential zur Signalweiterleitung geben.

1.2 Einordnung der Strukturmerkmale SorLAs

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der LDLR-Familie besitzt SorLA eine VPS10-Domäne. Eine Reihe weiterer Proteine mit VPS10-Domäne sind in höheren Organismen entdeckt worden (Abb. 1-2).

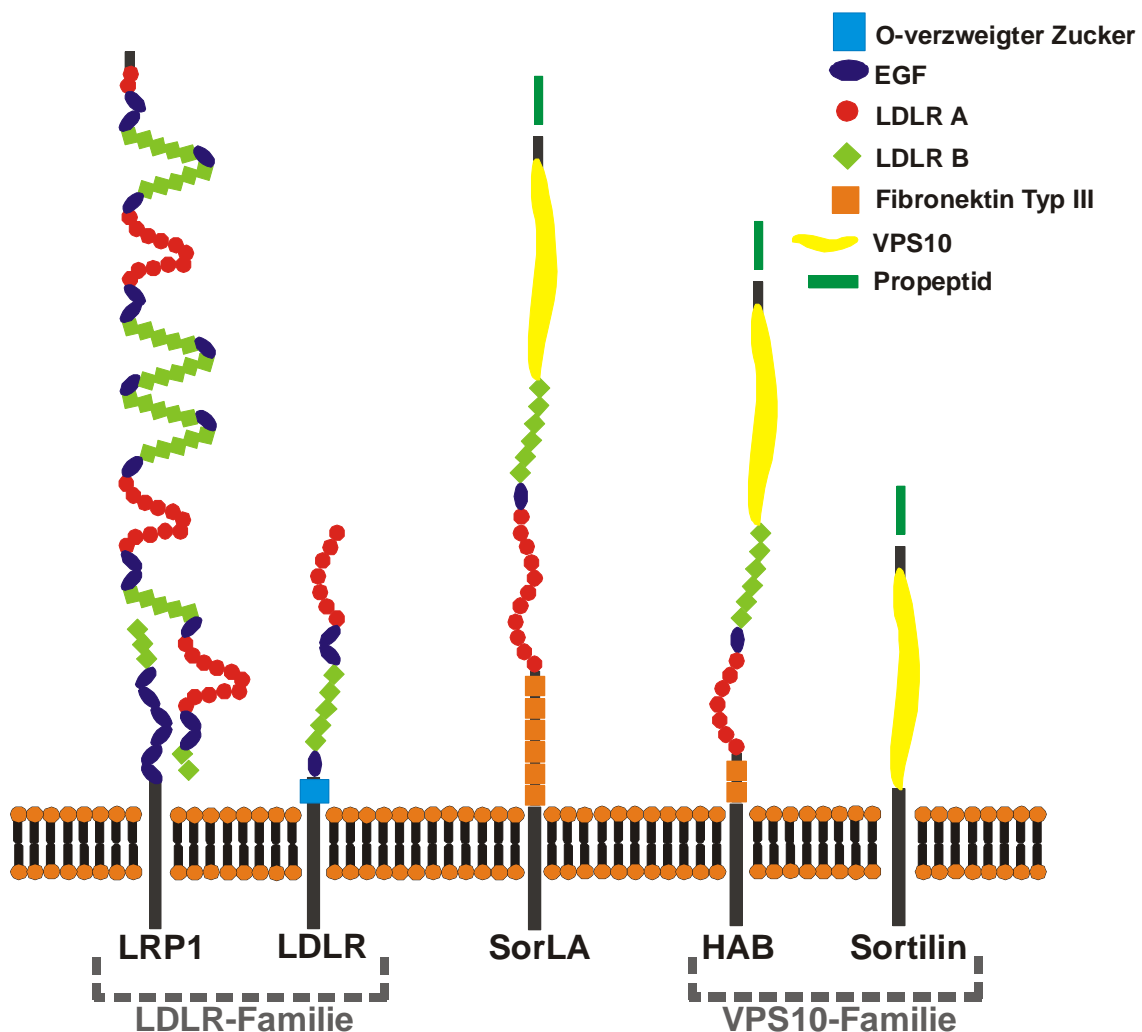


Abb. 1-2. Verwandte von SorLA

SorLA kann anhand der Domänenverteilung zwei Proteinfamilien zugeordnet werden. Auf der linken Seite finden sich zwei der bekanntesten Vertreter der LDLR-Familie, namentlich der LDL-Rezeptor und LRP1. Auf der rechten Seite sind zwei Mitglieder der kleinen Familie der VPS10-tragenden Proteine abgebildet: Das SorLA-Ortholog aus *Hydra* HAB und der Neuropeptidrezeptor Sortilin. LRP1 – LDLR related Protein 1; HAB - head activator binding protein; weitere Abkürzungen siehe Abb. 1-1

1. Einleitung

Am besten charakterisiert ist das Sortilin, das das Neuropeptid Neurotensin bindet, und daher auch als Neurotensin-Rezeptor 3 bezeichnet wird (Mazella et al., 1998). Sortilin ist einer der besser charakterisierten Vertreter der VPS10-Familie, da sowohl die Neurotensin-Bindung, als auch die mögliche Beteiligung an endozytotischen Vorgängen durch Protein-Protein-Interaktionsstudien überzeugend dargelegt wurde (Petersen et al., 1997; Petersen et al., 1999). Neurotensin ist an zahlreichen Prozessen wie der Dopamin-Umsetzung und Hypothermie im Zentralen Nervensystem beteiligt (Rostene and Alexander, 1997). Die Neurotensin-Effekte werden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Sortilin kann aber indirekt durch Bindung des Neuropeptids an dessen Internalisierung und Umsetzung beteiligt sein (Martin et al., 2002). Kürzlich wurde Sortilin als Korezeptor zum proNGF (nerve growth factor) bindenden Rezeptor p75^{NTR} beschrieben. Über p75^{NTR} wird von proNGF ein Signal zur Apoptose in die betroffene Zelle weitergeleitet, aber nur in Anwesenheit von Sortilin, das somit dem Prozess Spezifität verleiht (Nykjaer et al., 2004).

Die drei Proteine SorCS1-3 sind die bisher jüngsten Mitglieder der VPS10-Familie. Sie sind zuerst in der Maus entdeckt worden und funktionell am schlechtesten beschrieben (Hermeijer et al., 1998). Ebenso wie Sortilin und SorLA können sie vielleicht über die VPS10-Domäne Neuropeptide binden, aber eindeutige Erkenntnisse stehen noch aus.

Ein Großteil von SorLAs Außendomäne wird dominiert von LDLRA- und LDLRB-Wiederholungen. Diese Sequenzelemente sind typisch für Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie. Neben dem Namensgeber dem LDL-Rezeptor, sind zahlreiche weitere Rezeptoren wie die LDLR related proteins (LRP) oder Megalin Mitglieder dieser Familie. Diese Membranrezeptoren zählen zu den wichtigsten Protagonisten im Lipoproteintransport und Fettstoffwechsel. So sorgt LDLR für die Aufnahme Cholesterin-reicher LDL-Partikel in die Leber. Dies geschieht über Bindung der Lipoproteine ApoE und ApoB100 und anschließende rezeptorvermittelte Endozytose (Esser et al., 1988). Eine gestörte Expression des LDL-Rezeptors führt zu Hypercholesterinämie und massiver Arteriosklerose (Brown and Goldstein, 1985).

In jüngster Zeit häufen sich die Hinweise, dass die LDLR-Familie nicht nur reine Transportfunktionen erfüllt, sondern auch beteiligt ist an Signaltransduktionsvorgängen. LRP5 und 6 wirken zum Beispiel als Korezeptoren im Wnt-Signalweg. Hier müssen sowohl der Rezeptor Frizzled als auch einer der Korezeptoren LRP 5/6 die sekretierten Wnt-Glycoproteine binden, um Signalaufnahme und davon abhängige Entwicklungsvorgänge zu

1. Einleitung

gewährleisten (Herz and Bock, 2002). VLDLR und ApoER2, ebenso Mitglieder der LDLR-Familie, sind in die Reelin-Signalkaskade involviert (Hiesberger et al., 1999). Hier wird vermutet, dass Reelin an VLDLR oder ApoER2 bindet und im Anschluss das NPXY-bindende Protein Disabled-1 phosphoryliert wird. Disabled-1 ist Teil einer zentralen Signalkaskade für die Hirnentwicklung (Rice et al., 1998).

1.3 SorLA in der Signaltransduktion

Die mögliche Beteiligung SorLAs am Lipoproteinstoffwechsel zumindest in isolierten Geweben wurde bereits gezeigt. So entdeckte die Gruppe um Saito SorLAs Fähigkeit zur Internalisierung ApoE-reicher Lipoproteine wie β -VLDL an glatten Muskelzellen (Taira et al., 2001). In Tiermodellen zur Arteriosklerose wurde eine erhöhte Expression SorLAs in eben diesen Zellen der glatten Intimamuskulatur der Blutgefäße festgestellt (Kanaki et al., 1999).

In Gegenwart des **platelet derived growth factor – BB** (PDGF-BB) ist SorLA in der Lage, die Migration glatter Muskelzellen zu stimulieren (Gliemann et al., 2004). Als Teil dieses Vorganges wird eine erhöhte Expression des **urokinase-type plasminogen activator-Rezeptors** (uPAR) beobachtet. SorLA bindet sowohl uPA, PAI (**Plasminogen activator inhibitor**) als auch PDGF-BB ähnlich wie der Rezeptor LRP. Im Gegensatz zu LRP internalisiert SorLA diese Faktoren nur sehr langsam, und es wird postuliert, dass dieser Effekt der indirekten Inhibition der LRP-abhängigen PDGF-BB-Signalkaskade dient (Gliemann *et al.*, 2004).

Wie bereits erwähnt, wurde SorLA entdeckt als humanes Homolog zum head activator (HA) –Rezeptor HAB. Das humane Neuropeptid HA konnte sequenzidentisch zum Hydra-HA isoliert werden. Bisher konnte kein Gen für head activator in höheren Organismen gefunden werden, damit ist eine physiologische Funktion recht unwahrscheinlich geworden. Nichtsdestotrotz reagieren SorLA-exprimierende Zellen in Kultur spezifisch auf einen Stimulus mit HA. SorLA ist, typisch für einen Lipoproteinrezeptor, größtenteils lokalisiert in internen Zellkompartimenten. So lassen sich abhängig vom untersuchten Zelltyp nur ca. 10% des Gesamt-SorLAs einer Zelle an der Zelloberfläche nachweisen. Der größte Teil des restlichen SorLAs findet sich im Golgi-Apparat wieder (Jacobsen et al., 2001). Durch Gabe von HA kann die Translokation eines Teils des internen SorLA-Pools an die Zelloberfläche

1. Einleitung

beobachtet werden (Hampe *et al.*, 2000). HA stimuliert ebenfalls das „Shedding“ der Außendomäne von SorLA. In diesem Prozess wird durch die Metalloprotease TACE (Tumor necrosis factor α converting enzyme) der Hauptteil von SorLAs Außendomäne nahe der Zellmembran abgeschnitten (Hampe *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2002). Die Außendomäne kann dann im Zellkulturmedium als löslicher Rezeptor nachgewiesen werden.

Weiterhin erhöht HA in bestimmten Zelltypen die Mitose- und Proliferationsrate. Dieser Effekt kann durch gleichzeitige Inkubation mit dem SorLA-Propeptid inhibiert werden, was darauf schließen lässt, dass die Mitosestimulierung direkt von SorLA abhängig ist (Lintzel *et al.*, 2002).

Im Zusammenhang mit HA wurde gezeigt, dass das im Prozess der Reifung abgespaltene Propeptid als Inhibitor fungieren kann. So bindet das Propeptid an die VPS10-Domäne und verhindert die HA-Bindung (Lintzel *et al.*, 2002).

RAP (**R**eceptor **a**ssociated **p**rotein) als weiterer Ligand SorLAs bindet, wie auch für andere LDLR-Familienmitglieder gezeigt, an die LDLRA-Wiederholungen und verhindert die Interaktion mit Lipoproteinen (Jacobsen *et al.*, 1996). Zusätzlich kann RAP auch noch an SorLAs VPS10-Domäne mit geringer Affinität binden (Lintzel *et al.*, 2002). RAP wird üblicherweise die Rolle eines Chaperons für LDLR zugesprochen. Die Bindung des im endoplasmatischen Retikulum vorhandenen Proteins RAP an SorLA erleichtert vielleicht auch hier die Faltung in die native Struktur.

Trotz der zahlreichen Liganden SorLAs, unter anderem HA, uPA, PAI, PDGF-BB, RAP und β -VLDL, ist der intrazelluläre Signalverlauf nur schlecht beschrieben. Die Mitosestimulierung durch HA wird über eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade vermittelt, da Pertussistoxin, ein Inhibitor trimerer G-Proteine, die Stimulierung unterbindet (Boels *et al.*, 2001). Auch Signalwege über Phosphorylierungsreaktionen und weitere Adaptorproteine, wie man sie für andere Mitglieder der LDLR-Familie findet, sind denkbar (Schneider and Nimpf, 2003).

1. Einleitung

1.4 SorLAs proteolytische Prozessierung

Wie Eingangs schon erwähnt wird SorLA durch die Protease Furin und die Abspaltung des Peptids aktiviert. Nach erfolgter Aktivierung kann der Rezeptor durch die Metalloprotease TACE geschnitten werden (Hampe *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2002). Diese regulierten proteolytischen Schritte ähneln den Vorgängen in anderen Rezeptoren, bei denen die Aktivität von Proteasen für die Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung ist (Abb. 1-3).

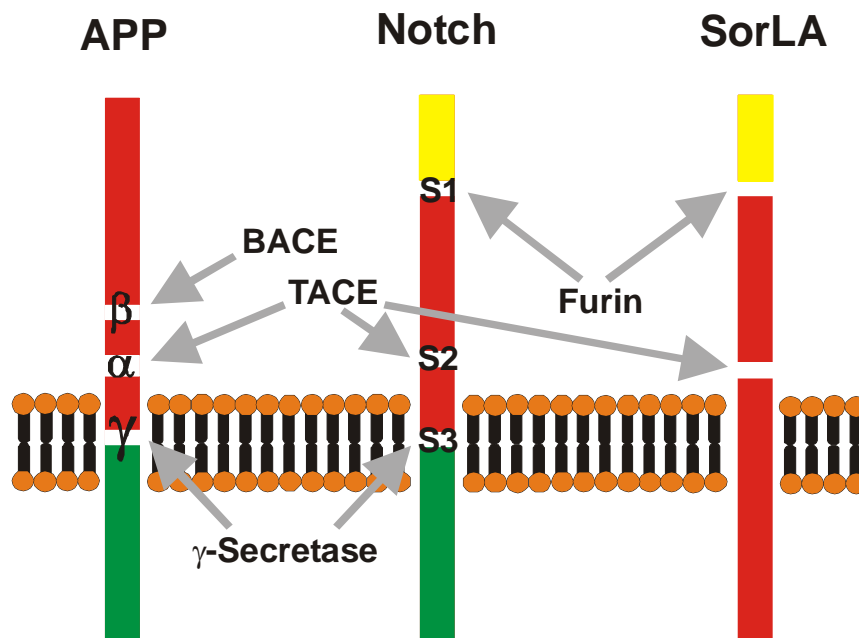


Abb. 1-3. Schematischer Vergleich des proteolytischen Musters von APP, Notch und SorLA

APP – amyloid precursor protein; BACE – β -site APP cleaving enzyme; TACE – tumor necrosis factor α converting enzyme; α , β , γ – proteolytische Schnittstellen im APP; S1-3 – proteolytische Schnittstellen bei Notch

1.4.1 Notch

Notch gehört wie SorLA zu den Typ-I-Membranrezeptoren und wurde erstmals in *Drosophila* beschrieben. In *Drosophila* spielt Notch eine wichtige Rolle bei embryonalen

1. Einleitung

Entwicklungsprozessen, aber auch in höheren Organismen ist Notch sowohl für die Entwicklung des Embryos als auch für Ausbildung und Erhalt des Nervensystems wichtig (De Strooper et al., 1999; Selkoe and Kopan, 2003). Knock-outs des Proteins sind in Mäusen embryonal lethal und unterstreichen die zentrale entwicklungsbiologische Rolle dieses Proteins (Huppert et al., 2000). Notch wird wie SorLA durch eine Furin-ähnliche Aktivität an einer S1 genannten Position innerhalb des Proteins gespalten (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998) (Abb. 1-4). Im Gegensatz zu der Situation in SorLA verbleibt die große Außendomäne von Notch in engem Kontakt zu dem membranständigen Rest (Blaumueller *et al.*, 1997).

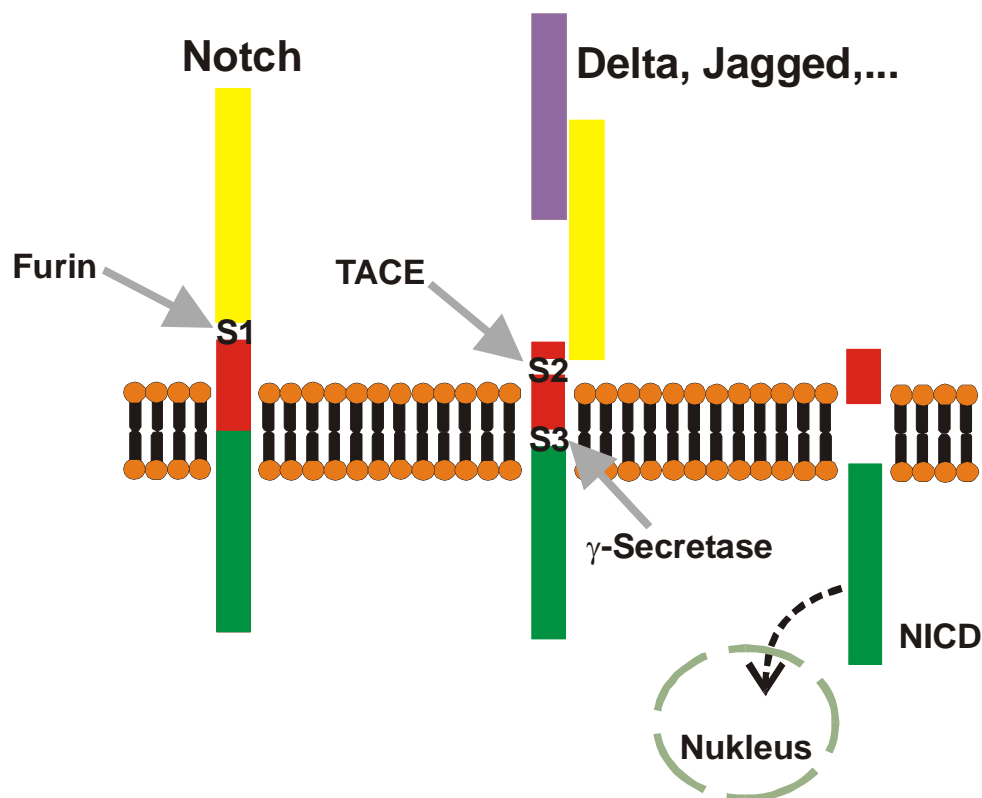


Abb. 1-4. Proteolytische Prozessierung von Notch

TACE - tumor necrosis factor α converting enzyme; NICD – freigesetzte Intrazellulärdomäne von Notch; S1-3 – proteolytische Schnittstellen; Delta, Jagged – Liganden von Notch

1. Einleitung

Liganden von Notch sind Mitglieder der Delta/ Serrate/ Jagged-Familie (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Greenwald, 1998). Diese sind ebenfalls membranständig und aktivieren Notch über direkten Kontakt zwischen zwei Zellen. Nach Bindung eines Liganden wird Notch durch die Protease TACE an Position S2 gespalten (Brou et al., 2000). Der kurze membranständige Rest, der von Notch jetzt übrig ist, ist Substrat für eine dritte Protease. Die dritte Proteolysestelle S3 befindet sich ungewöhnlicherweise innerhalb der Transmembrandomäne von Notch. Die proteolytische Aktivität wird durch die γ -Secretase vermittelt, auf die in Abschnitt 1.4.3 genauer eingegangen wird (De Strooper et al., 1999). Nach erfolgter Spaltung wird die Intrazellulärdomäne von Notch (NICD – **n**otch **i**ntracellular **d**omain) aus der Membran ins Cytoplasma entlassen.

Das NICD trägt ein Kernlokalisierungssignal (NLS – **N**uclear **l**ocalisation **s**ignal) und ist somit in der Lage in den Nukleus der Zelle zu wandern. Die Intrazellulärdomäne kann dort direkt mit Transkriptionsfaktoren der CSL- (**C** promotor binding factor/ **S**upressor of Hairless/ **L**ag-1)-Familie interagieren und die Transkription bestimmter Zielgene regulieren (Selkoe et al., 2003). Wegen der für die Signalkaskade entscheidenden kontrollierten Freisetzung des NICD aus der Membran spricht man auch von **regulierter Intramembranproteolyse (RIP)**.

1.4.2 APP

Das Membranprotein APP (**A**myloid **p**recursor **p**rotein) ist weniger durch seine physiologische Funktion, als durch seine pathologischen Effekte in der **Alzheimerschen Demenz (AD)** bekannt geworden. APP wird als Rezeptor beschrieben, aber bis auf die mehr oder weniger gut charakterisierte Interaktion mit F-Spondin ist bisher kein weiterer überzeugender Ligand des APPs entdeckt worden (Ho and Sudhof, 2004).

Pathologisch ist APP interessant aufgrund der proteolytischen Fragmente, die APP-exprimierende Zellen ins Gehirn abgeben. APP wird ähnlich komplex wie Notch und SorLA prozessiert. Die Außendomäne kann alternativ durch zwei Aktivitäten, die α - und β -Secretase, gespalten werden (Abb. 1-5).

1. Einleitung

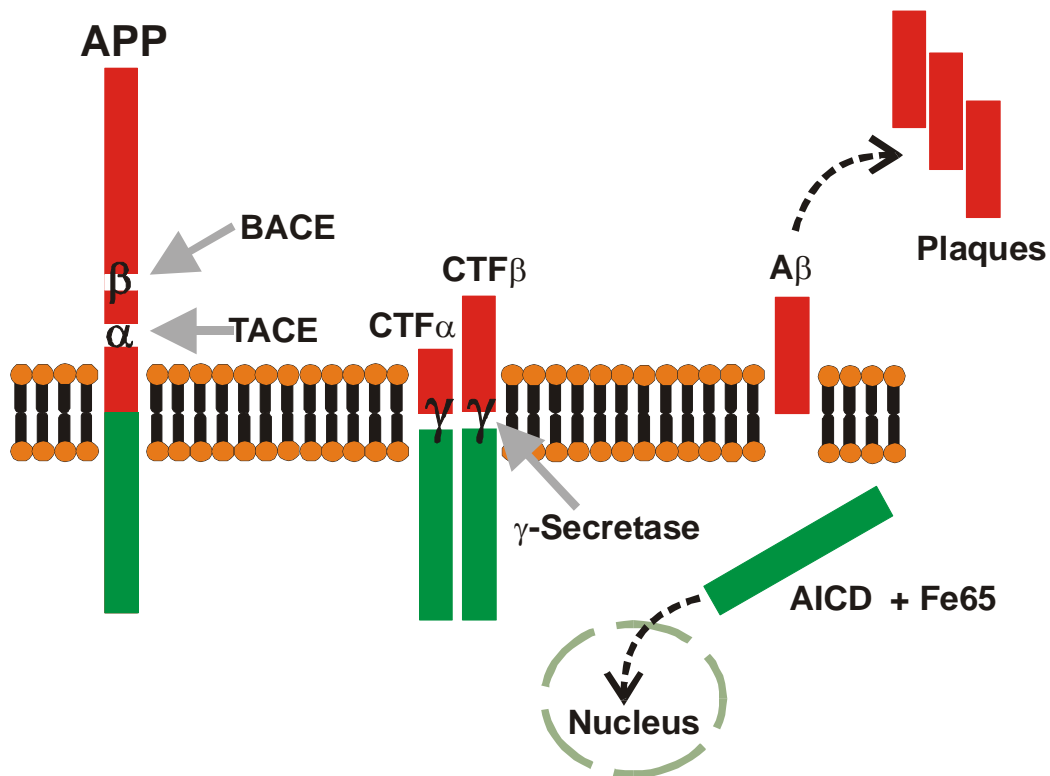


Abb. 1-5. Proteolytische Prozessierung von APP

APP – amyloid precursor protein; BACE – β -site APP cleaving enzyme; TACE – tumor necrosis factor α converting enzyme; α , β , γ – proteolytische Schnittstellen; $A\beta$ – β -Amyloid-Fragment; AICD – freigesetzte Intrazellulärdomäne des APP; $CTF\alpha/\beta$ - C-Terminales α/β -Fragment; Fe65 – AICD bindendes Protein

Die β -Secretase-Aktivität scheint sich auf das Enzym BACE (β -site APP cleaving enzyme) zu konzentrieren (Roberds et al., 2001), die α -Secretase-Aktivität kann dagegen durch eine Reihe von Proteasen, wie zum Beispiel TACE, gestellt werden (Sisodia and George-Hyslop, 2002).

Nach Spaltung an der α - bzw. β -Position des APP verbleiben in der Membran die mit 83 bzw. 99 Aminosäuren unterschiedlich langen C-terminalen Fragmente ($CTF\alpha$ und $CTF\beta$; auch C83 und C99 genannt). Diese wiederum können wie Notch durch die γ -Secretase innerhalb der Transmembrandomäne geschnitten werden (Sastre et al., 2001). In das Cytoplasma wird die Intrazellulärdomäne des APPs (AICD) entlassen, während die N-terminalen Reste ($A\beta$ und p3) in die Extrazellulärmatrix abgegeben werden. Der γ -Secretaseschnitt erfolgt aus bisher unbekanntem Gründen nicht exakt und an einer bestimmten Konsensussequenz,

1. Einleitung

sondern weist eine bestimmte Varianz auf. So können A β und p3 in ihrer individuellen Länge variieren (Sisodia *et al.*, 2002). Im Falle des A β ist das von entscheidender Bedeutung für die Alzheimersche Demenz.

Diese Krankheit ist durch zwei entscheidende Kennzeichen histologisch-anatomisch charakterisiert. Zum einen durch hyperphosphorylierte, intrazelluläre Aggregate des Mikrotubuli-bindenden Proteins Tau, zum anderen durch extrazelluläre, amyloide Aggregate von A β , genannt Plaques (Selkoe, 2001). Das mit 42 Aminosäuren längere A β_{42} -Fragment hat sich im Vergleich zu kürzeren Fragmenten wie A β_{40} als stark aggregierend herausgestellt, daher führen Mutationen im APP, die das Verhältnis der unterschiedlichen A β -Fragmente zu Gunsten des A β_{42} verschieben, zu einer stärkeren „Belastung“ mit Amyloid (Scheuner *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1998). Inwieweit die amyloiden Plaques, d.h. das histologisch sichtbare Zeichen der Alzheimerschen Krankheit, tatsächlich für die Ausprägung der Krankheit und den einhergehenden Tod von Neuronen verantwortlich sind, ist eine noch offene Frage (Koo and Kopan, 2004). Diskutiert werden ebenso toxische Effekte niedermolekularer A β -Aggregate (Gong *et al.*, 2003), Versorgungsprobleme in, durch ausgefallenes Tau lahmgelegten, Neuronen, und aggregat-unabhängige gestörte Signalkaskaden ausgehend von der γ -Secretase (Sisodia *et al.*, 2002). Auch Mutationen im APP, die eine Spaltung durch BACE begünstigen, münden in einer stärkeren Ausprägung der Alzheimerschen Krankheit, d.h. die Krankheit tritt in jüngeren Jahren dramatischer in Erscheinung. Eine dieser Mutationen ist die „schwedische“ Mutante des APP (APP_{sw}), benannt nach dem Herkunftsland der von dieser Mutation betroffenen Familie. Träger dieser Mutation erkranken früher an Alzheimer und weisen erhöhte Mengen an A β auf (Citron *et al.*, 1994).

Die Intrazellulärdomäne des APPs mag ebenso wie die von Notch an Signaltransduktionsereignissen beteiligt sein. Es wurde gezeigt, dass überexprimiertes AICD mit Hilfe des cytoplasmatischen Proteins Fe65 in den Zellkern einwandern kann (Kimberly *et al.*, 2001). Unter bestimmten Voraussetzungen, unter anderem mit Hilfe des Proteins Tip60, konnte in sensitiven Transkriptionsexperimenten eine transkriptionsaktivierende Wirkung des AICD festgestellt werden (Cao and Sudhof, 2001). Inwieweit das für eine tatsächliche physiologische Funktion des APP bedeutsam sein könnte, ist ebenso wie mögliche Zielgene weitgehend unbekannt.

1. Einleitung

Interessanterweise besteht eine Verbindung zwischen SorLA und sporadischer Alzheimerscher Demenz. So wurde ein signifikanter Verlust an SorLA-Protein und mRNA in Neuronen von Erkrankten gefunden (Scherzer et al., 2004). Mechanistisch ist dieser Effekt bisher nicht erklärt, daher ist ein möglicher Einfluss SorLAs auf den Verlauf der Alzheimerschen Krankheit reine Spekulation.

1.4.3 Die γ -Secretase

Auf Grund der ungewöhnlichen Aktivität, innerhalb der hydrophoben Transmembrandomäne von Typ-I-Transmembranrezeptoren proteolytisch zu schneiden, bestand lange Zeit das Problem, die verantwortliche Protease zu identifizieren. Zwar sind Proteine gefunden worden, die Teil eines isolierten γ -Secretase-Komplexes waren, aber die fehlende Sequenzhomologie zu anderen Proteasen sowie die vermeintlich abweichende Lokalisierung von γ -Secretase-Komplex und eigentlicher Aktivität führten zu Zweifeln an den Ergebnissen (Sisodia *et al.*, 2002). Kürzlich konnte aber die minimale Ausstattung eines aktiven γ -Secretase-Komplexes präsentiert werden. Vier Kandidaten wurden in der γ -Secretase-freien Hefe exprimiert und erst diese vier Proteine zusammen führten zu einer γ -Secretase-Aktivität, die in der Lage war *in vitro* APP zu spalten (Edbauer et al., 2003). Demnach sind die Proteine Presenilin (PS), Nicastrin (Nct), PEN-2 (**P**resenilin **e**nhancer-2) und APH-1 (**A**nterior **p**harynx **d**efective-1) notwendige Bestandteile des γ -Secretase-Komplexes (Kaether et al., 2002; Steiner et al., 2002; Kimberly et al., 2002; De Strooper, 2003). Die Aufgabe der einzelnen Proteine ist noch nicht aufgeklärt, aber Nct, Pen-2 und Aph-1 scheinen die Reifung und den Transport des Presenilins zu unterstützen. Die Familie der Preseniline besteht aus zwei homologen Proteinen: PS1 und PS2. Wird PS1 ausgeschaltet reduziert sich die Aktivität der γ -Secretase um ca. 80% (De Strooper et al., 1998). Ein Knock-out von PS1 und PS2 führt zu einem kompletten Verlust der γ -Secretaseaktivität (Herreman et al., 2000). Zwei konservierte Aspartyl-Reste des PS-Proteins (PS1: D257, D385; PS2: D263, D366), die nach einer Mutation zu einer dominant negativen Form führen, und die Chemie der γ -Secretaseinhibitoren, als Analoge des Übergangszustandes bei Aspartyl-Proteasen, legen den Schluss nahe, dass Preseniline, trotz fehlender Sequenzhomologie zu bekannten Vertretern, ungewöhnliche Aspartyl-Proteasen sind (Martoglio and Golde, 2003).

1. Einleitung

1.5 Zielsetzung der Arbeit

1.5.1 Etablierung SorLAs als γ -Secretase-Substrat

Gemeinsamkeiten im proteolytischen Muster zwischen SorLA, APP und Notch deuten die Möglichkeit an, dass SorLA ebenso wie die beiden anderen Proteine ein γ -Secretase-Substrat sein könnte. Auch ist mit LRP bereits ein Vertreter der LDL-Rezeptorgenfamilie als γ -Secretase-Substrat identifiziert worden (May et al., 2002). Ziel dieser Arbeit war es, SorLA als neues Substrat der γ -Secretase zu untersuchen und zu charakterisieren.

1.5.2 Aufklärung eines γ -Secretase-abhängigen Signalweges

Allein die Tatsache, durch die γ -Secretase gespalten zu werden, gibt dem Vorgang für das jeweilige Substrat keine spezifische physiologische Relevanz. Für den Rezeptor Notch ist die Proteolyse durch die γ -Secretase essentiell für die Signalweiterleitung. Für APP dagegen kennt man keine physiologisch bedeutsame Signalkaskade. Vielen anderen γ -Secretase-Substraten und ihren freigesetzten Intrazellulärdomänen konnte bisher keinerlei Funktion zugeschrieben werden.

Daher wurde der Frage, inwieweit eine Signalkaskade über SorLA abhängig von der Prozessierung durch die γ -Secretase ist, in dieser Arbeit nachgegangen.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Techniken

2.1.1 Verwendete Vektoren

Folgende Vektoren wurden zur Klonierung bzw. in anderen Experimenten eingesetzt.

Vektor	Firma	Verwendung/Bemerkung
pcDNA3	Invitrogen	Eukaryotischer Expressionsvektor
pBluescript SK-	Stratagene	Klonierungsvektor
pcDNA3.1 Hygro(+)	Invitrogen	Eukaryotischer Expressionsvektor
pSecTag B	Invitrogen	mit 5'-Signalpeptid und 3' - myc/His-Tag
pEGFP-C2	Invitrogen	5'-EGFP
pBIND	Promega	Gal4-DNA-Bindedomäne wird N-terminal eingeführt
pG5Luc	Promega	Kodiert für Firefly-Luciferase; Reporter im Transkriptionsaktivierungstest
pACT-MyoD, Id	Promega	Kontrolle im Transkriptionsaktivierungstest
pPCR-Script	Stratagene	Klonierung von PCR-Produkten
pGEM-T-easy	Promega	Klonierung von PCR-Produkten

2. Material und Methoden

SorLA-Vektoren	Verwendung/Bemerkung
pSorLAok	SorLA-cDNA in pcDNA3
pSorLA-Blue1	SorLA-cDNA in pBluescript SK-; Eine Mutation im 5'-Bereich führt bei Expression zu einem trunkiertem SoRLA-Protein.

2.1.2 Verdau und Reinigung von DNA

Zum Verdau von DNA wurden nach Anleitung des Herstellers Restriktionsendonucleasen der Firma NEB verwendet. Zur Dephosphorylierung von Vektoren wurde die intestinale Kälberphosphatase (CIP) (NEB) zugesetzt. Die verdauten, dephosphorylierten Vektoren wurden mit dem NucleoSpin-Kit (Macherey-Nagel) gereinigt.

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Üblicherweise wurden 1-2% (w/v)- Agarosegele (Seakem) mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml; Sigma) in TBE (90 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. 1-2µg DNA wurde verdaut (siehe 2.1.2), mit 4x DNA-Ladepuffer (20% (v/v) Glycerin, Spuren von Bromphenolblau und Xylencyanol) versetzt und in die Geltaschen überführt. Die Gele liefen ca. 45 min bei 120 V. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden in einer UV-Geldokumentationsanlage analysiert, gegebenenfalls auf einem UV-Tisch mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin-Kit (Macherey-Nagel) von der Agarose befreit.

2.1.4 Auffüllen 5'-überhängender Enden und Ligation

Zur Generierung von blunt-end-Fragmenten wurde verdaute DNA mit 5'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment (NEB) nach Anleitung behandelt.

Fragment und verdauter Vektor wurden mit Hilfe des LigaFast Rapid DNA Ligation Systems (Promega) ligiert.

2. Material und Methoden

2.1.5 Transformation von Bakterien

Mit 5 µl der Ligationsansätze wurden ca. 70 µl chemokompetente Zellen DH5α (Invitrogen) nach Anleitung transformiert und ausplattiert.

2.1.6 Plasmidisolierung

Kleine Übernachtskulturen (3-4 ml) wurden nach Anleitung mit Hilfe des Plasmid Miniprep Kits (Sequence Laboratories Göttingen) behandelt. Die isolierte Plasmid-DNA war rein genug für eine anschließende Sequenzierung.

Größere Mengen Plasmid-DNA aus 200 ml-Übernachtskulturen wurden über das Nucleobond AX-Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Abschnitte wurden durch die Platinum-Taq DNA-Polymerase (Life Technologies) amplifiziert. Puffer (Life Technologies) und Nukleotide (MBI Fermentas) wurden nach Anleitung und in Standardprotokollen eingesetzt.

Die nötigen Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

Für eine weitere Klonierung konnten die entstandenen Fragmente mit dem Vektor pGEM-T-easy nach Anleitung der Firma Promega ligiert werden.

In Ausnahmen wurde auch die pfu-Polymerase (Stratagene) zur PCR eingesetzt. Dies war in Fällen nötig, in denen die geringere Genauigkeit und das Anhängen zusätzlicher Adenyl-Reste durch die Taq-Polymerase vermieden werden mussten. Durch pfu-Polymerase vervielfältigte DNA wurde mit dem pPCR-Script-Vektor nach Anleitung der Firma Stratagene ligiert.

2. Material und Methoden

In der Arbeit eingesetzte Primer (Oligonukleotide) werden in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
L5-StubSorLA	GGA AGC TTA ACC AGA TCT GTG GGG AGC CT
L3-SorLAStop(+)	GGC TCG AGT CAG GCT ATC ACC ATG GGG AC
L3-SorLAStop(-)	GGC TCG AGG GCT ATC ACC ATG GGG ACG TC
5SICD	GGA AGC TTC TAC ACG AAG CAC CGG AGG CTG
3SICD	GGG GAT CCT CAG GCT ATC ACC ATG GGG AC
fEGFP_1209	CCA CTA CCT GAG CAC CCA GTC
fNLS-Mut	CTT CTA CAC GAA GCA CGC CGC GCT GCA GAG CAG CTT CAC
rNLS-Mut	GTG AAG CTG CTC TGC AGC GCG GCG TGC TTC GTG TAG AAG
5FLAG	TGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG ATA AGC AGC
3FLAG	GCT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT CCA GCT
GAPDHs	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
GAPDHs	TTC ACC ACC CTG TTG CTG TA

2.1.8 Sequenzspezifische Mutagenese (Site-directed mutagenesis)

Der zu mutierende DNA-Abschnitt im Vektor pEGFP-SorICD wurde zwei getrennten PCRs mit der pfu-Polymerase unterworfen. In der einen PCR wurden die Primer fEGFP1209 und rNLS-Mut in der zweiten PCR die Primer 3SICD und fNLS-Mut eingesetzt. Die zwei entstandenen Fragmente wurden über ein Agarose-Gel aufgereinigt, in einem neuen Ansatz vereint und in einer weiteren PCR mit pfu-Polymerase und mit den Primern 5SICD und 3SICD amplifiziert. Das nun mutierte Fragment MutSorICD wurde ebenfalls gelgereinigt und anschließend mit dem Vektor pPCR-Script (nach Anleitung von Promega) ligiert.

2.1.9 Sequenzierungen

2. Material und Methoden

Alle verwendeten und neu klonierten Konstrukte wurden sequenziert. Sequenzierungen wurden extern am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg erstellt.

2.1.10 Detaillierte Klonierungen

Übersicht über die für die Arbeit klonierten Konstrukte. Die Vektorkarten finden sich im Anhang (7.2).

Vektor	Konstrukt	Abkürzung
pcDNA3.1/Hygro	pcDNA3.1/Hygro-Stub-tags	pStub-tags
	pcDNA3.1/Hygro-Stub	pStub
	pcDNA3.1/Hygro-SorLA-tags	pSorLA-tags
	pcDNA3.1/Hygro-SorLA	pSorLA
	pcDNA3.1/Hygro-FLAG-Stub-tags	pFLAG-Stub-tags
pEGFP-C2	pEGFP-SorICD	pEGFP-SorICD
	pEGFP-MutSorICD	pEGFP-MutSorICD
pBIND	pBIND-SorICD	pGal4-SorICD

pStub-tags und pStub

Mit den Primern L5-Stub und L3-StubStop(-) (bzw. L3-StubStop(+)) für pStub) wurde das Stubfragment über eine PCR aus pSorLAok vervielfältigt. Das Fragment wurde in einem Agarose-Gel gereinigt und mit dem Vektor pGEM-T-easy ligiert. Aus diesem Konstrukt konnte nun durch Verdau mit HindIII und XhoI das Stub-Fragment herausgeschnitten, gelgereinigt und mit dem HindIII/XhoI-verdauten, dephosphorylierten Vektor pSecTag B ligiert werden. Das Stub-Fragment inklusive der Ig κ -Leadersequenz (kodiert für das Signalpeptid) und myc/His-Tag wurde anschließend durch Verdau mit NheI und PmeI in den NheI/EcoRV-geschnittenen Vektor pcDNA3.1/Hygro gebracht. Für pStub wurde das Stub-Fragment nur mit Leadersequenz durch Verdau mit NheI und XhoI herausgeschnitten und mit pcDNA3.1/Hygro, geschnitten mit NheI/XhoI, ligiert.

2. Material und Methoden

pSorLA-tags und pSorLA

Zur Herstellung von SorLA-tags wurde der Vektor pSorLA-Blue1 mit EcoRI geöffnet und die Schnittstelle aufgefüllt. Weiter wurde dann mit NsiI verdaut. Aus dem pStub-tags-Vektor wurde nach NsiI/PmeI-Verdau das Fragment aufgereinigt und mit dem geöffneten pSorLA-Blue1 ligiert. Durch NotI-Verdau wurde aus dem neu entstandene Vektor das komplette SorLA-Fragment herausgeschnitten und in den NotI-geschnittenen Vektor pcDNA3.1 Hygro durch Ligation eingeführt. pSorLA-Blue1 trägt im im 5'-Bereich eine Mutation, die ein zusätzliches Stop-Codon einführt. Diese Mutation wurde durch BamHI-Verdau entfernt und durch das mutationsbereinigte BamHI-Fragment aus pSorLAok ersetzt. Für den SorLA-Vektor ohne tags wurde pSorLA-tags mit SanDI und XhoI verdaut und mit dem durch SanDI/XhoI-Schnitt aus pSorLAok präpariertem Fragment ligiert.

pFLAG-Stub-tags

Der Vektor pStub-tags wurde durch SfiI verdaut, dephosphoryliert und im Gel gereinigt. Die Oligonukleotide 5FLAG und 3FLAG wurden 1:1 vereint in Polynukleotidkinase-Puffer (NEB) mit 1 mM ATP (MBI Fermentas). Polynukleotidkinase wurde nach Angabe von NEB zugesetzt und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Deaktivierung der Kinase und zum Aneinanderlagern der Oligonukleotide 20 min bei 65°C inkubiert. Das Gemisch kühlte danach auf Raumtemperatur ab. Die Ligation des phosphorylierten FLAG-Fragmentes mit dem geöffneten Vektor wurde nach Anleitung der Firma Promega mit dem LigaFast Rapid DNA Ligation System durchgeführt.

pEGFP-SorICD und pEGFP-MutSorICD

Mit Hilfe einer PCR wurde das SorICD-Fragment mit den Primern 5SICD und 3SICD aus dem Vektor pStub heraus amplifiziert. Das Fragment wurde in den Vektor pPCR-Script ligiert. Mit den Enzymen HindIII und BamHI konnte das SorICD-Fragment aus pPCR-Script wieder herausgeschnitten werden. Das gereinigte Fragment wurde dann in den mit HindIII/BamHI-geöffneten Vektor ligiert. Der Vektor pEGFP-SorICD wurde dann einer sequenzspezifischen Mutagenese (2.1.8) unterzogen, um den Vektor pEGFP-MutSorICD herzustellen.

2. Material und Methoden

pGal4-SorICD

Das SorICD-Fragment wurde aus dem Vektor pEGFP-SorICD durch Verdau mit HindIII und BamHI herausgeschnitten und gelgereinigt. Der Vektor pcDNA3.1 Hygro wurde durch HindIII/BamHI verdaut, dephosphoryliert und mit dem Fragment ligiert. Das SorICD-Fragment konnte aus dem pcDNA3.1/Hygro-Vektor mit NotI/PmeI wieder entfernt und in den mit NotI/EcoRV geschnittenen Vektor pBIND durch Ligation eingesetzt werden.

2.1.11 semiquantitative RT-PCR

SorLA-exprimierende Zellen in einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurden 15 h lang mit oder ohne γ -Secretase-Inhibitor 1 μ M DAPT (γ -Secretase Inhibitor IX, Calbiochem) behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen, abgelöst und sedimentiert. Das Pellet wurde zur RNA-Präparation mit dem NucleoSpin RNA II-Kit (Macherey-Nagel) nach Anleitung aufbereitet. Ungefähr 5 μ l der RNA wurden auf einem Agarosegel (2.1.3) analysiert. Nach dieser Kontrolle wurde die cDNA synthetisiert. 1 μ l der RNA-Präparation wurde mit 1 μ l Oligo-dT (MBI Fermentas), 1 μ l RNasin (Promega) und 2 μ l bidest. Wasser versetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei 70°C inkubiert und dann abgekühlt. Zu dem Gemisch kamen dann noch 4 μ l 1st strand buffer (NEB), 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l dNTP (10 mM für jedes Nukleotid (MBI Fermentas)), 7 μ l bidest. Wasser und 1 μ l der Polymerase MMLV (NEB). Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die für die einzelnen Ansätze gewonnene Menge an cDNA wurde normalisiert und jeweils 1 μ g für die folgende PCR eingesetzt. Die PCR folgte Standardprotokollen (2.1.7) und wurde mit der Taq-Polymerase (Life Technologies) durchgeführt. Als Primer dienten zur Amplifizierung SorLA-spezifischer cDNA L5-StubSorLA und L3-SorLAsStop(+) (2.1.7). Zur Kontrolle wurde weiterhin für jeden Ansatz eine PCR mit den Primern GAPDHs und GAPDHs (2.1.7) zur Vervielfältigung des Housekeeping-Gens GAPDH durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel (2.1.3) analysiert.

2. Material und Methoden

2.2 Proteintechniken

2.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Es wurden ausschließlich denaturierende SDS-haltige Gelsysteme eingesetzt. Alle Proteinproben wurden bei 95°C 5 min in SDS-Probenpuffer (4-fach Ansatz: 8 % (w/v) SDS; 250 mM Tris-HCl, pH 6,8 ; 40 % (v/v) Glycerin (v/v) ; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol (v/v); 0,04 % (w/v) Bromphenolblau) denaturiert.

Zur Auftrennung größerer Proteine dienten 10 % -SDS-PAGE-Gele hergestellt nach Laemmli (Sambrook et al., 1989). Proteine wurden in diesen Gelen in einer Biorad MiniProtean3-Gelkammer (Biorad) bei 120 V ca. 1 h lang aufgetrennt.

Proteingemische mit kleineren interessierenden Proteinen wurden in kommerziell erhältlichen 4-12 % Bis/Tris-Gradientengelen (NuPAGE-Gelsystem, Invitrogen) in der entsprechenden NuPAGE-Gelkammer oder über selbsthergestellte Tris/Tricin-Gradientengele aufgetrennt. Die NuPAGE-Gele liefen nach Anleitung ca. 30 min bei 200V, während die Tris/Tricine-Gele bei 120 V ca. 2 h benötigten.

Anleitung zur Herstellung eigener Tris/Tricin-Gele:

Zusammensetzung	16,5 %-Trenngel (10,5 ml)	10 %-Trenngel (7,5 ml)	4 % Sammelgel (6,25 ml)
Acrylamid-Lösung	3,5	1,5	0,5
Gel-Puffer	3,5	2,5	1,55
Aqua dest.	-	3,5	4,2
32 % (v/v) Glycerin	3,5	-	-
10 % (w/v) APS	32,5 μ l	35 μ l	50 μ l
TEMED	3,25 μ l	4 μ l	5 μ l
pro Gel (1,5 mm Dicke)	5 ml	2,5 ml	ca. 2 ml

Das 16,5 %-Trenngel wird im noch flüssigen Zustand vorsichtig mit dem 10 %-Trenngel überschichtet. Diese Gellösung wird mit Isopropanol abgedeckt und ruht bis zum Festwerden des Geles. Das Gel wird dann vom Isopropanol befreit und mit Aqua dest. kurz gespült. Anschließend wird das Sammelgel auf die Trenngele gegossen und polymerisiert mit dem Kamm.

2. Material und Methoden

Tris/Tricin-Puffer (0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1 % (w/v) SDS)

Gel-Puffer (3 M Tris-HCl pH 8,45; 0,3 % (w/v) SDS)

Acrylamid-Lösung (49,5 % T + 3 % C; 48 g Acrylamid und 1,5 g Bisacrylamid auf 100ml)

2.2.2 Western-Blot

In einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden nach dem Nassblot-Verfahren in einer MiniProtean3-Anlage (Biorad) auf eine PVDF-Membran (Millipore) binnen 1 h bei 400 mA übertragen. Die Membranen wurden vorher in Methanol aktiviert und in Blottingpuffer überführt. Nach dem Blotting wurden die Membranen 2 min in Ponceau S (Serva) gefärbt. Entfärbt wurde anschließend mit TBS-Tween (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20 (Merck)). Unspezifische Interaktionsmöglichkeiten auf der PVDF-Membran wurden unter Schwenken der Membran in 5% Magermilchpulver in TBS-Tween (Blockierlösung) abgesättigt. Die Membran wurde anschließend in Blockierlösung mit dem ersten spezifischen Antikörper 1 h bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran von ungebundenem Antikörper durch sechsmaliges 5 minütiges Waschen mit TBS-Tween befreit. Der zweite Antikörper (Peroxidase-gekoppelt (PO)) wurde aufgrund der Empfindlichkeit des Detektionssystems 1:20.000-30.000 in Blockierlösung verdünnt und mindestens 1 h mit der Membran inkubiert. Wieder wurde 6 mal 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Gebundene Antikörperkomplexe wurden durch das Super Signal West Dura Extended-System (Pierce) detektiert. Die entstandene Chemilumineszenz wurde durch Exposition und Entwicklung von Biomax MR-Filmen (Kodak) sichtbar gemacht.

Folgende Antikörper wurden in Western-Blot-Experimenten eingesetzt.

Primärantikörper	Typ	Firma	Verdünnung	Verwendung/Bemerkung
α SorLAcP	p	-	1:3000	erkennt SorLAs Intrazellulärdomäne
α myc	m	Sigma	1:1000	bindet an den myc-Tag aus pSecTag
α FLAG	m	Sigma	1:1000	bindet an N- und C-terminales FLAG-Peptid
α APP 6687	p	-	1:1000	erkennt Intrazellulärdomäne von APP

2. Material und Methoden

Sekundärantikörper		Firma	Verdünnung	Verwendung/Bemerkung
Goat α Mouse IgG PO	-	Dianova	1:20.000	Minimale Kreuzreaktionen
Goat α Rabbit IgG PO	-	Dianova	1:20.000	Minimale Kreuzreaktionen

p – polyklonaler Antikörper (Rabbit) m – monoklonaler Antikörper (Mouse)
PO – Peroxidase-gekoppelt

2.2.3 Immunpräzipitationen

Zelllysate (siehe 2.3.4) wurden mit STEN-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2% NP-40) und BSA (2mg/ml) verdünnt und mit 25 μ l Protein-A-Sepharose (Amersham) versetzt. Die Protein-A-Sepharose soll unspezifische Bindungen abfangen und wurde nach Anleitung der Firma Amersham vorbereitet. Diese Suspension wurde 30 min bei 4°C geschüttelt und dann zentrifugiert (14.000 xg; 5 min). Der Überstand wurde nun mit 1-3 μ l des polyklonalen Antiserums versetzt und 1 h bei 4°C geschüttelt. Im Anschluss an diese Inkubation wurden 25 μ l Protein-A-Sepharose hinzugegeben und weitere 2 h bei 4°C geschüttelt. Der Protein-A-Sepharose-Komplex wurde dann durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 30 s) vom Zelllysate getrennt und 4 mal mit STEN-Puffer gewaschen. Zum gewaschenen Sepharose-Pellet wurden dann ca. 20 μ l SDS-Ladepuffer gegeben. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 95°C aufgekocht und dann erneut zentrifugiert. Der Überstand konnte nun in einem Western-Blot analysiert werden.

Immunpräzipitationen mit Proteinen, die einen FLAG-Tag tragen, wurden mit FLAG-Agarose (Sigma) durchgeführt. In dem Fall entfiel die halbstündige Inkubation mit dem Antikörperserum.

2. Material und Methoden

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Folgende eukaryotische Zelllinien wurden verwendet.

Typ	Medium	Herkunft
HEK 293	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) 10% fötales, hitzeinaktiviertes Kälberserum (FCS) (Gibco) 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (Gibco)	Humane embryonale Nierenzellen
COS-7	DMEM 10% FCS 1% P/S	Fibroblasten aus der Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze
MEF	DMEM 10% FCS 1% P/S	Murine embryonale Fibroblasten
NT2	Optimised Modified Eagle Medium (Optimem) (Gibco) 5% FCS 1% P/S	Humane neuronale Vorläuferzellen

2. Material und Methoden

Die Zellen wurden zur Weiterführung einer Kultur mit D-PBS (Gibco) gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Gibco) abgelöst. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe des entsprechenden FCS-haltigen Mediums inhibiert und die Zellsuspension auf neue Zellkulturflaschen (Nunc) verteilt.

2.3.2 Transfektion

Die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde hauptsächlich unter Verwendung von Fugene 6 (Roche) nach Anleitung durchgeführt. In Ausnahmefällen und bei der Transfektion von MEF-Zellen wurde auf LF2000 (Invitrogen) zurückgegriffen. MEF-Zellen ließen sich nicht oder nur zu einem geringen Maße mit Fugene 6 transfizieren.

2.3.3 Stabil-transfizierte Zellen

Folgende stabil-transfizierte Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet. Die HEK-Zellen sind bereits stabil transfiziert mit pcDNA3-swAPP₆₉₅ (Haass et al., 1995) und pcDNA3.1/Zeo-PS wt (Wildtyp-Presenilin) oder pcDNA3.1/Zeo-PS D385N (dominant negative PS-Mutante (Wolfe et al., 1999)).

Zelltyp transfiziert mit	Stabile Expression von	Anwendung
HEK 293 PS wt <ul style="list-style-type: none">• pStub-tags	<ul style="list-style-type: none">• SorLA-Stub-tags• swAPP₆₉₅• PS wt	<i>in vitro</i> - γ -Secretase-Versuche (3.2)
HEK 293 PS D385N <ul style="list-style-type: none">• pStub-tags	<ul style="list-style-type: none">• SorLA-Stub-tags• swAPP₆₉₅• PS D385N	Inhibierungsexperimente (3.1)

2. Material und Methoden

HEK 293 PS wt <ul style="list-style-type: none">• pSorLA	<ul style="list-style-type: none">• SorLA• swAPP₆₉₅• PS wt	Inhibierungsexperimente (3.3)
HEK 293 PS D385N <ul style="list-style-type: none">• pSorLA	<ul style="list-style-type: none">• SorLA• swAPP₆₉₅• PS D385N	Inhibierungsexperimente (3.3)

Die SorLA-Konstrukte wurden in die HEK-Zellen transfiziert und nach 48 h wurde ein Selektionsdruck von 200 µg/ml durch Hygromycin ausgeübt. Im Verlaufe dieser Selektion starb ein Großteil der Zellen. Die überlebenden Zellen bildeten kleine „Kolonien“ auf dem Zellkulturflaschenboden. Einzelkolonien konnten vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze in kleinere Zellkulturflaschen überführt werden. Die restlichen Kolonien wurden anschließend vereint und bildeten den Pool. Einzelkolonien sowie der Pool wurden dann nach Zellyse in einem Western-Blot auf stabile Expression hin überprüft.

2.3.4 Zellyse

Die Zellen wurden mit D-PBS einmal gewaschen, anschließend mit einem Zellkulturschaber in D-PBS abgelöst und zentrifugiert (500xg; 5 min). Das Zellpellet wurde in STEN-Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% (v/v) NP-40) resuspendiert, mit 1x Proteaseinhibitor-Mix (Roche complete Mini) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 14.000xg für 15 min abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde im Überstand durch eine Bradford-Analyse (siehe Anleitung Roth) bestimmt.

2.3.5 Konfokalmikroskopie

Konfluente COS-Zellen wurden durch Trypsin abgelöst, in 6-well-Platten mit Deckgläschen überführt und mit den gewünschten Plasmiden transfiziert (Fugene 6 (2.3.2)). Die Zellen wurden 48 h inkubiert, dann fixiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen

2. Material und Methoden

und 10 min in 4% Paraformaldehyd in D-PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal schnell gewaschen mit einer Quench-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl). Bei gewünschter Permeabilisierung der Zellen wurden diese in 0,1%-Triton X100 (Sigma) in D-PBS für 15-20 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit D-PBS konnten die Zellen auf einem Tropfen Fluoromount G (Southern Biotechn. Assoc.) auf Objektträger gebracht werden. Die Analyse erfolgte an einem Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510 Meta).

2.4 Experimente zur γ -Secretase

2.4.1 Inhibierungsexperimente

Zur Analyse des Einflusses von Presenilin auf exprimiertes SorLA wurden stabil bzw. transient mit SorLA-Konstrukten transfizierte HEK-Zellen 48 h in Medium belassen. 15 h vor Ernte der Zellen und Zellyse (siehe 2.3.4) wurde ein Teil der Zellen mit 1 μ M des γ -Secretaseinhibitors DAPT (γ -Secretase Inhibitor IX, Calbiochem) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der Zellyse wurden das zelluläre Protein in einem Western-Blot analysiert.

2.4.2 In vitro- γ -Secretasetest

Die Generierung der freien Intrazellulärdomäne von SorLA (SorICD) richtete sich nach einem kürzlich für APP veröffentlichten Protokoll (Sastre et al., 2001).

Stabil mit pStub-tags transfizierte Zellen wurden mit D-PBS gewaschen und mit einem Zellkulturschaber abgelöst und zentrifugiert (500xg; 5 min). Anschließend wurden die Zellen in ca. 500 μ l hypotonem Puffer (10 mM HEPES pH 7,0; 10 mM KCl; 1x Proteaseinhibitor-Mix (Roche)) pro 75 cm²-Zellkulturflasche resuspendiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann 10 mal durch eine Spritze (Kanüle 23 Gauge) gedrückt. Die Zellmembranen wurden von größeren unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (1000xg; 15 min) befreit. Anschließend wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (14.000xg; 40 min) die Membranen pelletiert. Diese Zentrifugation wurde bei 100.000xg durchgeführt sobald eine höhere Reinheit durch ein festeres Pellet nötig war.

Die Membranen wurden in 50 μ l Citrat-Puffer (150 mM Citrat pH 6,4; 1x Proteaseinhibitor-Mix (Roche)) pro 75 cm²-Zellkulturflasche resuspendiert. Je 25 μ l dieses Ansatzes wurden dann unter verschiedenen Bedingungen (zum Beispiel mit und ohne γ -Secretaseinhibitor) bei

2. Material und Methoden

37°C 1,5-2 h geschüttelt. Die Ansätze wurden anschließend in einer Ultrazentrifuge (100.000xg; 1 h) in lösliche (S100) und unlösliche (P100) Fraktion getrennt. Die lösliche Fraktion wurde mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem Gradientengelsystem aufgetrennt. Die Analyse erfolgte dann über Western-Blot.

2.5 Lokalisierung des SorICD in der Zelle

COS-Zellen wurden in 6-well-Platten auf Deckgläschen kultiviert und mit 1 µg eines der EGFP-Konstrukte (pEGFP; pEGFP-SorICD; pEGFP-MutSorICD) transfiziert. Nach 24-48 h wurden die Zellen in einer Paraformaldehyd-Lösung fixiert und auf Objektträger gebracht (siehe 2.3.5). Die Analyse erfolgte an einem Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510 Meta). Von mindestens 30 individuellen Zellen pro Konstrukt und Experiment wurde die Fluoreszenz in über eine definierte Fläche im Zellkern und im Cytoplasma vermessen. Das Verhältnis von Kern- zu Cytoplasmafluoreszenz wurde für die Konstrukte in einem Students-t-test mit dem Programm Statistica statistisch ausgewertet.

2.6 Transkriptionsaktivierung

COS-Zellen wurden auf 24 well-Platten ausgebracht und mit jeweils 0,2 µg pG5Luc als dem Reporterkonstrukt und 0,2 µg eines der Vektoren pBIND oder pBIND-SorICD transfiziert. Nach 48 h Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen. Pro well wurden jetzt 220 µl vorher auf Raumtemperatur erwärmte Bright-Glo Luciferase assay-Lösung (Promega, nach Anleitung) zu den Zellen gegeben. Die Platte wurde für 5 min sanft geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 100 µl aus den einzelnen wells in je zwei wells einer 96-well-Platte pipettiert. Diese Platte wurde dann in einem Luminometer (Centro LB 960; Berthold Technologies) vermessen. Pro well wurden 10 s-Werte aufgenommen.

2.7 SorICD-Abbau

Zur Analyse des Abbaus von SorICD wurde ein *in vitro*- γ -Secretasetest wie in 2.4.3 beschrieben durchgeführt. Das produzierte SorICD wurde ebenfalls durch Ultrazentrifugation (100.000xg; 1 h) von den Membranen getrennt und anschließend in 20 µl Ansätze aliquotiert.

Parallel dazu wurde Cytoplasma von NT2-Zellen präpariert. Dazu wurden NT2-Zellen wie im *in vitro*- γ -Secretasetest beschrieben durch hypotonen Puffer aufgebrochen und zweimal

2. Material und Methoden

zentrifugiert. Der Überstand nach der zweiten Zentrifugation entspricht dem durch hypotonem Puffer verdünnten Cytoplasma.

Jeweils 5 µl dieses Cytoplasmas wurden zu 20 µl der SorICD-Präparationen hinzugegeben. Diese Ansätze wurden dann mit verschiedenen Inhibitoren behandelt: 5 mM EDTA als Metalloproteaseinhibitor, 10-250 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA) (PAA), 10-250 µg/ml Insulin (Sigma). Dann erfolgte eine Inkubation unter Schütteln bei 37°C für 2-3 h.

Die Ansätze wurden anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

Die Verwandtschaft SorLAs mit Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie, die teilweise, soweit untersucht, Substrat für die γ -Secretase sind, als auch die vergleichbare Prozessierung SorLAs zu bekannten γ -Secretase-Substraten wie Notch und APP, legt den Schluss nahe SorLA könnte ebenfalls durch γ -Secretasen gespalten werden.

3.1 Hinweise auf SorLA als neues γ -Secretasesubstrat

3.1.1 Einfluss eines γ -Secretase-Inhibitors auf SorLA-Stub

Um die mögliche intramembranäre Spaltung vorteilhafter untersuchen zu können, wurde ein SorLA-Vektor konstruiert, der nur noch für eine sehr kurze SorLA-Version kodieren soll. Durch die Verkürzung wird der sonst notwendige Shedding-Prozess quasi umgangen und der γ -Secretase gleich das eigentliche Substrat, das membranständige Stub-Fragment angeboten (Abb. 3-1).

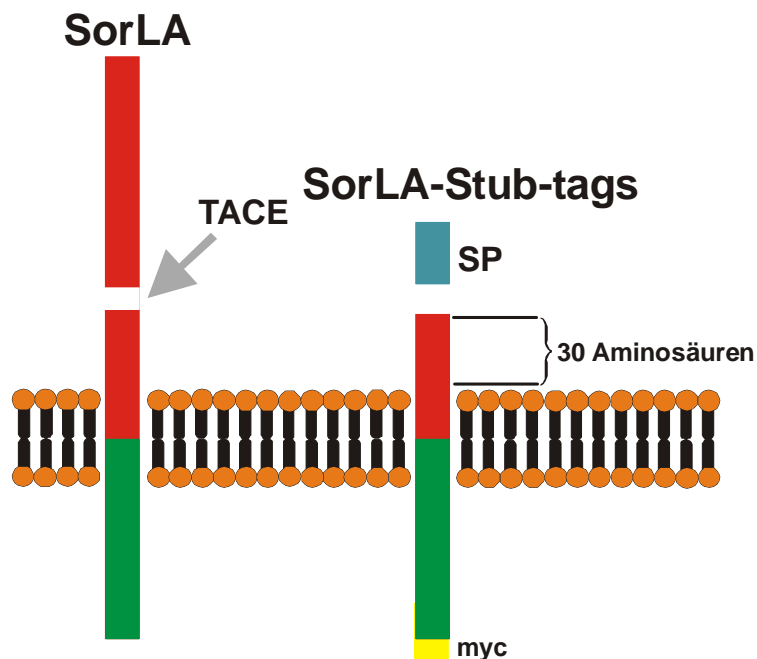


Abb. 3-1. Schematischer Vergleich von SorLA und SorLA-Stub

SorLA-Stub entspricht in etwa dem membranständigen SorLA-Rest nach dem Shedding-Prozess. SorLA-Stub wurde mit und ohne C-terminalem myc-Tag exprimiert. SP – Signalpeptid

3. Ergebnisse

Zur Klonierung wurden hierzu ein Primer (L5-Stub) entworfen, der am 5'-Ende ca. 90 nt vor dem für den Membranbereich kodierenden SorLA-cDNA-Abschnitt bindet (siehe SorLAs C-Terminus in der Übersicht 7.3). Die Primer des 3'-Endes binden vor dem Stop-Codon der cDNA. Ein Primer (L3-StubStop(-)) ersetzt das Stop-Codon, um eine Modifikation durch tags (myc-His) zu ermöglichen, während ein weiterer Primer (L3-StubStop(+)) das Stop-Codon intakt läßt. Kloniert wurden die PCR-Fragmente in den Vektor pSecTag, der N-terminal der Multiple cloning site für ein Signalpeptid und C-terminal für ein myc/His-Tag kodiert. Die komplette Kassetten wurde dann in den Expressionsvektor pcDNA3.1Hygro(+) kloniert (siehe Vektorkarten 7.2). Die HEK-Zellen, bereits stabil transfiziert mit swAPP und Presenilin, wurden zusätzlich stabil transfiziert mit pStub-tags (2.3.3). Diese Zellen wurden dann 48h in Kultur gehalten, 15h vor der Zellernte wurde ein Teil der transfizierten Zellen mit dem γ -Secretase-Inhibitor DAPT behandelt. Nach Ablauf der 15h wurden die Zellen geerntet und das Gesamtzellprotein präpariert. Gleiche Proteinmengen behandelter und unbehandelter Zellen wurden in einem SDS-Polyacrylamidgelsystem aufgetrennt und durch Western-Blotting analysiert (Abb. 3-2)

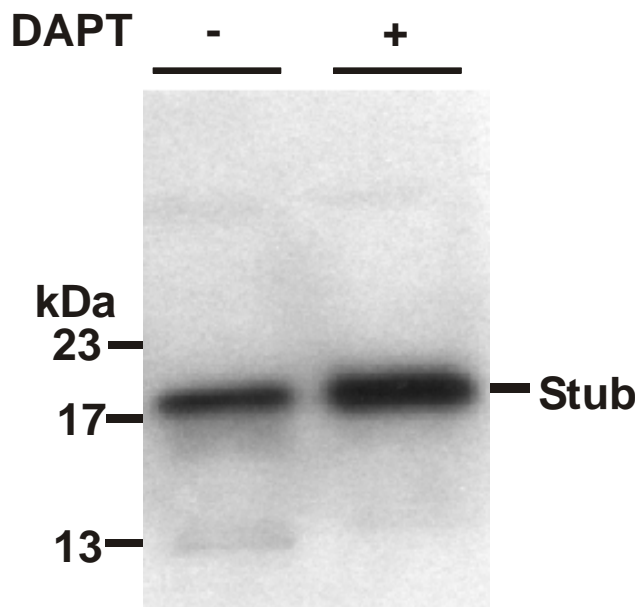


Abb. 3-2. SorLA-Stub unter dem Einfluss von DAPT

HEK-Zellen, die stabil transfiziert wurden mit SorLA-Stub-tags, wurden 15 h mit 1 μ M DAPT gelöst in DMSO (+) bzw. 15 h nur mit DMSO als Kontrolle (-) behandelt. Die Zellysate wurden präpariert und in einem 10%-Läemli-Gel aufgetrennt. Die Analyse über Western-Blot erfolgte mit einem myc-Antikörper. Stub – SorLA-Stub-tags.

3. Ergebnisse

Deutlich ist die robuste Expression an SorLA-Stub bei den unbehandelten Zellen bei ungefähr 20 kDa zu erkennen. Die Menge an SorLA-Stub in der Spur der DAPT-behandelten Zellen ist um ein Vielfaches höher. Erklärbar wird dieses Phänomen durch die reduzierte Aktivität der γ -Secretase, bzw. möglicher anderer intramembran-schneidender Proteasen, die durch DAPT gehemmt werden. So wird weniger Substrat aus der Membran durch Spaltung entfernt, es reichert sich in der Membran an. Daraus folgt, dass SorLA-Stub guter Kandidat für ein γ -Secretasesubstrat ist.

Bemerkenswert ist die sehr schwache Bande bei 13 kDa in der nicht mit Inhibitor behandelten Probe. Diese könnte unter Umständen ein Hinweis auf die nach γ -Secretase-Spaltung freigesetzte Intrazellulärdomäne von SorLA sein. Üblicherweise war diese Bande aber in dieser Art Experiment nicht aufzufinden.

3.1.2 Die dominant negative Presenilinmutante D385N und SorLA-Stub

DAPT ist ein effektiver Inhibitor der γ -Secretase, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass er eine andere, bisher unbekannte, Aktivität ebenfalls hemmt. Durch Einbringen eines mutierten Bestandteils in den γ -Secretase-Komplex wird dieses Problem umgangen. Um die γ -Secretase direkt zu hemmen wurde Presenilin als ein Bestandteil des γ -Secretase-Komplexes in seiner dominant negativen Form PS D385N verwendet.

Es wurden sowohl HEK-Zellen, stabil transfiziert mit dem Wildtyp-Presenilin (wt), als auch Zellen, die die Mutante PS D385N (D385N) (Wolfe et al., 1999) tragen, mit SorLA-Stub transient transfiziert. Methodisch wurden die Zellen wie in 3.1.1 behandelt.

3. Ergebnisse

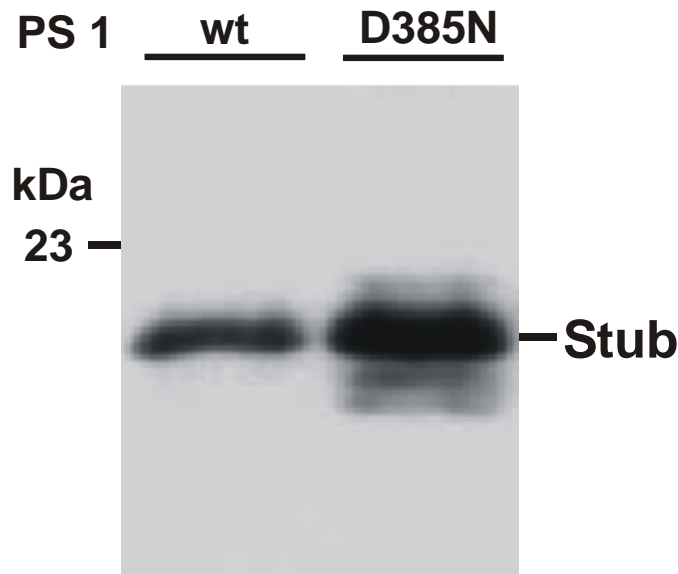


Abb. 3-3. Einfluss von PS D385N auf SorLA-Stub

HEK-Zellen stabil transfiziert mit PS 1-Wildtyp (PS wt) bzw. mit PS D385N wurden transfiziert mit SorLA-Stub-tags (Stub). Nach 48 h erfolgte die Zellyse. Das Lysat wurde in einem 10%-Läemli-Gel aufgetrennt und über einen Western-Blot mit myc-Antikörper analysiert.

Auch hier zeigt sich bei ca. 20 kDa SorLA-Stub als Bande. Ebenso wie bei DAPT-behandelten Zellen reichert sich SorLA-Stub in den Zellen mit PS D385N im stärkeren Maße an. Dies ist eine Bestätigung des vorhergehenden Experiments (3.1.1) und deutet konkret auf eine direkte Beteiligung der γ -Secretase an der Prozessierung SorLAs hin. Zu beachten ist hier, dass beim Wildtyp im Unterschied zu Abb. 3-2 keine zusätzliche Bande unterhalb des SorLA-Stubs zu detektieren ist.

3.1.3 SorLA-Stub in Presenilin-Knock-out-Zellen

Um die Rolle der γ -Secretase, bzw. des Presenilins, für die Prozessierung SorLAs zu unterstreichen, wurden nach dem Test einer PS-Mutante noch Zellen, die keinerlei Presenilin exprimieren, getestet. Hierzu wurden MEF-Zellen im Wildtyp und mit ausgeschaltetem Presenilin 1 (PS1) und Presenilin (PS2) (Herreman et al., 1999) mit SorLA-Stub transfiziert.

3. Ergebnisse

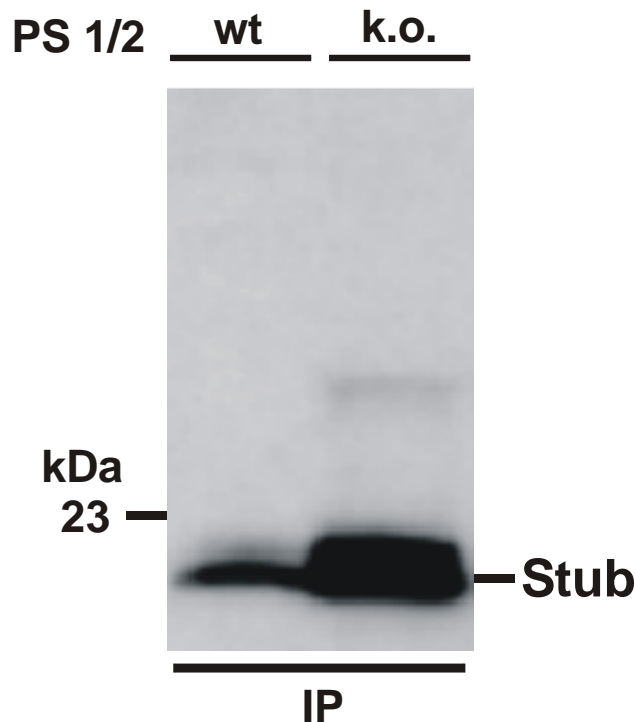


Abb. 3-4. Presenilin-Knock-out-Zellen

Gesamtzellprotein von lysierten MEF-Zellen (mit PS1/PS2-Wildtyp (wt) oder PS1/PS2-defizienten Zellen (k.o.)) transient transfiziert mit pStub-tags (Stub) wurde präpariert. Mit den Lysaten wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit Hilfe des α SorLAcp gebunden an Protein-A-Sepharose durchgeführt. Wildtyp-Lysat und Präzipitat wurden in einem 10%-Läemli-Gel aufgetrennt. Detektiert wurde nach dem Western-Blot durch einen monoklonalen myc-Antikörper.

Ebenso wie in den vorhergehenden Experimenten, kann hier in Abb. 3-4 die Anreicherung von SorLA-Stub in den Zellen mit gehemmtem/fehlendem Presenilin beobachtet werden. Die produzierte Menge an SorLA-Stub in den MEF-Zellen war deutlich geringer im Vergleich zu HEK-Zellen, so kann in nicht-präzipitierten Proben meist nur ein Hauch SorLA-Stub detektiert werden. Nach Immunpräzipitation von SorLA-Stub aus Zelllysaten wird der Unterschied zwischen PS-Wildtyp- und Knock-out-Zellen aber deutlich. PS-freie Zellen zeigen eine wesentlich kräftigere Bande um ca. 20 kDa als der Wildtyp. Somit wird die Theorie von SorLA als einem γ -Secretase-Substrat weiter unterstützt.

3. Ergebnisse

3.2 γ -Secretase-abhängige Freisetzung der Intrazellulärdomäne von SorLA

Die meisten bisher aufgeklärten γ -Secretase-Substrate geben nach Spaltung durch Presenilin eine äußerst instabile Intrazellulärdomäne ins Cytosol ab. Durch die geringe Halbwertszeit kann diese Domäne im lebenden System nur schwer nachgewiesen werden. Zum Nachweis muss daher auf einen *in vitro*-Ansatz zurückgegriffen werden (Sastre et al., 2001). In diesen *in vitro*- γ -Secretase-Experimenten werden Membranen von Zellen präpariert, die das potentielle γ -Secretase-Substrat überexprimieren. Diese Membranen werden dann unter kontrollierten Bedingungen, u.a. mit Proteaseinhibitoren, inkubiert. Dies sollte zu einer Stabilisierung der Intrazellulärdomäne führen. Nach Inkubation werden Membranen und Puffer durch Ultrazentrifugation getrennt und der Überstand mit freigesetzter Intrazellulärdomäne im Western-Blot analysiert.

3.2.1 *In vitro*- γ -Secretase-Experiment mit swAPP₆₉₅

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit dieses Versuchs wurde die bereits unter diesen Bedingungen gezeigte Freisetzung der Intrazellulärdomäne von APP untersucht. Die in den meisten Versuchen eingesetzten HEK-Zellen sind neben Presenilin auch immer mit APP₆₉₅ in der schwedischen Variante stabil transfiziert, so dass diese Zellen in einem *in vitro*- γ -Secretase-Experiment zur Freisetzung von APPs Intrazellulärdomäne (AICD) genutzt werden konnten.

3. Ergebnisse

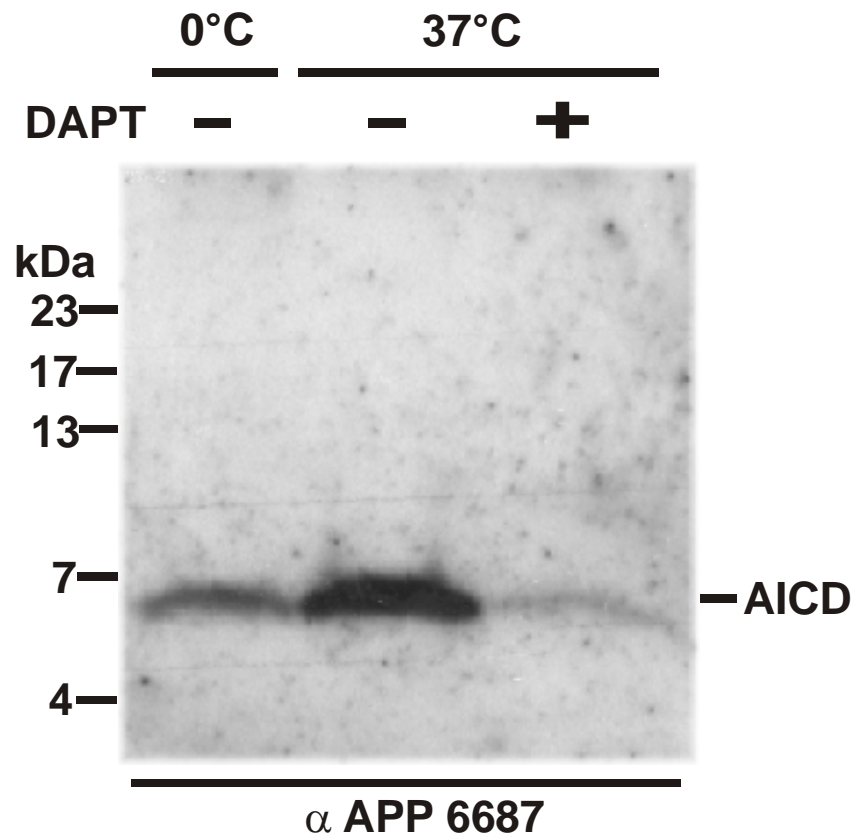


Abb. 3-5. swAPP₆₉₅ im in vitro- γ -Secretaseexperiment

Membranen von HEK-Zellen stabil transfiziert mit Wildtyp-Presenilin und APP₆₉₅ in der schwedischen Mutante wurden präpariert. Die Membranen wurden mit (+) und ohne (-) 5 μ M DAPT 2 h bei 37°C inkubiert. Eine Probe wurde auf Eis (0°C) belassen. Anschließende Ultrazentrifugation separierte den Überstand und Membranreste. Der Überstand mit den freigesetzten Intrazellulärdomänen wurde auf einem Tris/Tricin-Gradientengel aufgetrennt und in einem Western-Blot mit α APP6687 analysiert. AICD – Intrazellulärdomäne von APP.

Abb. 3-5 zeigt ein in vitro- γ -Secretase-Experiment mit den APP exprimierenden HEK-Zellen. Die bei 37°C ohne Inhibitor inkubierten Membranen haben ein Peptid von ca. 6 kDa freigesetzt, das mit einem APP-spezifischen-Antikörper im Western-Blot detektiert werden konnte. Die Größe des Fragments und die Affinität des Antikörpers gegen den C-Terminus von APP legen den Schluss nahe tatsächlich die Intrazellulärdomäne des APPs, das AICD, im Membran-Überstand detektiert zu haben. Bei Inkubation der Membranen in Gegenwart des Inhibitors DAPT, wurde nur noch eine verschwindend geringe Menge AICD gebildet. Bei 0°C verbliebene Membranen sollten eine wesentlich geringere Proteaseaktivität aufweisen, dennoch ist auch in dieser Probe (0°C) AICD zu finden. Die relativ große Menge kann aber durch mangelnde Übung bei der Durchführung des Experimentes erklärt werden, bei der die

3. Ergebnisse

Probe wahrscheinlich zeitweise erhöhten Temperaturen ausgesetzt war. Durch die Detektion des freigesetzten AICD in Abwesenheit von DAPT konnte die γ -Secretase-Abhängigkeit der Reaktion und die generelle Eignung dieser Art von Experiment zur Detektion von SorLAs Intrazellulärdomäne gezeigt werden.

3.2.2 In vitro- γ -Secretase-Experiment mit SorLA-Stub-tags

Wie in den vorhergehenden Experimenten erläutert konnte bis auf wenige Ausnahmen zwar die Anreicherung des SorLA-Stub nach Hemmung der γ -Secretase beobachtet werden, das intrazelluläre Fragment, das nach einem γ -Secretaseschnitt freigesetzt werden sollte, war aber so gut wie nie in Zellysaten zu detektieren. Daher wurde ein in vitro- γ -Secretase-Experiment identisch zu dem mit APP (3.2.1) durchgeführt (Abb. 3-6).

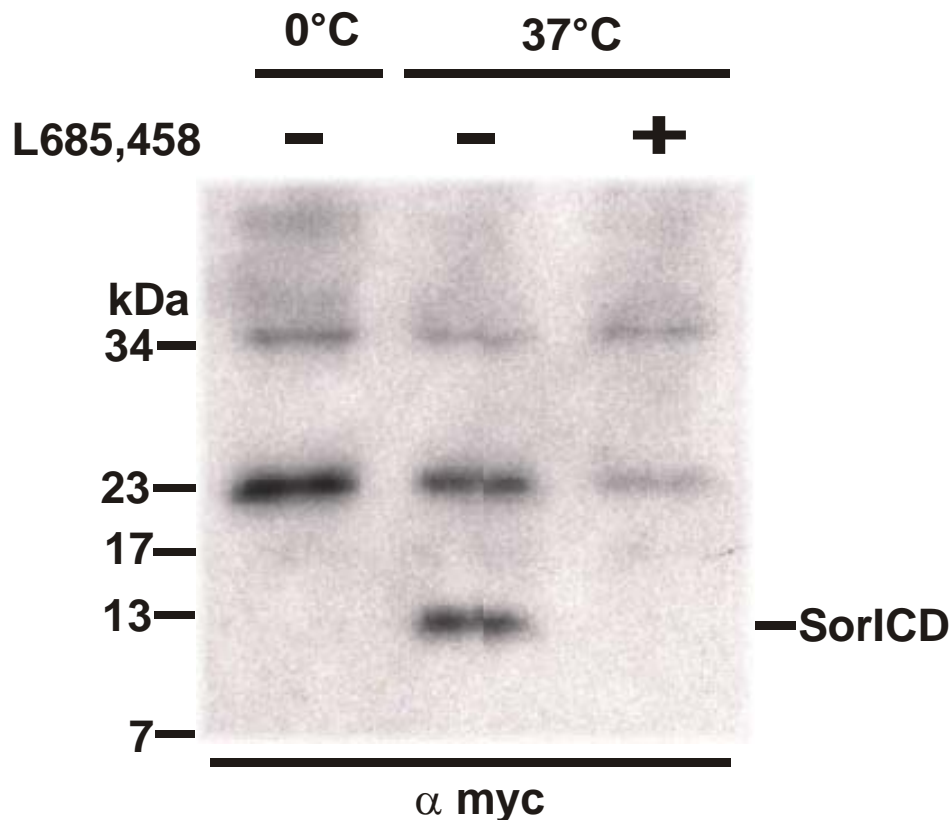


Abb. 3-6. SorLA-Stub-tags im in vitro- γ -Secretaseexperiment

Membranen von HEK-Zellen stabil transfiziert mit Wildtyp-Presenilin und pStub-tags wurden präpariert. Die Membranen wurden mit (+) und ohne (-) 1 μ M L685,458 bei 37°C 2 h lang inkubiert. Eine Probe wurde auf Eis (0°C) belassen. Der nach Ultrazentrifugation gewonnene Überstand wurde in einem Tris/Tricine-Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion von SorLAs Intrazellulärdomäne (SorICD) erfolgte nach einem Western-Blot mit einem monoklonalen myc-Antikörper.

3. Ergebnisse

Von HEK-Zellen, die stabil mit Wildtyp-Presenilin und pSorLA-Stub-tags transfiziert wurden, wurden Membranen isoliert. Diese wurden dann mit oder ohne γ -Secretase-Inhibitor inkubiert und anschließend die Bildung von SorLAs Intrazellulärdomäne (SorICD) im Western-Blot mit einem an den C-terminalen Tag bindenden myc-Antikörper kontrolliert. Die bei 37°C inkubierten Membranen setzen ein ca. 13 kDa großes lösliches Fragment frei, das in der Größe SorICD entspricht. Sowohl bei 0°C, als auch nach Gabe von L685,458, einem weiteren γ -Secretase-Inhibitor, kann dieses Fragment nicht beobachtet werden. Ebenso wie bei APP hängt die Freisetzung somit von der γ -Secretase ab. Weitere Banden bei 23 und 34 kDa scheinen auf unspezifischen Interaktionen zu beruhen. Die Analyse im Western-Blot mit einem SorLA-spezifischen Antikörper für die intrazelluläre Domäne (α SorLAcp) ergibt ein ähnliches Bild (Abb. 3-7).

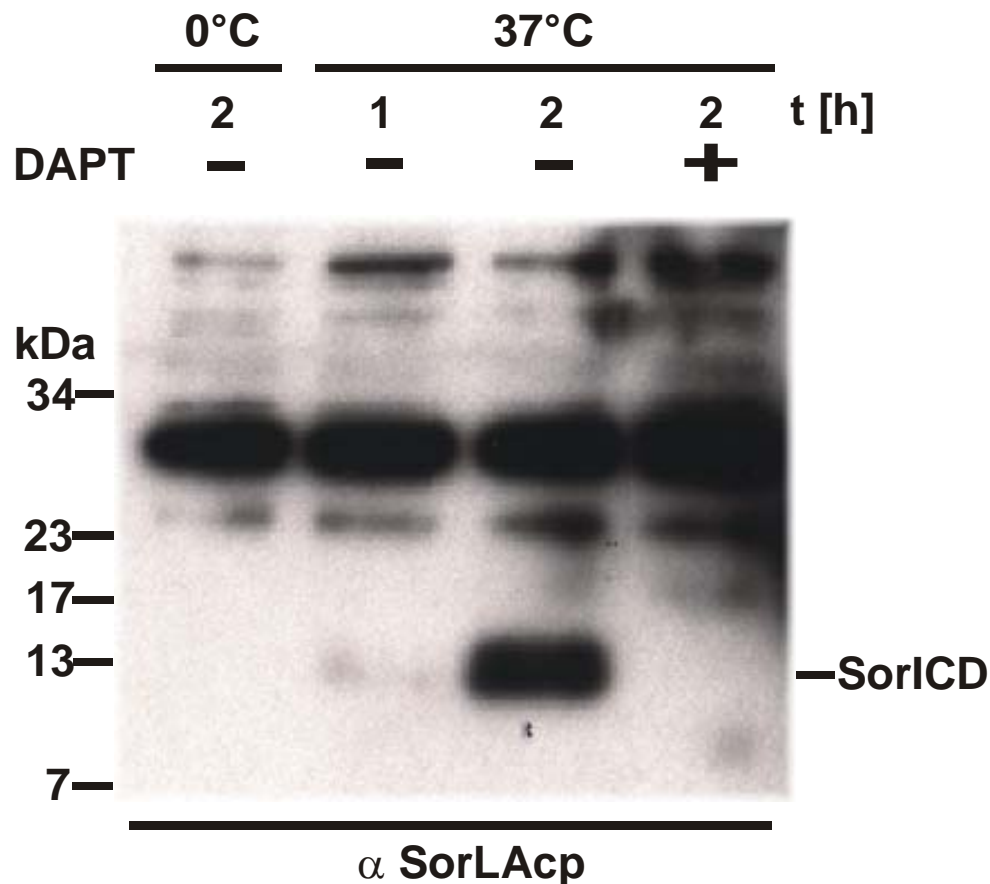


Abb. 3-7. Zeitabhängige Bildung von SorICD im in vitro- γ -Secretaseexperiment

Isolierte Membranen von SorLA-Stub-tags exprimierenden HEK-Zellen werden bei 0°C oder 37°C mit (+) oder ohne (-) Inhibitor DAPT für die angegebene Zeit inkubiert. Freigesetzte Proteine werden von membranständigen durch Ultrazentrifugation getrennt. Der Überstand wird im Western-Blot mit α SorLAcp analysiert. SorICD – SorLAs Intrazellulärdomäne.

3. Ergebnisse

Zeitabhängig nimmt die Menge an gebildetem SorICD zu. Nach einstündiger Inkubation der Membranen ist nur eine schwache Bande auf Höhe des zu erwartenden SorICDs zu finden. Nach zwei Stunden bei 37°C hat sich dagegen schon eine große Menge SorICD gebildet.

Bei 0°C sowie unter Einfluss von DAPT wird kein 13-kDa-Fragment beobachtet. Auch bei Verwendung des SorLAcp-Antikörpers zeigen sich unspezifische Banden bei höherem Molekulargewicht. Diese Banden sind nicht durch verschleppte Membranreste zu erklären, da sie bei der Analyse der Membranen nicht auftraten (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe dieses *in vitro*- γ -Secretase-Experiment wurde die zeitabhängige Freisetzung der Intrazellulärdomäne von SorLA (SorICD) gezeigt. Durch Verwendung zweier γ -Secretaseinhibitoren wurde die Beteiligung des γ -Secretasekomplexes gesichert.

3.3 SorLA unter dem Einfluss von Presenilin

3.3.1 SorLA und PS D385N

Bisher wurden Experimente zu SorLA-Stub(-tags) vorgestellt. Physiologisch interessant ist jedoch die Prozessierung von SorLA-Volllänge (SorLA). Um dies zu untersuchen wurden HEK-Zellen sowohl mit SorLA-cDNA als auch mit PS wt oder der dominant negativen Mutante PS D385N stabil transfiziert. SorLA wird in geringer Menge in den HEK-Zellen exprimiert (Abb.3-8). Der Membranrest nach dem Shedding-Prozess, quasi natürliches SorLA-Stub, ist bei ca. 15 kDa zu detektieren. Nach Zugabe des Inhibitors DAPT kommt es sowohl beim SorLA-Stub als auch beim SorLA-Rezeptor zu einem Anstieg der Proteinmenge.

3. Ergebnisse

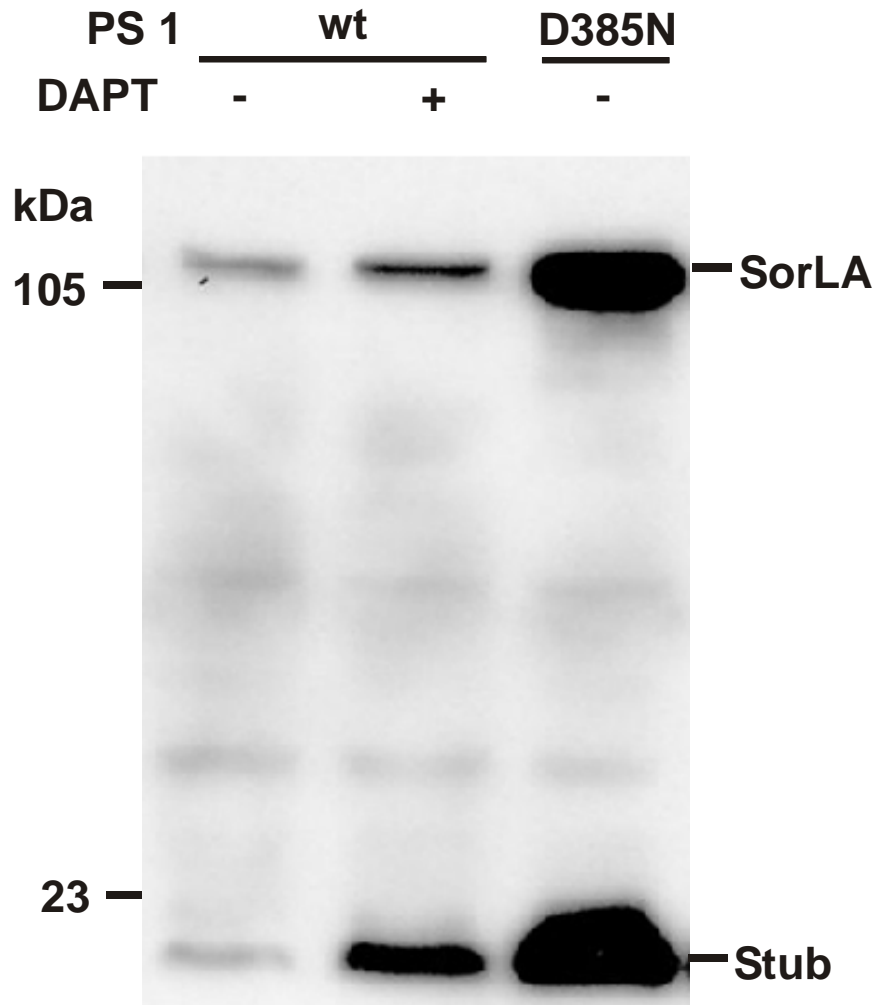


Abb. 3-8. Einfluss von Presenilin auf SorLA

SorLA und Wildtyp-Presenilin (PS1 wt) oder PS1 D385N exprimierende HEK-Zellen wurden in An-(+) oder Abwesenheit (-) von 5 μ M DAPT 15 h lang inkubiert. Anschließend wurden Zelllysate präpariert und gleiche Mengen Gesamtzellprotein in einem 10%-Läemli-Gel aufgetrennt. Die Detektion nach einem Western-Blot erfolgte mit dem SorLAcp-Antikörper.

Bei Zellen, die die dominant negative Mutante PS D385N stabil exprimieren, sind sowohl SorLA-Stub, als auch reifes SorLA noch deutlicher erhöht. Der Anstieg auch an SorLA-Rezeptorkonzentration nach Hemmung der γ -Secretaseaktivität ist ungewöhnlich und nur durch eine Art Rückkopplung zu erklären.

3. Ergebnisse

Die Konzentration des Stub-Restes in den Presenilin-Wildtypzellen ist niedrig. Häufig war SorLA-Stub nur nach Inhibierung der γ -Secretase in PS wt-Zellen zu detektieren (siehe Abb. 3-9).

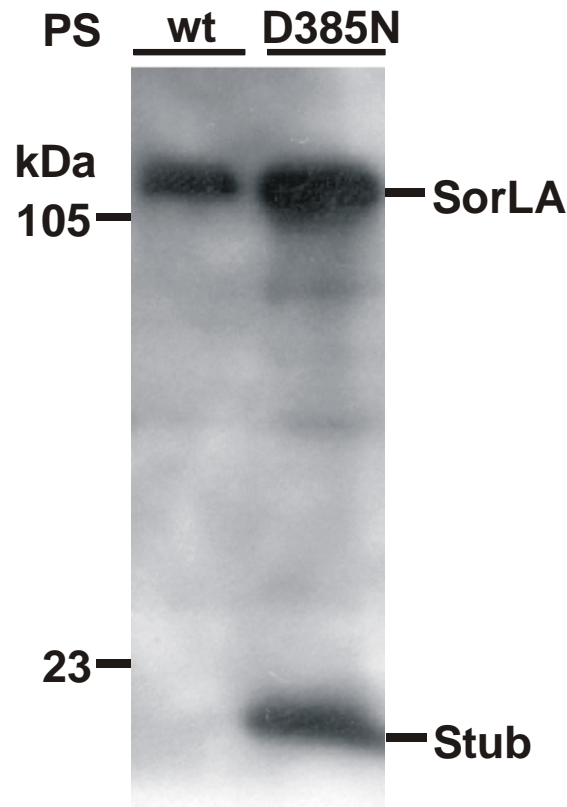


Abb. 3-9. Fehlendes SorLA-Stub in Presenilin Wildtyp-Zellen

Zelllysate aus SorLA und Wildtyp-Presenilin (PS wt) oder PS D385N exprimierenden HEK-Zellen wurden präpariert. Identische Mengen Gesamtzellprotein wurden in einem 10%-Läemli-Gel aufgetrennt und in einem Western-Blot mit α SorLAcp analysiert.

In diesem Beispiel ist in den Presenilin-Wildtyp-Zellen zwar deutlich SorLA-Volllänge, aber keinerlei Stub-Rest nachzuweisen. Erst durch Expression der dominant negativen Presenilinmutante (D385N) tritt eine im Western-Blot eindeutig zu identifizierende Menge an SorLA-Stub auf. Das Verhältnis vom Volllänge-Protein SorLA zu dem Shedding-Produkt SorLA-Stub scheint komplex reguliert und von identischen Bedingungen in der Zellkultur abhängig zu sein.

3. Ergebnisse

3.3.2 SorLA in Presenilin-knock-out-Zellen

Um weiter die Beteiligung von Presenilin an der SorLA-Prozessierung zu zeigen, wurden auch in Versuchen mit SorLA-Volllänge PS-defiziente MEF-Zellen eingesetzt. Hierzu wurden sowohl MEF-Wildtyp-Zellen als auch Presenilin-knock-out-Zellen mit SorLA-tags transient transfiziert (Abb. 3-10).

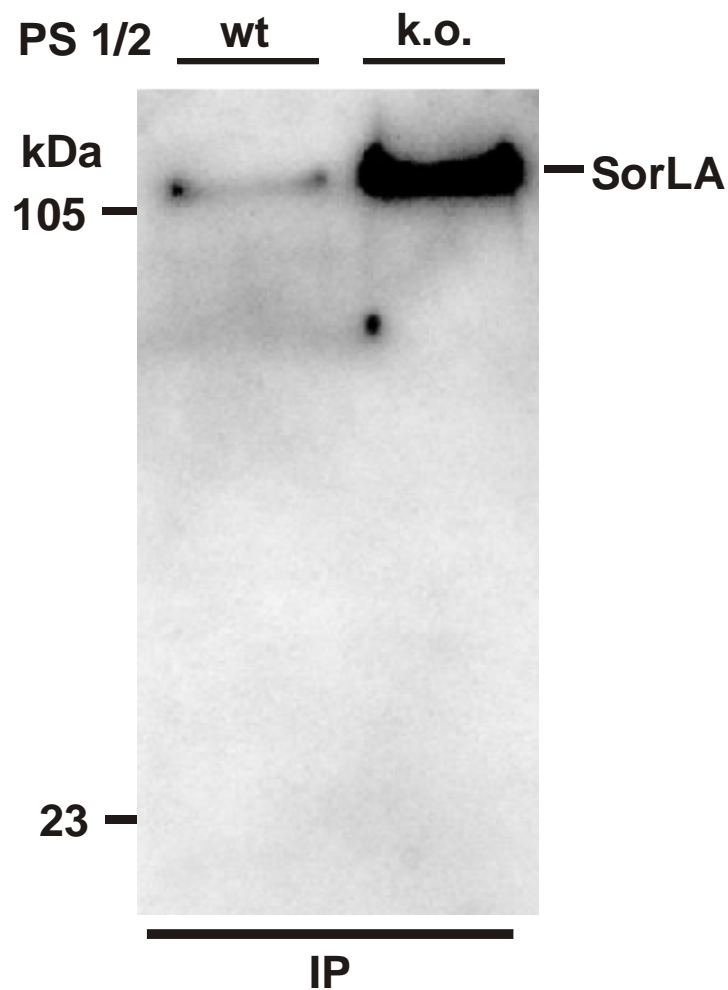


Abb. 3-10. Reifes SorLA in Presenilin-defizienten Zellen

MEF-Wildtyp-Zellen (wt) und MEF-Presenilin1/2-knock-out-Zellen (k.o.) wurden mit pSorLA-tags transfiziert, 48 h in Kultur gehalten und lysiert. Identische Proteinmengen wurden einer Immunpräzipitation (IP) mit α SorLAcp gebunden an Protein-A-Sepharose unterzogen. Das Präzipitat wurde in einem 10%-Läemli-Gel aufgetrennt und in einem Western-Blot mit α myc analysiert.

3. Ergebnisse

Auch in diesem Zellsystem reichert sich SorLA-Volllänge an sobald die Funktion des Presenilin eingeschränkt wird. Während der MEF-Wildtyp (wt) auch nach Immunpräzipitation mit einem SorLA-spezifischen Antikörper nur wenig SorLA-Volllänge zeigt, ist die entsprechende Bande beim Presenilin-knock-out (k.o.) hervorstechend. Überraschenderweise kann man weder beim Wildtyp noch bei den k.o.-Zellen SorLA-Stub detektieren. Obwohl die Menge SorLA-Stub als direktes Substrat für das Presenilin eher noch als die für SorLA-Volllänge ansteigen sollte, ist kein Stub-Rest in den Zelllysaten zu finden. Einige Zelltypen zeigen eine sehr geringe Shedding-Aktivität, so dass die Menge an Stub-Rest verschwindend gering sein kann. Möglicherweise ist das bei MEF-Zellen der Fall und die Menge an Stub-Rest ist auch nach Anreicherung in k.o.-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. Der in Kapitel 3.3.1 erwähnte Rückkopplungsmechanismus für das Volllängeprotein SorLA scheint aber auch hier aktiv zu sein.

3.4 Endogenes SorLA in NT2-Zellen

Alle bisher gezeigten Versuche beruhten auf Zellsystemen, die das jeweils interessierende Protein überexprimieren. Überexprimierte Proteine insbesondere in Kombination mit ebenfalls überexprimierten Proteasen können zu Artefakten im proteolytischen Muster führen. Aus diesem Grund wurde die Prozessierung von endogenem SorLA in NT2-Zellen durch Zugabe des γ -Secretase-Inhibitor DAPT untersucht. Im Gegensatz zu den überexprimierten Zellen, die einer Zellyse (2.3.4) unterzogen wurden, mussten in diesem Versuch Membranen der NT2-Zellen ähnlich wie im *in vitro*- γ -Secretasetest (2.4.2) gewonnen werden. Nach einer regulären Zellyse wäre die Konzentration an endogenem SorLA im Lysat zu gering. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den resuspendierten Membranen ist auf Grund der geringeren Volumina fehlerbehafteter als das bei Zelllysaten der Fall wäre, aber zwei unabhängige Versuche führten zu einem identischen Ergebnis (Abb. 3-11).

3. Ergebnisse

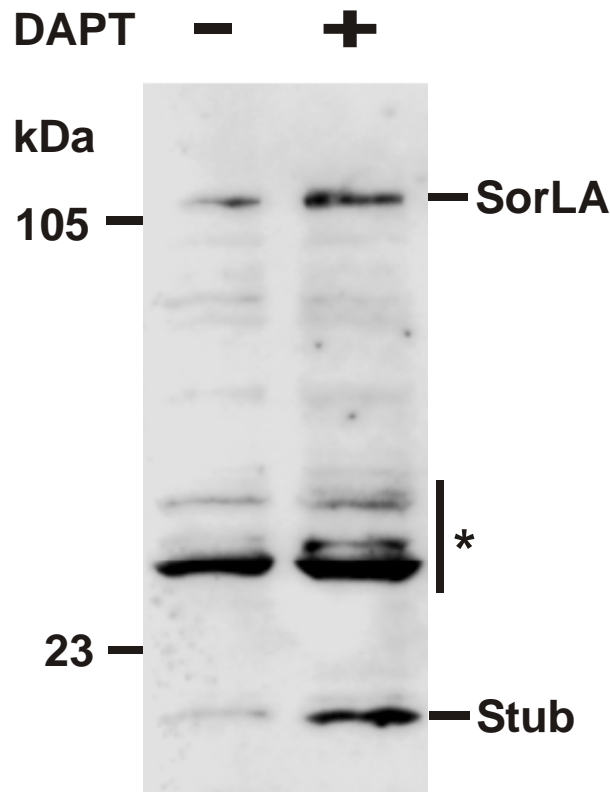


Abb. 3-11. Einfluss von DAPT auf endogenes SorLA in NT2-Zellen

NT2-Zellen wurden 15 h lang mit (+) oder ohne (-) 5 mM DAPT kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellmembranen präpariert und resuspendiert. Identische Mengen an Gesamtprotein jeder Probe wurden in einem denaturierenden 10%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und in einem Western-Blot mit α SorLAcp analysiert.

Der * kennzeichnet unspezifische bzw. nicht identifizierte Proteinbanden. SorLA – SorLA-Volllänge; Stub – membranständiger SorLA-Stub

Eine bemerkenswerter Anstieg an SorLA-Stub ist nach Inkubation der Zellen mit DAPT zu erkennen. Während in der unbehandelten Probe nur äußerst wenig SorLA-Stub zu finden ist, zeigen die isolierten Membranen der Inhibitor-behandelten Zellen im Western-Blot ein deutliches Signal. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da hiermit gezeigt wird, dass auch endogenes SorLA von der γ -Secretase prozessiert wird. Wie in den zuvor beschriebenen Experimenten mit überexprimiertem SorLA steigt auch hier die Konzentration an SorLA-Volllänge während einer DAPT-Behandlung der Zellen an (Abb. 3-8; 3-9; 3-10).

3. Ergebnisse

3.5 mRNA-Level nach Behandlung der Zellen mit DAPT

Wie bereits beschrieben steigt nach Behandlung mit einem γ -Secretase-Inhibitor nicht nur die Konzentration des direkten γ -Secretase-Substrates SorLA-Stub an, sondern auch von SorLA-Volllänge. Dies konnte sowohl in SorLA-überexprimierenden Zellen (Abb. 3-8; 3-9; 3-10), als auch an endogenem SorLA in NT2-Zellen (Abb. 3-11) gezeigt werden. Es muss bei gehemmter γ -Secretase eine Art Kopplung zwischen der reduzierten Menge SorICD (oder erhöhter SorLA-Stub-Konzentration) und der SorLA-Expressionsrate geben. Um die Art dieser Kopplung zu analysieren, wurden die mRNA-Level von SorLA in DAPT-behandelten und unbehandelten Zellen in einer semiquantitativen PCR verglichen (Abb. 3-12).

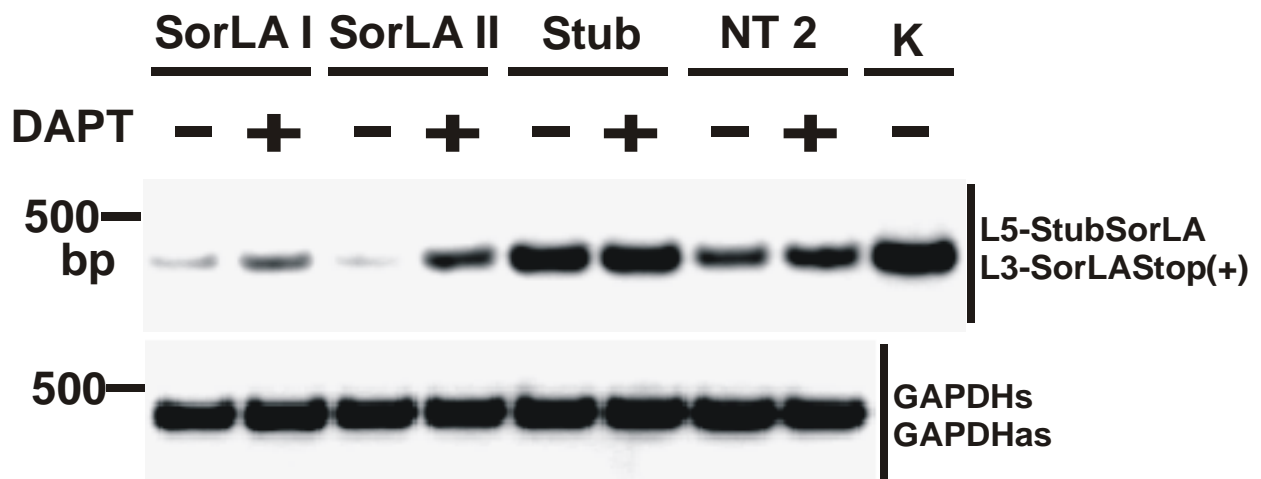


Abb. 3-12. Einfluss von DAPT auf die mRNA-Konzentration von SorLA bzw. SorLA-Stub

Die Zellen (HEK-Zellen stabil transfiziert mit Presenilin und pSorLA oder pStub-tags und NT2-Zellen mit endogenem SorLA) wurden 15 h lang mit (+) oder ohne (-) 5 mM DAPT behandelt. Nach der Inkubation wurde die mRNA der Zellen präpariert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase und Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Der Gehalt an gewonnener cDNA wurde bestimmt und normalisiert. In einer PCR wurde die cDNA vervielfältigt und in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Es wurden als Primerpaare sowohl L5-StubSorLA/L3-SorLAsStop(+) zur Amplifizierung der SorLA(-Stub)-cDNA als auch GAPDHs/GAPDHs zur Amplifizierung des „Housekeeping“-Gens GAPDH eingesetzt. Zur (K)ontrolle der PCR wurde in einem Ansatz 10 ng pSorLA eingesetzt.

3. Ergebnisse

In zwei unabhängigen Experimenten (SorLA I und II) mit HEK-Zellen, die SorLA-Volllänge stabil exprimieren, kann man sehen, dass die Menge an SorLA-PCR-Produkt nach DAPT-Behandlung deutlich gestiegen ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Obwohl dieses Experiment nur semiquantitativ und kaum genügend zum Vergleich der möglicherweise unterschiedlichen mRNA-Level ist, lässt sich aus diesen beiden Experimenten auf eine erhöhte SorLA-mRNA-Menge in Zellen mit inhibierter γ -Secretase schließen. Dieser Effekt ist wenn auch in geringerem Maße an endogenem SorLA aus NT2-Zellen beobachten. Auch hier scheint der SorLA-mRNA-Gehalt nach Inkubation mit DAPT anzusteigen. Auffälligerweise kann man dies nicht beobachten bei Zellen, die statt SorLA-Volllänge nur SorLA-Stub exprimieren. Hier kann man, wie bei der als Kontrolle aus denselben cDNA-Proben amplifizierten GAPDH-DNA, keine Unterschiede mit oder ohne DAPT feststellen. Dies lässt Rückschlüsse auf den Mechanismus zu. Einerseits kann man einen Transkriptions-regulierten Mechanismus ausschließen, da auf den jeweiligen transfizierten SorLA-Plasmiden, die meisten endogenen regulativen Elemente und Promotoren fehlen, andererseits scheint der für die Kopplung verantwortliche Faktor auf die SorLA-mRNA direkt einzuwirken, da die deutlich kürzere Stub-mRNA nicht reguliert zu sein scheint. So ist die erhöhte Menge an SorLA-Volllänge in DAPT-behandelten Zellen wahrscheinlich auf die gestiegene mRNA-Stabilität zurückzuführen. Ob freigesetztes SorICD in unbehandelten Zellen direkt die Stabilität der eigenen mRNA reduziert oder ein komplexerer Weg gewählt wird, kann erst in zukünftigen Experimenten beantwortet werden.

3.6 Detektion des A β -Äquivalents von SorLA (Sor β)

Die Freisetzung der Intrazellulärdomäne von SorLA konnte mit Hilfe des *in vitro*- γ -Secretasetests gezeigt werden. Interessant ist nun die Frage, ob das N-terminal von der γ -Secretase-Schnittstelle gelegene Fragment ebenfalls freigesetzt wird. In Analogie zum A β des APPs wurde dieses Fragment Sor β genannt. Da passende Antikörper für den extrazellulären Teil von SorLA fehlen, musste ein geeigneter Vektor für ein mit Tag modifiziertes SorLA kloniert werden. Hierzu wurden für einen Flag-Tag kodierende Primer vor der SorLA-Stub-

3. Ergebnisse

Sequenz eingefügt. Dieser Tag konnte nun genutzt werden, um Sor β zu präzipitieren und detektieren.

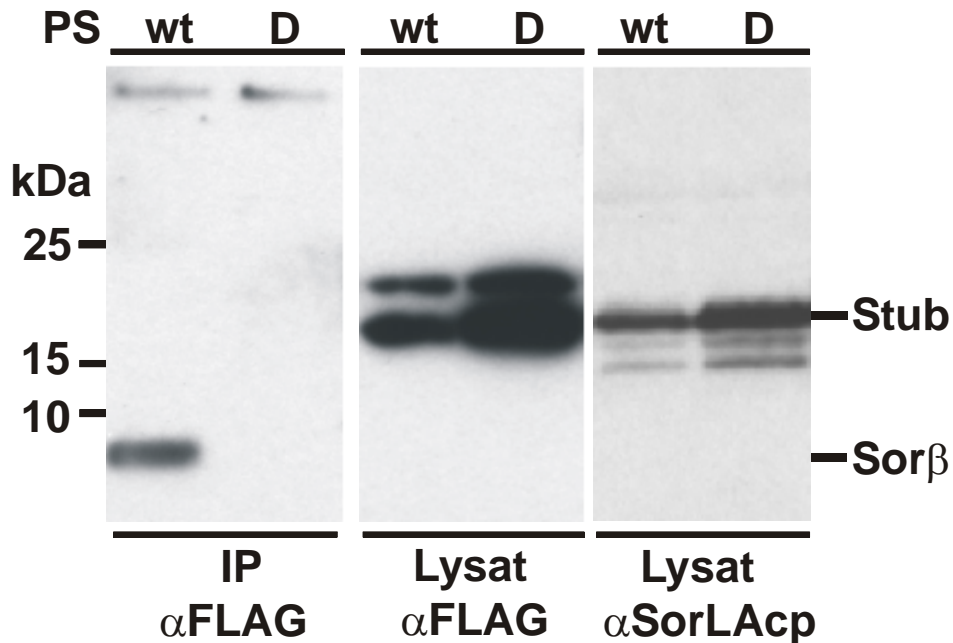


Abb. 3-13. Immunpräzipitation und Detektion des Sor β

HEK-Zellen (stabil transfiziert mit Presenilin (PS) Wildtyp (wt) oder D385N(D)) wurden transfiziert mit pFLAG-Stub-tags. Nach 72 h wurde das Zellmedium abgenommen und das FLAG-tag-tragende Sor β mit FLAG-Agarose präzipitiert (siehe 2.2.3). Die verbleibenden Zellen wurden lysiert (siehe 2.3.4). Immunpräzipitiertes Sor β und die aufs Gesamtprotein normalisierten Zelllysate wurden in einem 4-12 % Bis/Tris-Gradientengel aufgetrennt und mit dem angegebenen Antikörper (α FLAG oder α SorLAcp) in einem Western-Blot analysiert. IP – Immunpräzipitation mit α FLAG-Agarose; Stub – FLAG-SorLA-Stub

In Abb. 3-13 wird die Präzipitation des extrazellulär freigesetzten Sor β dargestellt. Aus dem Zellkulturüberstand von Zellen, die mit pFLAG-Stub transfiziert wurden und zusätzlich Wildtyp-Presenilin exprimieren, kann ein Fragment mit ca. 7 kDa mit einem FLAG-Antikörper präzipitiert werden. Dieses Fragment fehlt im Überstand von Zellen, die statt Wildtyp-Presenilin die dominant negative Mutante Presenilin D385N produzieren. Das präzipitierte Fragment wird also γ -Secretase-abhängig freigesetzt und von einem FLAG-Antikörper erkannt und entspricht damit dem gesuchten Sor β . Das Ursprungprotein für das

3. Ergebnisse

Sor β , FLAG-Stub-tags, ist wie Stub-tags ebenfalls abhängig von der γ -Secretase (siehe Abb. 3-3). Werden die Zelllysate im Western-Blot mit α FLAG analysiert, so zeigt sich eine prominente Bande um die 22 kDa, deren Molekulargewicht etwas höher ist als das bei SorLA-Stub. Diese Bande zeigt FLAG-SorLA-Stub, das sich ebenso wie SorLA-Stub in der Membran anreichert, sobald Presenilin D385N exprimiert wird. Über dieser hervorstechenden Bande befindet sich eine zweite, die aber wohl auf eine unspezifische Reaktion des Antikörpers zurückzuführen ist, da auch untransfizierte HEK-Zellen diese Bande aufweisen (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise ist diese Bande auch etwas stärker in der PS D-Probe. Auf Grund dessen wurde die Proteinbestimmung zweimal wiederholt, aber die Menge an Gesamtzellprotein in den beiden Proben (PS wt, PS D) war identisch.

Mit α SorLAc_p statt dem FLAG-Antikörper wird FLAG-SorLA-Stub ebenso zuverlässig detektiert, aber unterhalb der auffälligen Bande finden sich noch zwei weitere Banden. Diese beiden Proteine sind ebenso wie FLAG-SorLA-Stub in größerer Konzentration nach Hemmung der γ -Secretase (PS D) zu finden. Möglicherweise sind daher die beiden Proteine N-terminal verkürzte Fragmente hervorgegangen aus FLAG-SorLA-Stub. Durch die N-terminale Verkürzung würde der FLAG-Tag wegfallen und das erklärt warum diese Banden durch α FLAG nicht detektiert werden.

3.7 Lokalisierung des SorICDs

Wie bei Notch könnte die freigesetzte cytoplasmatische Domäne von SorLA nach γ -Secretaseschnitt an einer Signaltransduktion beteiligt sein. In Falle von Notch wandert die Intrazellulärdomäne (NICD) in den Zellkern, bindet direkt an Transkriptionsfaktoren der „C promotor binding factor/ Supressor of Hairless/ Lag-1“ (CSL)-Familie und kontrolliert somit die Transkription von Zielgenen (Selkoe and Kopan, 2003). Eine Sequenzanalyse von SorLAs kurzer cytoplasmatischer Domäne durch das Programm PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) ergab eine putative Kernlokalisierungssequenz (NLS) kurz hinter der Transmembrandomäne.

3. Ergebnisse

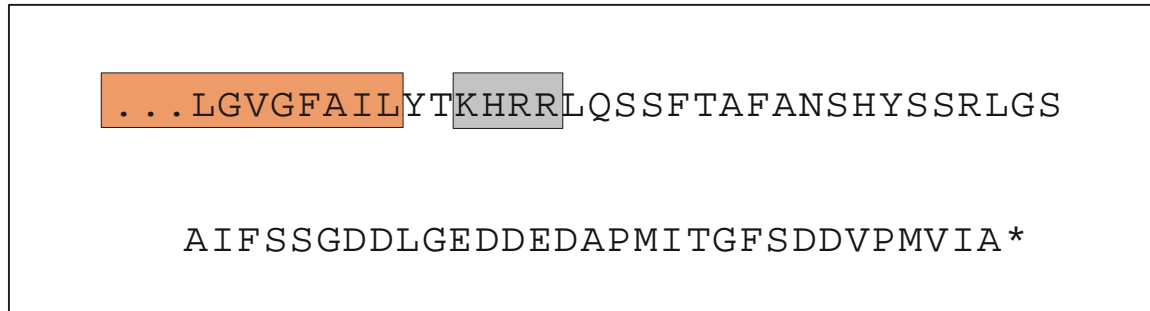


Abb. 3-14. Aminosäuresequenz der Intrazellulärdomäne von SorLA

In orange wird das Ende der Transmembrandomäne dargestellt. Grau unterlegt ist das mögliche Kernlokalisierungssignal, gefunden durch PSORT II.

Da gerade *in silico*-Vorhersagen für Kernlokalisierungssignale ob der geringen Sequenzspezifität nur dürftige Aussagen zulassen, ist ein experimenteller Ansatz unumgänglich. Hierzu wurde die Lokalisierung des interessierenden Proteins mit intaktem NLS mit der Lokalisierung des Proteins mit mutierten, funktionsunfähigen NLS verglichen. Zuerst wurde ein Vektor kloniert, der für ein Fusionsprotein aus SorLAs Intrazellulärdomäne C-terminal hinter EGFP kodiert. Dann wurde durch zielgerichtete Mutagenese das mögliche NLS von **KHRR** zu **KHAA** abgeändert (2.1.8).

Durch Fluoreszenzmikroskopie konnten dann die beiden in COS-Zellen exprimierten Konstrukte EGFP-SorICD und EGFP-MutSorICD sichtbar gemacht werden (Abb. 3-15).

3. Ergebnisse

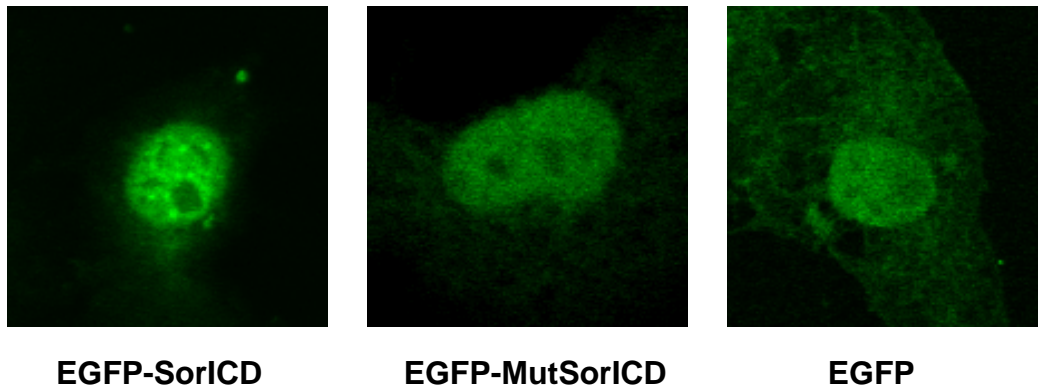


Abb. 3-15. Lokalisierung des SorICD in COS-Zellen

COS-Zellen wurden transfiziert mit pEGFP, pEGFP-MutSorICD oder pEGFP-SorICD, 48 h später fixiert und im konfokalen Mikroskop (63x Ölimmersions-Objektiv) ausgewertet. Jeweils zentral ist der Zellkern einer exemplarischen Zelle zu sehen.

Es wird deutlich, dass nur das Konstrukt EGFP-SorICD mit dem Wildtyp-NLS, eine deutliche Kernfluoreszenz aufweist. Das Konstrukt mit mutierter Kernlokalisierungssequenz ist zu einem geringeren Anteil im Kern der COS-Zelle zu sehen, während EGFP alleine im Vergleich zum Cytoplasma ein kaum stärkeres Signal im Nukleus zeigt.

Aufgrund der geringen Größe des EGFPs ist dieses auch ohne Kernlokalisierungssignal in der Lage in den Zellkern einzuwandern. Vorhergehende Versuche in denen anstelle von EGFP ein myc-Tag zu finden war, scheiterten an der geringen Stabilität des Hybrid-Proteins, das wie das unmodifizierte SorICD in der Immunfluoreszenz nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Um eine zuverlässige Aussage über das SorLA-NLS zu erhalten wurde zusätzlich zu der rein optischen Analyse bei den EGFP-Konstrukten das Verhältnis der Fluoreszenz im Kern zu der im Cytoplasma (N/C) statistisch ausgewertet (Abb. 3-16).

3. Ergebnisse

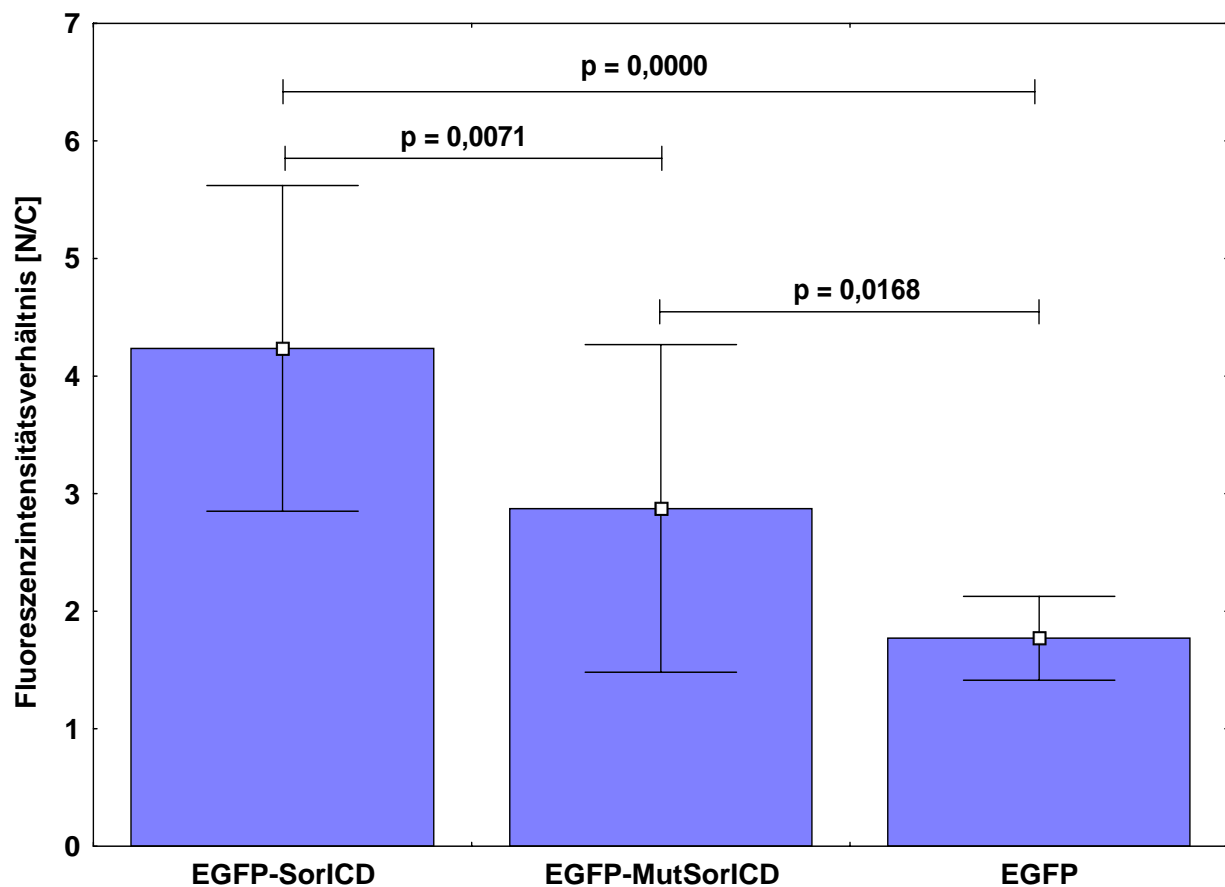


Abb. 3-16. Statistische Auswertung der SorICD-Lokalisierung

Zellen wurden wie in Abb. 3-15 präpariert. In zwei unabhängigen Blindversuchen wurde das Verhältnis von cytoplasmatischer Fluoreszenz zu Kernfluoreszenz in einem definierten Bereich gebildet. Jeweils ca. 30 Zellen pro Konstrukt (pEGFP, pEGFP-SorICD und pEGFP-MutSorICD) wurden so analysiert. Die Auswertung erfolgte über das Programm Statistica in einem Students-t-test.

Der Unterschied in der N/C-Verteilung zwischen EGFP-MutSorICD und EGFP-SorICD ist hochsignifikant. Bei EGFP-SorICD ist 4-5 mal mehr Fluoreszenz im Kern anzutreffen als im Cytoplasma. Damit ist der Fluoreszenzquotient mehr als doppelt so groß wie der Wert für EGFP allein. EGFP-MutSorICD weist einen 1,5-fach niedrigeren als der Wildtyp EGFP-SorICD auf. Trotz Mutation im NLS liegt immer noch deutlich mehr EGFP-MutSorICD im Kern vor, als dies bei EGFP der Fall ist.

3. Ergebnisse

Möglicherweise wandert das SorICD im Komplex mit anderen NLS-tragenden Proteinen in den Kern oder das NLS ist nur ungenügend ausgeschaltet worden.

3.8 Proteolytischer Abbau des SorICDs

Wie bereits erwähnt sind die freigesetzten Intrazellulärdomänen der γ -Secretase-Substrate sehr instabil. Dies hat den Vorteil das Signale, die über diese Proteolysefragmente weitergegeben werden, stets regulierbar bleiben. Das NICD von Notch wird Ubiquitin-vermittelt im Proteasom degradiert (Lit). Das AICD des APP kann dagegen überraschenderweise durch das **Insulin degrading enzyme** (IDE) abgebaut werden (Edbauer et al., 2002). Das IDE ist extrazellulär lokalisiert und baut, wie der Name sagt, das Signalpeptid Insulin ab. IDE wird aber auch intrazellulär gefunden, wo es einige weitere Peptide als Substrat hat. Da das SorICD ebenso wie NICD und AICD ohne Proteaseinhibitoren sehr schnell abgebaut wird, kam die Frage auf, auf welcher Aktivität die Proteolyse beruht. In früheren Experimenten mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin wurde schnell klar, dass das SorICD durch Lactacystin nicht stabilisiert und damit wahrscheinlich auch nicht Proteasom-abhängig abgebaut wird (Daten nicht gezeigt). SorICD könnte daher ähnlich wie AICD auch über IDE abgebaut werden. Durch das leicht zugängliche Insulin war zusätzlich ein spezifischer Inhibitor für das Experiment gegeben. Für den Test auf IDE-Proteolyse wurde zuerst in einem *in vitro*- γ -Secretase-Experiment eine größere Menge SorICD produziert. Dieses wurde dann aliquotiert und mit steigenden Mengen an spezifischem Inhibitor bzw. BSA versetzt (Abb. 3-17). Als Quelle für die unbekannt proteolytische Aktivität wurde den einzelnen Ansätzen eine definierte Menge an präpariertem Cytoplasma von NT2-Zellen zugesetzt, die SorLA endogen exprimieren. Cytoplasma gewonnen aus HEK-Zellen führt zu einem identischen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

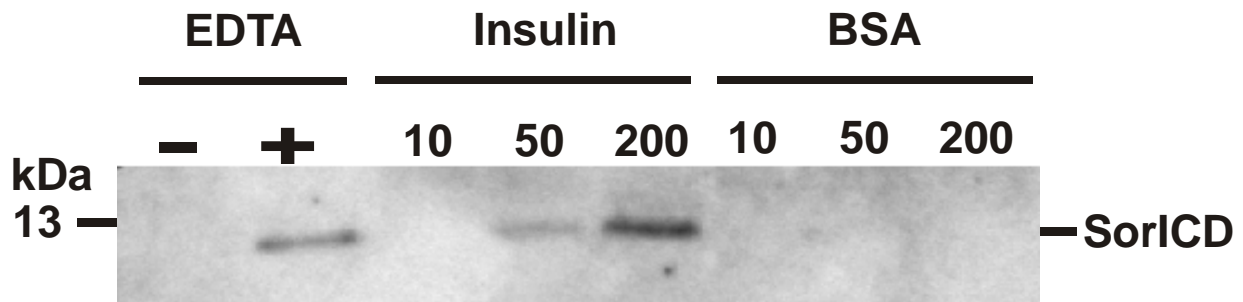


Abb. 3-17. Abbau des SorICD

SorICD wurde in einem *in vitro*- γ -Secretasetest hergestellt. Das SorICD wurde durch Ultrazentrifugation von den Membranen abgetrennt und in 20 μl -Proben aliquotiert. Zu den einzelnen Proben wurden die Inhibitoren Insulin, BSA und EDTA in steigenden Konzentrationen (10, 50, 200 $\mu\text{g/ml}$; EDTA (+) 5 mM) verdünnt in 5 μl NT2-Cytosol zugesetzt. Anschließend wurden die Proben 2 h bei 37°C inkubiert, in einem 4-12 % Bis/Tris-Gradientengel aufgetrennt und über einen Western-Blot mit $\alpha\text{SorLAcP}$ detektiert.

Deutlich ist zu sehen, dass Insulin den Abbau des SorICD inhibiert. Konzentrationsabhängig ist bei Zugabe von 50 $\mu\text{g/ml}$ Insulin ein wenig SorICD nach Inkubation mit dem Cytoplasma übrig geblieben, während bei einer Insulin-Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Bande SorICD zu sehen ist. 10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin sind dagegen offensichtlich nicht ausreichend den Verdau des SorICDs zu stoppen. Bei BSA als unspezifischem Inhibitor ist bei keiner der drei Konzentrationen ein Rest SorICD verblieben. Daher scheint die Inhibierung spezifisch vom Insulin und nicht von einer Überladung mit Protein abhängig zu sein. Ohne Inhibitoren im Ansatz (-) wird SorICD vollständig abgebaut. Als Metalloprotease reagiert IDE empfindlich auf eine Zugabe von EDTA und in dieser Probe ist SorICD gut nachzuweisen. SorICD scheint somit wie AICD durch IDE degradierbar zu sein. Zur eindeutigen Bestätigung sind weitere Experimente nötig.

3. Ergebnisse

3.9 Transkriptionsaktivierung durch SorICD

Das SorICD ist in der Lage in den Nukleus einer Zelle zu gelangen. Daher besteht die Möglichkeit einer regulativen Funktion bei der Transkription von Zielgenen. Das SorICD ist zu kurz um aus sich heraus DNA zu binden und würde wahrscheinlich im Komplex mit anderen Proteinen wirken. Potentielle Zielgene sind bisher unbekannt, so dass zur Untersuchung der Transkriptionsaktivierung des SorICD auf ein artifizielles Konstrukt zurückgegriffen werden musste. Das SorICD wurde dazu in einen Vektor kloniert, der für eine Gal4-DNA-Bindedomäne, wie sie auch im Hefe-Dihybrid-System zur Anwendung kommt, kodiert (Abb. 3-18).

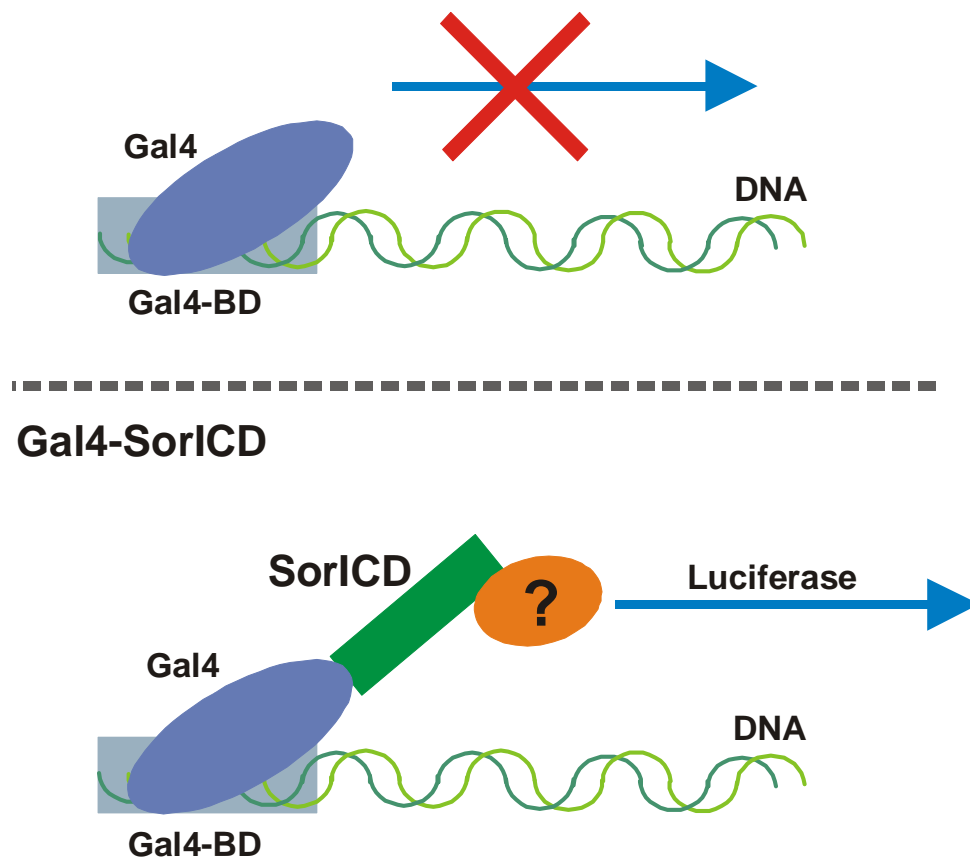


Abb. 3-18. schematischer Überblick über die Transkriptionsaktivierung

Die Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4) interagiert mit dem Promoter auf dem Reportervektor, kann ohne Aktivierungsdomäne die Transkription des Luciferasegens aber nicht einleiten. Bei einer Transkriptionsaktivierung durch Gal4-SorICD kann die Luciferase transkribiert werden. Gal4-BD – Bindestelle für Gal4 auf dem Reportervektor; SorICD – SorLAs Intrazellulärdomäne

3. Ergebnisse

Das exprimierte Gal4-SorICD rekrutiert unter Umständen weitere, von der Zelle bereitgestellte, Faktoren, um die Transkription eines Luciferase-Reporters zu initiieren. Die Luciferase ist dann in der Lage ihr Substrat umzusetzen und Licht zu emittieren, das im Luminometer gemessen werden kann (Abb. 3-19).

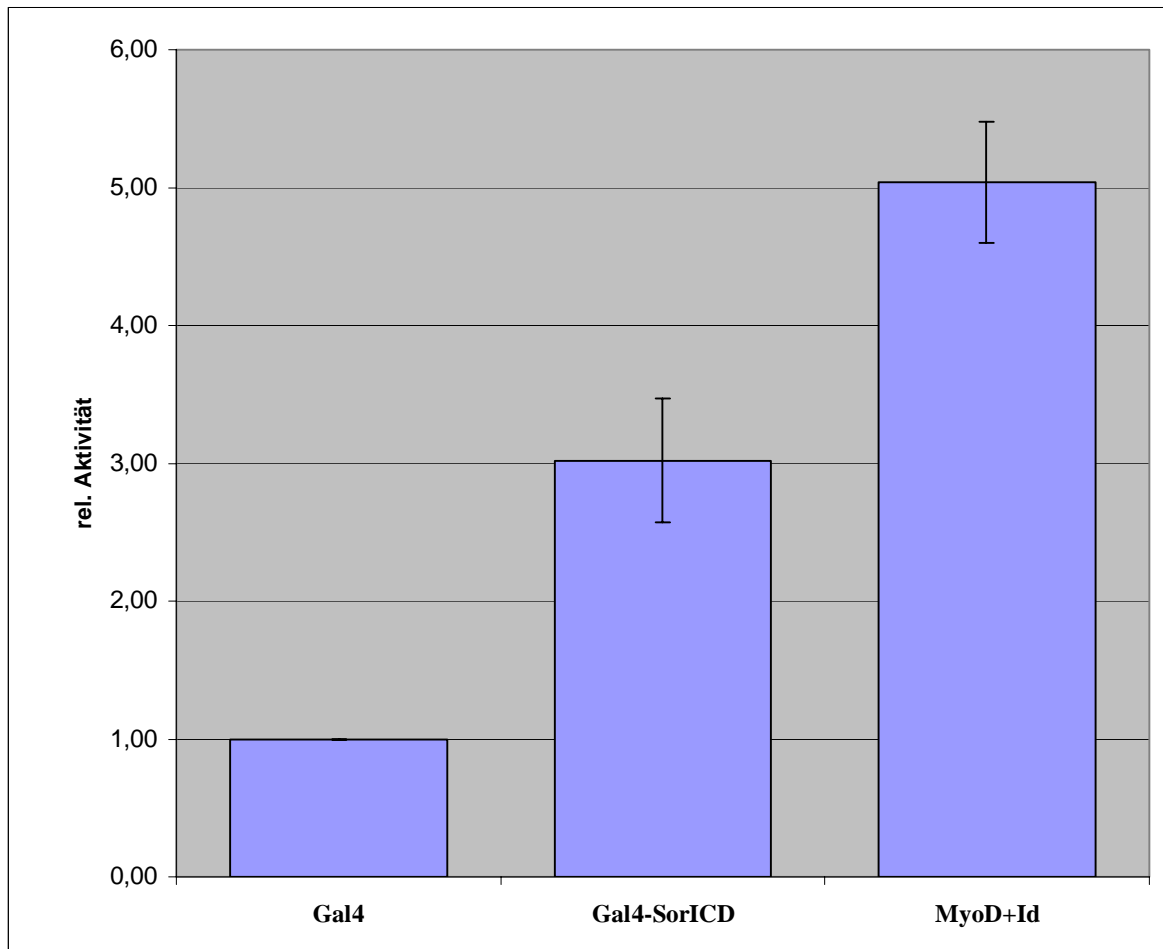


Abb. 3-19. Transkriptionsaktivierung von Gal4-SorICD

COS-Zellen wurden in 96-well-Platten ausplattiert und nach 15 h mit 0,2 µg/well des jeweiligen Konstruktes (Gal4 oder Gal4-SorICD) und 0,2 µg/well des Luciferase-Reporters transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen gewaschen und mit Bright-Glo (Promega) überschichtet. Nach 5 min Inkubation wurde die Intensität der Lichtreaktion im Luminometer vermessen. Alle Werte wurden ins Verhältnis gesetzt zu Gal4, dem die relative Aktivität 1,00 zugeordnet wurde. Die Ergebnisse beruhen auf Durchschnittswerten aus fünf unabhängigen Versuchen (MyoD+Id: zwei unabhängige Versuche). Gal4 – Gal4-DNA-Bindedomäne; Gal4-SorICD – Gal4-DNA-Bindedomäne mit C-terminalem Intrazellulärdomäne von SorLA; MyoD+Id – Positivkontrolle, bei der jeweils 0,2 µg/well Gal4-MyoD und VP16-Id transfiziert wurden.

3. Ergebnisse

Die Luciferase-Aktivität für das Gal4-SorICD-Konstrukt wurde zur Aktivität des Gal4-Konstrukts (Grundaktivität) ins Verhältnis gesetzt. Die Versuche zeigen eine dreifach erhöhte Luciferase-Aktivität für Gal4-SorICD im Vergleich zur Grundaktivität. Damit kann man auf eine, in dieser Versuchskonstellation, geringe transkriptionsaktivierende Wirkung des SorICDs schließen. Die Transfektion der Zellen mit Gal4-MyoD und VP16-Id, also die Gal4-DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne VP16 in Verbindung mit zwei bekanntermaßen interagierenden Proteinen MyoD und Id, führt zu einer fünffach erhöhten Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität. Die positive Kontrolle ist somit nicht deutlich stärker als Gal4-SorICD, wobei hier zu beachten ist, dass für die Kontrolle ein Konstrukt mehr erfolgreich transfiziert werden musste (Gal4-MyoD, VP16-Id und der Luciferase-Reporter). Die einzelnen Werte sind nicht normalisiert worden auf eine üblicherweise parallel durchgeführte Bestimmung der Transfektionsrate über zum Beispiel konstitutiv exprimierte β -Galactosidase, daher können die Werte untereinander noch etwas schwanken. Durch eine Variierung der Versuchsbedingungen über die Wahl des Konstrukts (N- statt C-terminalem SorICD) oder der DNA-Bindedomäne kann der transkriptionsaktivierende Effekt des SorICD wahrscheinlich noch herausgearbeitet werden. Ein in unserer Arbeitsgruppe durchgeführtes Hefe-Dihybrid-Experiment zur Identifizierung von Interaktionspartnern des SorICDs ergab einige Faktoren, die potentiell an Transkriptionsvorgängen beteiligt sein können. In diesem Test auf Transkriptionsaktivierung zeigten diese Faktoren bisher aber keine Stimulation (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Aufschlüsselung eines neuen Signalweges von SorLA. Die Frage war, ob der Typ-I-Membranrezeptor SorLA in der Lage ist, durch Proteolyse innerhalb der Transmembrandomäne signalaktive Fragmente ins Cytosol abzugeben. Die Fragestellung konzentrierte sich auf die γ -Secretase, einen Enzymkomplex, der fähig zur regulierten **Intramembranproteolyse (RIP)**. Die Zahl der γ -Secretase-Substrate wird laufend größer, aber bisher sind nur wenige dieser Substrate in ihrer Signalwirkung eindeutig vom γ -Secretase-Komplex abhängig, bzw. fehlt bei vielen Substraten die Zuordnung zu einer bestimmten Signalkaskade (Koo and Kopan, 2004). Das einzige Substrat mit einer klar umrissenen Funktion ist der Rezeptor Notch, bei dem sowohl die Ligandenstimulierung und die nachfolgende Regulierung bekannter Zielgene, als auch die RIP-Abhängigkeit dieses Prozesses eindeutig belegt wurde.

4.1 Etablierung SorLAs als γ -Secretase-Substrat

Aufgrund der schon erwähnten Gemeinsamkeiten SorLAs im Proteolysemuster mit bekannten γ -Secretase-Substraten wie Notch und APP wählte ich Untersuchungsmethoden, die auch schon bei der Untersuchung dieser Substrate zum Erfolg geführt haben.

Mit Ausnahme von E-Cadherin (Marambaud et al., 2002) kann keines der bisher bekannten Substrate als Volllänge-Protein umgesetzt werden. In einem vorausgehenden Schritt müssen die Proteine von ihrer Ektodomäne befreit werden. In diesem Shedding-Prozess wird durch eine Protease (zum Beispiel die Metalloprotease TACE) nahe der Membran die Außendomäne abgeschnitten. Dieser Vorgang kann reguliert sein, wie im Falle des Notch, wo TACE erst durch Bindung eines Liganden aktiviert wird (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000). Die dann in der Membran verbleibenden Reste (CTF – **C**-terminales **F**ragment) sind kurz genug, um von der γ -Secretase akzeptiert zu werden. Ein besonderer Effekt kann bei allen bisher untersuchten Substraten der γ -Secretase beobachtet werden. Wird die γ -Secretase gehemmt, so kommt es zu einer Anreicherung der CTFs in der Membran, da diese nicht mehr abgebaut werden können (Abb.4-1). Dieser Effekt wurde auch mit SorLA-Stub, dem künstlichen SorLA-CTF, beobachtet. Nach Inhibition der γ -Secretase durch DAPT steigt die Konzentration an SorLA-Stub in Zelllysaten stark an (Abb. 3-2).

4. Diskussion

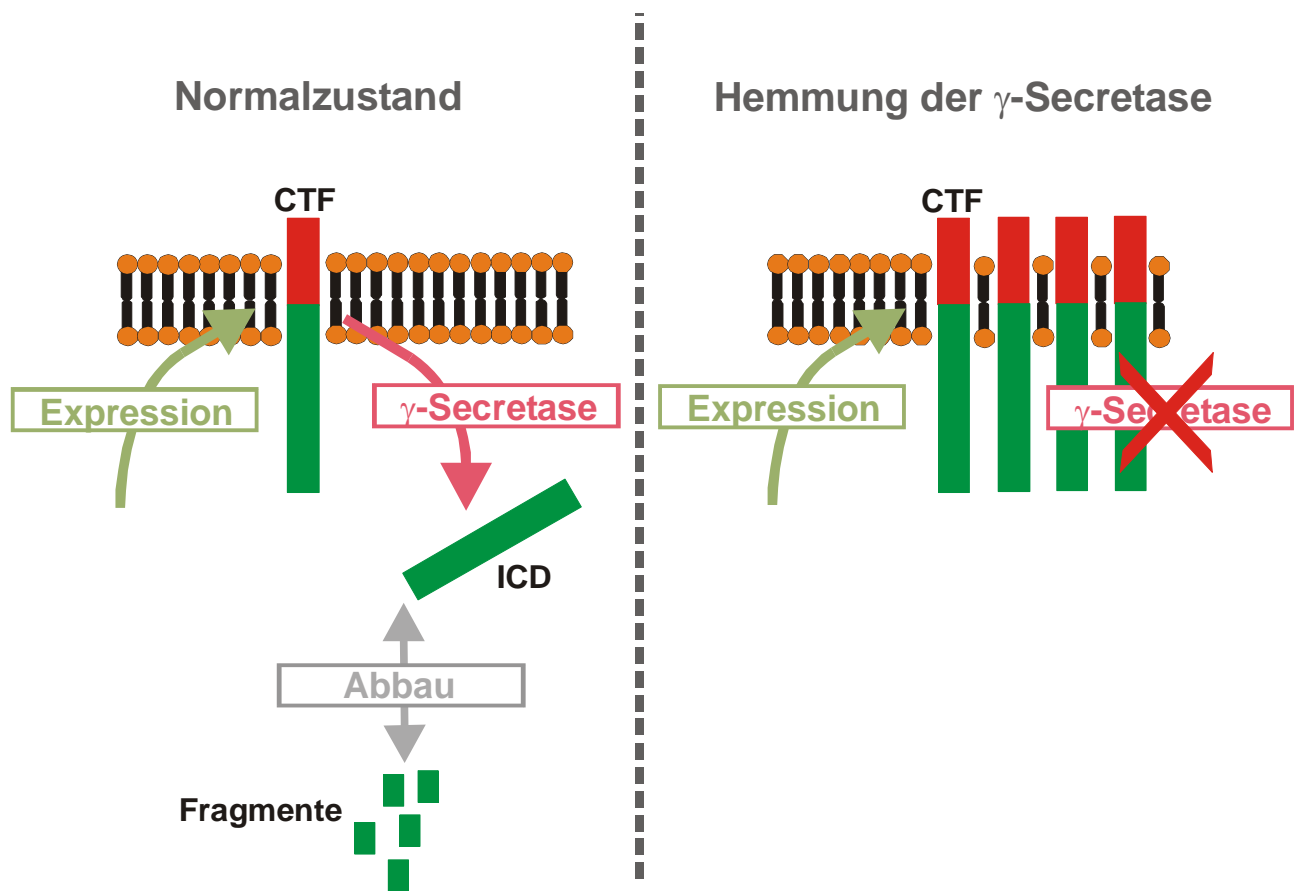


Abb. 4-1. CTF-Anreicherung in der Membran nach Hemmung der γ -Secretase

Nach Hemmung der γ -Secretase durch Inhibitoren, dominant negative Mutanten des Presenilin oder Knock-out kann das C-terminale Fragment (CTF) eines Typ-I-Transmembranproteins nicht mehr aus der Membran entfernt werden und reichert sich an. Die entsprechende Intrazellulärdomäne (ICD) wird unter diesen Bedingungen nicht freigesetzt.

Interessanterweise scheint die CTF-Konzentration zumindest für das γ -Secretase-Substrat CD43 vom Grad der Konfluenz in der Zellkultur abzuhängen. Je dichter die Zellen dem Zustand der Konfluenz sind, umso stärker reichert sich das CD43-CTF, unabhängig von einem Inhibitor, in der Membran an (Andersson et al., 2004). Dies könnte ein interessanter Ansatz sein, um zu erklären, warum SorLAs CTF in manchen Experimenten leicht zu

4. Diskussion

detektieren war, in anderen dagegen kaum. Obwohl die Bedingungen der Zellkultur so konstant wie möglich waren, können Schwankungen im Konfluenzgrad aufgetreten sein.

Die kommerziell erhältlichen γ -Secretaseinhibitoren scheinen relativ spezifisch an Presenilin (PS), dem aktivem Bestandteil des γ -Secretasekomplexes, zu binden (Li et al., 2000). Nicht ausgeschlossen werden kann aber, insbesondere bei hohen Konzentration an Inhibitor, die Hemmung einer bisher unbekannt Protease, so dass der beobachtete Effekt der Anreicherung fälschlicherweise der γ -Secretase zugeordnet wird. Hier ist von Vorteil, dass Mutanten des Presenilins existieren, die einen dominant negativen Einfluss auf die Aktivität der γ -Secretase ausüben. In einem Ansatz wurden deshalb Zellen stabil mit einer dieser Mutanten, PS D385N, transfiziert, um die Aktivität des γ -Secretasekomplexes stark zu reduzieren (Wolfe et al., 1999). Im Falle von APP führt dies im Vergleich zu Zellen transfiziert mit dem Wildtyp Presenilin ebenfalls zu einer starken Anreicherung an APP-CTF (Sastre et al., 2001).

Auch SorLA-Stub läuft auf in der Membran von Zellen, die PS D385N exprimieren (Abb. 3-3). Im Vergleich zur Behandlung mit DAPT erscheint der Effekt der dominant negativen Mutante auf die Anreicherung mit SorLA-Stub größer zu sein. Der dem Zellkulturmedium zugesetzte Inhibitor ist nicht in der Lage jedes Presenilin-Molekül zu erreichen, daher ist die stabil transfizierte und überexprimierte dominant negative Mutante ungleich besser geeignet die Aktivität der γ -Secretase in Zellkultur zu verringern.

Das „Auflaufen“ eines CTFs sollte am eindeutigsten in Zellen zu zeigen sein, die zu keinerlei Expression an Presenilin mehr fähig sind. Daher wurden Fibroblasten aus Mäusen mit dem Doppelknockout für PS1 und PS2 (Herreman et al., 1999) zum Beispiel mit CD44, ebenfalls ein γ -Secretase-Substrat, transfiziert und analysiert (Murakami et al., 2003). Sowohl SorLA-Stub (Abb.3-4) als auch CD44 reichern sich in diesen Experimenten in den Membranen der Fibroblasten an.

SorLA-Stub verhält sich unter Einfluss eines γ -Secretase-Inhibitors, der Presenilinmutante D385N und in PS-Knock-out-Zellen ähnlich wie andere γ -Secretase-Substrate. Daraus kann geschlossen werden, dass SorLA ebenso innerhalb der Transmembrandomäne durch proteolysiert wird.

Viele freigesetzte Intrazellulärdomänen (ICDs) von γ -Secretase-Substraten sind instabil und daher *in vivo* kaum zu beobachten. Dies mag in dem nötigen schnellen Abbau

4. Diskussion

transkriptionsregulierender Fragmente, aber auch in einer generellen Recycling-Kaskade, in der der γ -Secretaseschnitt nur der erste Schritt zum vollständigen Abbau des Proteins ist, begründet sein. Zur Analyse des ICD muss daher häufig auf einen *in vitro*-Ansatz zurückgegriffen werden. Membranen von Zellen, die die membranständigen γ -Secretase-Substrate exprimieren, wurden präpariert und unter optimalen Bedingungen mit Proteaseinhibitoren, die nicht die γ -Secretase hemmen, inkubiert. Im Falle des APP konnte so ein 7 kDa-großes Proteinfragments beobachtet werden (Sastre *et al.*, 2001). Dieses Fragment, die Intrazellulärdomäne des APP (AICD), wird γ -Secretase- und zeitabhängig gebildet.

Auch im Falle SorLAs ist es äußerst schwer, das SorICD *in vivo* zu detektieren. Weder durch mikroskopische Methoden noch durch Western-Blots mit Zelllysaten SorLA-Stub-exprimierender Zellen kann SorICD reproduzierbar nachgewiesen werden. Nur in Ausnahmefällen wie in Abb. 3-2 gezeigt kann eine Spur eines zusätzlichen Fragmentes detektiert werden. In Anwesenheit des Inhibitors DAPT wird dieses Peptid nicht gebildet.

In dem oben erwähnten *in vitro*-Experiment kann dagegen das 13 kDa-große SorICD zuverlässig, und vor allem von der Aktivität der γ -Secretase abhängig, nachgewiesen werden (Abb.3-6; 3-7).

Erstaunlicherweise steigt nicht nur die SorLA-Stub-Konzentration nach DAPT-Inkubation, sondern auch die Konzentration an Volllänge-SorLA (Abb. 3-8; 3-9). Da in den Experimenten grundsätzlich eine identische Menge an Gesamtprotein stabil transfizierter Zellen aufgetragen wurde, kann man diesen Effekt nicht einfach auf eine generell gesteigerte Proteinmenge in der DAPT-behandelten Probe zurückführen. APP und andere γ -Secretase-Substrate wie Jagged, Delta und Syndecan zeigen diesen Effekt nicht (Schulz *et al.*, 2003; LaVoie and Selkoe, 2003). Dort steigt zwar die Menge an dem jeweiligen CTF, nicht aber an dem Volllänge-Protein. Lammich *et. al* (2002) zeigen, dass sich die Konzentration von CD44 wie bei SorLA erhöht unter Einfluss der Presenilinmutante D385N sowohl beim Volllänge-Protein als auch beim CD44-CTF. Dagegen finden Murakami *et al.* (2003), keine Anreicherung des Volllänge-CD44 unter Einwirkung des γ -Secretase-Inhibitors MG132. Möglicherweise ist die Anreicherung des Volllänge-Proteins von der Art der Inhibition abhängig. Die semiquantitative RT-PCR (Abb. 3-12) enthüllte, dass die Menge an SorLA-mRNA durch DAPT-Behandlung ansteigt. Zwar ist die Methode in dieser Form recht ungenau und nur semiquantitativ, aber das Ergebnis ist reproduzierbar. Das deutet daraufhin,

4. Diskussion

dass eine Art Rückkopplung stattfinden muss zwischen der Hemmung der γ -Secretase bzw. dem fehlenden SorICD und der Expression von SorLA. Da sowohl Zellen mit endogenem SorLA als auch transfizierte Zellen ein ähnliches Ergebnis zeigen, ist es unwahrscheinlich, dass auf Ebene der Transkription reguliert wird. Die artifiziellen SorLA-Konstrukte würden nicht auf eventuell aktivierte SorLA-spezifische Transkriptionsfaktoren reagieren, da die Promotoren der Plasmide von den „natürlichen“ Promotoren abweichen. Es bleibt die Möglichkeit, über die mRNA-Stabilität oder einen ähnlichen Mechanismus zu regulieren. Man könnte spekulieren, dass das unter ungehemmten Bedingungen freigesetzte SorICD in einer negativen Rückkopplung destabilisierend auf die SorLA-mRNA wirkt und deren Konzentration konstant hält. Unter DAPT-Einfluss entsteht dann kaum SorICD und mehr RNA zur Bildung von SorLA würde zur Verfügung stehen. DAPT erhöht auch die heterolog exprimierte SorLA-mRNA, obwohl diese erheblich kürzer ist als die „natürliche“ Version mit 3'- und 5'-untranslatierten Bereichen. Dagegen scheint die SorLA-Stub-mRNA auch nicht der Regulation über mRNA-Stabilität unterworfen zu sein. Da diese noch mal wesentlich kürzer ist als die SorLA-mRNA kann dahingehend argumentiert werden, dass Destabilisierung von einem Bereich der kodierenden SorLA-mRNA, außerhalb des Stub-Bereichs, abhängig ist. Für CD44 scheint ein anderer Mechanismus zu existieren. Es konnte ebenfalls mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR gezeigt werden, dass Expression des CD44ICD zusätzlich zum CD44 die Menge an CD44-mRNA steigen lässt. Inhibition der γ -Secretase durch MG132 und die einhergehende Reduktion der CD44ICD-Konzentration lässt die CD44-mRNA-Konzentration unverändert (Murakami *et al.*, 2003). Für CD44 kann man sich ein Modell vorstellen, in dem freigesetztes CD44ICD das Signal für die Zelle ist, das durch Proteolyse „verbrauchte“ CD44 zu ersetzen. Für SorLA scheint dagegen fehlendes SorICD der Zelle das Signal zu geben, dass mehr SorLA benötigt wird. Es wäre auf jeden Fall interessant diese Art Regulation näher zu untersuchen, um der physiologischen Rolle SorLAs weiter auf die Spur zu kommen.

4.2 Aufklärung eines γ -Secretase-abhängigen Signalweges

Die freigesetzte Intrazellulärdomäne von Notch reichert sich im Zellkern einer transfizierten Zelle an. Das NICD besitzt ein eigenes funktionelles Kernlokalisierungssignal (NLS), das dem NICD die Überwindung der Kernmembran ermöglicht, außerdem scheint das NICD beständig genug zu sein, um eine Detektion zu ermöglichen (Schroeter *et al.*, 1998). Im

4. Diskussion

Gegensatz dazu weist das AICD kein NLS auf und kann nur bei Überexpression im Verbund mit Fe65 in den Zellkern wandern und detektiert werden (Kimberly et al., 2001). Das SorICD konnte zunächst auch nicht in der Zelle gefunden werden, da trotz Überexpression des SorICD dieses für den Nachweis zu schnell abgebaut wurde (Daten nicht gezeigt). Erst eine Modifikation durch ein N-terminales EGFP konnte das SorICD soweit stabilisieren, dass es in mikroskopischen Aufnahmen detektiert werden konnte (Abb. 3-15). Problematischerweise war schon EGFP alleine teilweise im Zellkern lokalisiert. Durch einen Vergleich zwischen EGFP, EGFP-SorICD und SorICD mit mutiertem NLS konnte aber ein statistisch signifikanter Unterschied in der Lokalisierung der drei Konstrukte festgestellt werden, der eine eindeutige Kernlokalisierung nur bei einem SorICD-Konstrukt mit intaktem NLS zeigt (Abb. 3-16). Somit konnte gezeigt werden, dass das SorICD nach Abspaltung durch die γ -Secretase in der Lage ist in den Zellkern zu wandern und dort möglicherweise direkt die Transkription von Zielgenen zu beeinflussen. Erstaunlicherweise findet sich trotz eines zu immerhin 50% mutierten Kernlokalisierungssignals immer noch mehr EGFP-MutSorICD im Kern als EGFP. Begründbar mag das in einer Restaktivität des verbleibenden NLS sein oder eine vom möglichen NLS unabhängige Protein-Protein-Interaktion wird teilweise gestört und der zur Kernlokalisierung fähige Komplex liegt in geringerer Menge vor. Nichtsdestotrotz war das Programm PSORT II bei der Vorhersage dieses NLS in Grenzen zuverlässig.

Das AICD scheint nur im Komplex mit Fe65 sicher vor einer schnellen Degradation zu sein (Kimberly *et al.*, 2001). Während zum Beispiel NICD und CD44ICD vom Proteasom abgebaut werden (De Strooper et al., 1999; Oberg et al., 2001; Lammich et al., 2002), wird das AICD wahrscheinlich durch das Insulin degrading enzyme (IDE) proteolytisch verdaut (Edbauer et al., 2002). Interessanterweise ist IDE auch in der Lage, auch das extrazelluläre A β zu verdauen (Selkoe, 2001). Ob dieser Degradationsweg für APP von physiologischer Bedeutung ist, ist zur Zeit aber noch unklar. In frühen Versuchen mit SorICD wurde schnell deutlich, dass SorICD nicht durch Gabe von Lactacystin stabilisiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Der rapide Abbau von isoliertem SorICD konnte aber konzentrationsabhängig durch Gabe von Insulin inhibiert werden (Abb. 3-17). Das deutet darauf hin, dass Insulin als spezifischer kompetitiver Inhibitor IDE daran gehindert hat SorICD abzubauen. Für eine eindeutige Bestätigung, dass wirklich IDE die verantwortliche proteolytische Aktivität ist, müssen aber noch Versuche mit IDE-depletierten Proben bzw. mit inaktiven IDE-Mutanten

4. Diskussion

durchgeführt werden. Wie für APP so ist auch für SorLA die Bedeutung dieses Abbauweges unbekannt.

Für Notch besteht der große Vorteil auf bereits bekannte Interaktionen zu nukleären Transkriptionsfaktoren der CSL-Familie und bekannte Zielgene zurückgreifen zu können (Selkoe and Kopan, 2003). Für APP und SorLA sind eindeutige Zielgene bisher nicht bekannt. Mit Hilfe von Reportersystemen wurde für APP versucht die Frage zu klären, ob AICD die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung hat. Gefunden wurde ein transkriptionsaktivierender Komplex aus AICD, Fe65 und Tip60. Experimentell wurde hierzu APP mit einer intrazellulären Gal4-DNA-Bindedomäne modifiziert, so dass freigesetztes AICD an einen Vektor mit Gal4-abhängigem Reporter gen binden kann. Dort ist AICD nun in der Lage im Komplex mit Fe65 und Tip60 die Expression des Reporterproteins zu initialisieren (Cao and Sudhof, 2001). Für SorLA wurde in einem ersten Schritt SorICD mit einer Gal4-Domäne fusioniert und im Transkriptionsexperiment mit einem Luciferase-Reporter gen untersucht. Es zeigte sich eine ca. dreifach höhere transkriptionsaktivierende Wirkung des Gal4-SorICD im Vergleich zum unmodifizierten Gal4 (Abb. 3-19). Dieser Effekt ist zwar signifikant, aber relativ gering. Für APP liegt der Effekt fünffach über der Gal4-Aktivierung (Cao and Sudhof, 2004). Erst durch die Cotransfektion von Fe65 und Tip60 kann dieser niedrige Wert bei APP um ein Vielfaches gesteigert werden (Cao *et al.*, 2004). So besteht auch bei SorLA die Chance über die Suche nach interagierenden Proteinen zu Kandidaten für eine Stimulation der Transkriptionsaktivierung zu kommen. Die bereits untersuchten, über ein in der Arbeitsgruppe durchgeführtes Hefe-Dihybrid-Experiment gefundenen, Proteine zeigten keine zusätzliche Stimulierung, aber dies mag an Schwächen im experimentellen System liegen. Für APP wurde postuliert, dass eher die noch membrangebundene Intrazellulärdomäne des APP das Protein Fe65 bindet und aktiviert, während bereits freigesetztes AICD nicht so potent ist (Cao *et al.*, 2004). Daher sollte in weiterführenden Experimenten versucht werden, Volllänge-SorLA mit Gal4 zu modifizieren und in Kombination mit bekannten/neuen Interaktionspartnern zu untersuchen. Zur Untersuchung der regulierten Intramembranproteolyse (RIP) kann weiter SorLA intrazellulär mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne und zusätzlich mit der Aktivierungsdomäne VP16 fusioniert werden. So könnte bei artifizieller intrazellulärer Signalkaskade zum Reporterkonstrukt die Ektodomänenabspaltung und der γ -Secretaseschnitt unter Einfluss verschiedener Liganden untersucht werden.

4. Diskussion

4.3 Modell einer RIP-abhängigen Signalkaskade für SorLA

Die Daten zusammengefasst ergeben folgendes Modell einer ligandenstimulierten RIP-abhängigen Signalkaskade von SorLA (Abb. 4-2).

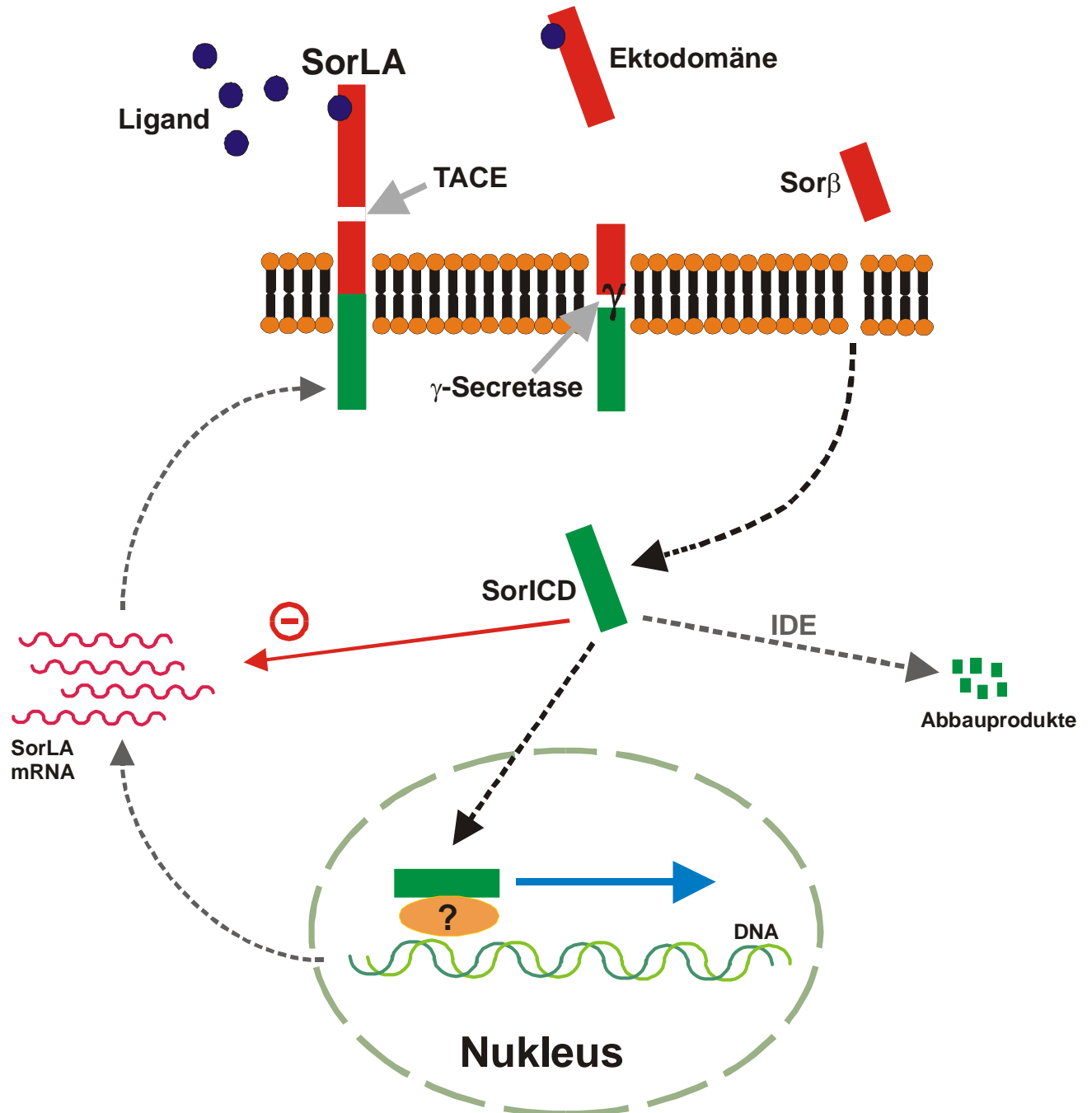


Abb. 4-2. Modell einer ligandenstimulierten RIP-abhängigen Signalkaskade von SorLA

TACE - tumor necrosis factor α converting enzyme; Sor β - A β -ähnliches extrazelluläres Fragment von SorLA; SorICD - Intrazellulärdomäne von SorLA; IDE - Insulin degrading enzyme.

4. Diskussion

Durch Bindung eines Liganden wie head activator wird die Metalloprotease TACE aktiviert und die Ektodomäne SorLAs abgespalten. Der membranständige SorLA-Rest ist Substrat für die γ -Secretase und wird innerhalb der Transmembrandomäne proteolytisch geschnitten. Das freigesetzte SorICD wandert in den Zellkern, wo es im Komplex mit Transkriptionsfaktoren die Transkription bisher unbekannter Zielgene stimuliert. Die Konzentration des SorICD selbst wird zusätzlich reguliert über den IDE-vermittelten Abbau und über die Stabilität der SorLA-mRNA.

5. Zusammenfassung

Der 1996 erstmals beschriebene Neuropeptidrezeptor SorLA gehört zur Klasse der Typ-I-Transmembranproteine. Seine komplexe Zusammensetzung mit Domänen aus der LDL-Rezeptorfamilie und aus der kaum charakterisierten Familie der Neuropeptidrezeptoren mit VPS10-Domäne führt zu einer großen Bandbreite von Liganden. So bindet SorLA sowohl an ApoE-haltige-Lipoproteine als auch an Neuropeptide wie Kopfaktivator und an Bestandteile des Plasminogen aktivierenden Systems. Wenig ist bisher über die physiologische Rolle von SorLA bekannt. Sowohl eine Funktion als Sortierungsrezeptor im Lipoproteinstoffwechsel als auch als Teil einer Neuropeptid-vermittelten Signalkaskade ist möglich. SorLA wird als Proprotein synthetisiert und durch Abspaltung des Propeptids durch die Protease Furin. SorLA aktiviert. SorLA kann weiterhin nach Ligandenbindung durch die Protease TACE extrazellulär nahe der Transmembrandomäne geschnitten werden. Diese zwei Prozessierungsschritte laufen in ähnlicher Weise auch im Rezeptor Notch ab. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob SorLA wie Notch ein Substrat für die γ -Secretase ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl SorLA-Volllänge als auch ein verkürztes SorLA-Fragment ohne Ektodomäne, das eigentliche Substrat der γ -Secretase, sich in Zellmembranen nach Behandlung mit einem γ -Secretaseinhibitor anreichern. Alle bisher untersuchten γ -Secretasesubstrate zeigen diesen Effekt. Weiterhin konnten γ -Secretase-abhängig sowohl die intrazellulär nach dem Verdau freigesetzte cytoplasmatische Domäne SorICD als auch das extrazelluläre Peptid Sor β detektiert werden. Durch weitere Experimente in Presenilin-Knock-out-Zellen konnte SorLA als neues γ -Secretase-Substrat bestätigt werden. Ähnlich wie die Intrazellulärdomäne von Notch kann auch SorICD mit Hilfe eines eigenen Kernlokalisierungssignals in den Zellkern wandern. Um dies nachzuweisen, wurde die Lokalisierung eines Fusionsproteins aus EGFP und SorICD mit intaktem oder mutiertem Kernlokalisierungssignal im konfokalen Mikroskop untersucht. Eine, wenn auch geringe, Transkriptionsaktivierung des mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne modifizierten SorICD konnte in einem Gal4-abhängigen Reporterexperiment gemessen werden. Zusammengefasst zeigen die Versuche eine potentielle physiologische Bedeutung der γ -Secretase-Prozessierung für Signaltransduktionsvorgänge von SorLA. Ein auf diesen Ergebnissen aufbauendes Modell beruht auf einer Liganden-aktivierten TACE-Prozessierung von SorLA. Das in der Membran verbleibende SorLA-Fragment wird durch die γ -Secretase geschnitten. Das freigesetzte SorICD wandert im Verbund mit Transkriptionsfaktoren in den Nukleus und reguliert dort die Transkription bisher unbekannter Zielgene.

6. Literaturverzeichnis

6. Literaturverzeichnis

1. Andersson,C.X., Fernandez-Rodriguez,J., Laos,S., Baeckstrom,D., Haass,C., and Hansson,G.C. (2004). Shedding and gamma-Secretase mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochem. J.*
2. Artavanis-Tsakonas,S., Matsuno,K., and Fortini,M.E. (1995). Notch signaling. *Science*, **268**, 225-232.
3. Blau Mueller,C.M., Qi,H., Zagouras,P., and Artavanis-Tsakonas,S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, **90**, 281-291.
4. Boels,K., Glassmeier,G., Herrmann,D., Riedel,I.B., Hampe,W., Kojima,I., Schwarz,J.R., and Schaller,H.C. (2001). The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca(2+)-permeable channel GRC. *J. Cell Sci.*, **114**, 3599-3606.
5. Brou,C., Logeat,F., Gupta,N., Bessia,C., LeBail,O., Doedens,J.R., Cumano,A., Roux,P., Black,R.A., and Israel,A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. cell*, **5**, 207-216.
6. Brown,M.S. and Goldstein,J.L. (1985). The receptor model for transport of cholesterol in plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **454**, 178-182.
7. Brummendorf,T. and Rathjen,F.G. (1993). Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J. Neurochem.*, **61**, 1207-1219.
8. Cao,X. and Sudhof,T.C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**, 115-120.
9. Cao,X. and Sudhof,T.C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 24601-24611.
10. Citron,M., Eckman,C.B., Diehl,T.S., Corcoran,C., Ostaszewski,B.L., Xia,W., Levesque,G., St George,H.P., Younkin,S.G., and Selkoe,D.J. (1998). Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein. *Neurobiol. Dis.*, **5**, 107-116.
11. Citron,M., Vigo-Pelfrey,C., Teplow,D.B., Miller,C., Schenk,D., Johnston,J., Winblad,B., Venizelos,N., Lannfelt,L., and Selkoe,D.J. (1994). Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 11993-11997.
12. Davis,C.G., Goldstein,J.L., Sudhof,T.C., Anderson,R.G., Russell,D.W., and Brown,M.S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, **326**, 760-765.

6. Literaturverzeichnis

13. De Strooper,B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*, **38**, 9-12.
14. De Strooper,B., Annaert,W., Cupers,P., Saftig,P., Craessaerts,K., Mumm,J.S., Schroeter,E.H., Schrijvers,V., Wolfe,M.S., Ray,W.J., Goate,A., and Kopan,R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, **398**, 518-522.
15. De Strooper,B., Saftig,P., Craessaerts,K., Vanderstichele,H., Guhde,G., Annaert,W., von Figura,K., and Van Leuven,F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, **391**, 387-390.
16. Edbauer,D., Willem,M., Lammich,S., Steiner,H., and Haass,C. (2002). Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J. Biol. Chem.*, **277**, 13389-13393.
17. Edbauer,D., Winkler,E., Regula,J.T., Pesold,B., Steiner,H., and Haass,C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 486-488.
18. Esser,V., Limbird,L.E., Brown,M.S., Goldstein,J.L., and Russell,D.W. (1988). Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13282-13290.
19. Gliemann,J., Hermey,G., Nykjaer,A., Petersen,C.M., Jacobsen,C., and Andreasen,P.A. (2004). The mosaic receptor sorLA/LR11 binds components of the plasminogen-activating system and platelet-derived growth factor-BB similarly to LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), but mediates slow internalization of bound ligand. *Biochem. J.*, **381**, 203-212.
20. Gong,Y., Chang,L., Viola,K.L., Lacor,P.N., Lambert,M.P., Finch,C.E., Krafft,G.A., and Klein,W.L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 10417-10422.
21. Greenwald,I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.*, **12**, 1751-1762.
22. Guo,L., Eisenman,J.R., Mahimkar,R.M., Peschon,J.J., Paxton,R.J., Black,R.A., and Johnson,R.S. (2002). A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases. *Mol. Cell Proteomics.*, **1**, 30-36.
23. Haass,C., Lemere,C.A., Capell,A., Citron,M., Seubert,P., Schenk,D., Lannfelt,L., and Selkoe,D.J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.*, **1**, 1291-1296.
24. Hampe,W., Riedel,I.B., Lintzel,J., Bader,C.O., Franke,I., and Schaller,H.C. (2000). Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *J. Cell Sci.*, **113**, 4475-4485.
25. Hampe,W., Urny,J., Franke,I., Hoffmeister-Ullerich,S.A.H., Herrmann,D., Petersen,C.M., Lohmann,J., and Schaller,H.C. (1999). A head-activator binding

6. Literaturverzeichnis

- protein is present in hydra in a soluble and a membrane-anchored form. *Development*, **126**, 4077-4086.
26. Hermey,G., Hermans-Borgmeyer,I., and Schaller,H.C. (1998). SorCS a novel neurospecifically expressed gene with homology to sorting receptors. *Biol. Chem. Suppl.*, **379**, 77.
 27. Herreman,A., Hartmann,D., Annaert,W., Saftig,P., Craessaerts,K., Serneels,L., Umans,L., Schrijvers,V., Checler,F., Vanderstichele,H., Baekelandt,V., Dressel,R., Cupers,P., Huylebroeck,D., Zwijsen,A., Van Leuven,F., and De Strooper,B. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **96**, 11872-11877.
 28. Herreman,A., Serneels,L., Annaert,W., Collen,D., Schoonjans,L., and De Strooper,B. (2000). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 461-462.
 29. Herz,J. and Bock,H.H. (2002). Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 405-434.
 30. Hiesberger,T., Trommsdorff,M., Howell,B.W., Goffinet,A., Mumby,M.C., Cooper,J.A., and Herz,J. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, **24**, 481-489.
 31. Ho,A. and Sudhof,T.C. (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **101**, 2548-2553.
 32. Howell,B.W., Herrick,T.M., and Cooper,J.A. (1999). Reelin-induced tryosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.*, **13**, 643-648.
 33. Huppert,S.S., Le,A., Schroeter,E.H., Mumm,J.S., Saxena,M.T., Milner,L.A., and Kopan,R. (2000). Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature*, **405**, 966-970.
 34. Jacobsen,L., Madsen,P., Jacobsen,C., Nielsen,M.S., Gliemann,J., and Petersen,C.M. (2001). Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22788-22796.
 35. Jacobsen,L., Madsen,P., Moestrup,S.K., Lund,A.H., Tommerup,N., Nykjaer,A., Sottrup-Jensen,L., Gliemann,J., and Petersen,C.M. (1996). Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the α_2 -macroglobulin receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31379-31383.
 36. Kaether,C., Lammich,S., Edbauer,D., Ertl,M., Rietdorf,J., Capell,A., Steiner,H., and Haass,C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell Biol.*, **158**, 551-561.
-

6. Literaturverzeichnis

37. Kanaki,T., Bujo,H., Hirayama,S., Ishii,I., Morisaki,N., Schneider,W.J., and Saito,Y. (1999). Expression of LR11, a mosaic LDL receptor family member, is markedly increased in atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 2687-2695.
38. Kimberly,W.T., LaVoie,M.J., Ostaszewski,B.L., Ye,W., Wolfe,M.S., and Selkoe,D.J. (2002). Complex N-linked glycosylated nicastrin associates with active gamma-secretase and undergoes tight cellular regulation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 35113-35117.
39. Kimberly,W.T., Zheng,J.B., Guenette,S.Y., and Selkoe,D.J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40288-40292.
40. Koo,E.H. and Kopan,R. (2004). Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nat. Med.*, **10 Suppl**, S26-S33.
41. Krieger,M. and Herz,J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 601-637.
42. Lammich,S., Okochi,M., Takeda,M., Kaether,C., Capell,A., Zimmer,A.K., Edbauer,D., Walter,J., Steiner,H., and Haass,C. (2002). Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an A β -like peptide. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44754-44759.
43. LaVoie,M.J. and Selkoe,D.J. (2003). The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J. Biol. Chem.*, **278**, 34427-34437.
44. Lehrman,M.A., Goldstein,J.L., Brown,M.S., Russell,D.W., and Schneider,W.J. (1985). Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell*, **41**, 735-743.
45. Li,Y.M., Xu,M., Lai,M.T., Huang,Q., Castro,J.L., DiMuzio-Mower,J., Harrison,T., Lellis,C., Nadin,A., Neduveilil,J.G., Register,R.B., Sardana,M.K., Shearman,M.S., Smith,A.L., Shi,X.P., Yin,K.C., Shafer,J.A., and Gardell,S.J. (2000). Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature*, **405**, 689-694.
46. Lintzel,J., Riedel,I.B., Franke,I., Schaller,H.C., and Hampe,W. (2002). Characterization of the VPS10 domain of sorLA/LR11 as binding site for the neuropeptide head activator. *Biol. Chem.*, **383**, 1727-1733.
47. Logeat,F., Bessia,C., Brou,C., LeBail,O., Jarriault,S., Seidah,N.G., and Israel,A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 8108-8112.
48. Marambaud,P., Shioi,J., Serban,G., Georgakopoulos,A., Sarner,S., Nagy,V., Baki,L., Wen,P., Efthimiopoulos,S., Shao,Z., Wisniewski,T., and Robakis,N.K. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.*, **21**, 1948-1956.

6. Literaturverzeichnis

49. Marcusson,E.G., Horazdovsky,B.F., Cereghino,J.L., Gharakhanian,E., and Emr,S.D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell*, **77**, 579-586.
 50. Martin,S., Navarro,V., Vincent,J.P., and Mazella,J. (2002). Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology*, **123**, 1135-1143.
 51. Martoglio,B. and Golde,T.E. (2003). Intramembrane-cleaving aspartic proteases and disease: presenilins, signal peptide peptidase and their homologs. *Hum. Mol. Genet.*, **12 Spec No 2**, R201-R206.
 52. May,P., Reddy,Y.K., and Herz,J. (2002). Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 18736-18742.
 53. Mazella,J., Zsurger,N., Navarro,V., Chabry,J., Kaghad,M., Caput,D., Ferrara,P., Vita,N., Gully,D., Maffrand,J.P., and Vincent,J.P. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/Sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26273-26276.
 54. Mumm,J.S., Schroeter,E.H., Saxena,M.T., Griesemer,A., Tian,X., Pan,D.J., Ray,W.J., and Kopan,R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates γ -secretase-like proteolytic activation on notch1. *Mol. cell*, **5**, 197-206.
 55. Murakami,D., Okamoto,I., Nagano,O., Kawano,Y., Tomita,T., Iwatsubo,T., De Strooper,B., Yumoto,E., and Saya,H. (2003). Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembraneous cleavage of CD44. *Oncogene*, **22**, 1511-1516.
 56. Nykjaer,A., Lee,R., Teng,K.K., Jansen,P., Madsen,P., Nielsen,M.S., Jacobsen,C., Kliemann,M., Schwarz,E., Willnow,T.E., Hempstead,B.L., and Petersen,C.M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, **427**, 843-848.
 57. Oberg,C., Li,J., Pauley,A., Wolf,E., Gurney,M., and Lendahl,U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J. Biol. Chem.*, **276**, 35847-35853.
 58. Petersen,C.M., Nielsen,M.S., Jacobsen,C., Tauris,J., Jacobsen,L., Gliemann,J., Moestrup,S.K., and Madsen,P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.*, **18**, 595-604.
 59. Petersen,C.M., Nielsen,M.S., Nykjær,A., Jacobsen,L., Tommerup,N., Rasmussen,H.H., Røigaard,H., Gliemann,J., Madsen,P., and Moestrup,S.K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3599-3605.
 60. Rice,D.S., Sheldon,M., D'Arcangelo,G., Nakajima,K., Goldowitz,D., and Curran,T. (1998). Disabled-1 acts downstream of Reelin in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development*, **125**, 3719-3729.
-

6. Literaturverzeichnis

61. Roberds,S.L., Anderson,J., Basi,G., Bienkowski,M.J., Branstetter,D.G., Chen,K.S., Freedman,S.B., Frigon,N.L., Games,D., Hu,K., Johnson-Wood,K., Kappenman,K.E., Kawabe,T.T., Kola,I., Kuehn,R., Lee,M., Liu,W., Motter,R., Nichols,N.F., Power,M., Robertson,D.W., Schenk,D., Schoor,M., Shopp,G.M., Shuck,M.E., Sinha,S., Svensson,K.A., Tatsuno,G., Tintrup,H., Wijisman,J., Wright,S., and McConlogue,L. (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1317-1324.
62. Rostene,W.H. and Alexander,M.J. (1997). Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.*, **18**, 115-173.
63. Sastre,M., Steiner,H., Fuchs,K., Capell,A., Multhaup,G., Condron,M.M., Teplow,D.B., and Haass,C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.*, **2**, 835-841.
64. Scherzer,C.R., Offe,K., Gearing,M., Rees,H.D., Fang,G., Heilman,C.J., Schaller,C., Bujo,H., Levey,A.I., and Lah,J.J. (2004). Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*, **61**, 1200-1205.
65. Scheuner,D., Eckman,C., Jensen,M., Song,X., Citron,M., Suzuki,N., Bird,T.D., Hardy,J., Hutton,M., Kukull,W., Larson,E., Levy-Lahad,E., Viitanen,M., Peskind,E., Poorkaj,P., Schellenberg,G., Tanzi,R., Wasco,W., Lannfelt,L., Selkoe,D., and Younkin,S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.*, **2**, 864-870.
66. Schneider,W.J. and Nimpf,J. (2003). LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 892-903.
67. Schroeter,E.H., Kisslinger,J.A., and Kopan,R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, **393**, 382-386.
68. Schulz,J.G., Annaert,W., Vandekerckhove,J., Zimmermann,P., De Strooper,B., and David,G. (2003). Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/gamma-secretase-dependent and modulates cytosolic signaling. *J. Biol. Chem.*, **278**, 48651-48657.
69. Selkoe,D. and Kopan,R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 565-597.
70. Selkoe,D.J. (2001a). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.*, **81**, 741-766.
71. Selkoe,D.J. (2001b). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*, **32**, 177-180.
72. Sisodia,S.S. and George-Hyslop,P.H. (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 281-290.

6. Literaturverzeichnis

73. Steiner,H., Winkler,E., Edbauer,D., Prokop,S., Basset,G., Yamasaki,A., Kostka,M., and Haass,C. (2002). PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.*, **277**, 39062-39065.
74. Taira,K., Bujo,H., Hirayama,S., Yamazaki,H., Kanaki,T., Takahashi,K., Ishii,I., Miida,T., Schneider,W.J., and Saito,Y. (2001). LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1501-1506.
75. Trommsdorff,M., Borg,J.P., Margolis,B., and Herz,J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33556-33560.
76. Wolfe,M.S., Xia,W., Ostaszewski,B.L., Diehl,T.S., Kimberly,W.T., and Selkoe,D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, **398**, 513-517.

7. Anhang

7.1 Tabellen und Abbildungen

Tabellen

- 2.1.1 Verwendete Vektoren
SorLA-Vektoren
- 2.1.7 Verwendete Primer (Oligonukleotide)
- 2.1.10 Klonierte Expressionsvektoren

- 2.2.1 Herstellung von Tris/Tricine-Gelen
- 2.2.2 Eingesetzte Antikörper

- 2.3.1 Verwendete eukaryotische Zelllinien
- 2.3.2 Stabil-transfizierte Zelllinien

Abbildungen

- 1-1 Domänenstruktur von SorLA
- 1-2 Verwandte von SorLA
- 1-3 Schematischer Vergleich des proteolytischen Musters von APP, Notch und SorLA
- 1-4 Proteolytische Prozessierung von Notch
- 1-5 Proteolytische Prozessierung von APP

- 3-1 Schematischer Vergleich von SorLA und SorLA-Stub
- 3-2 SorLA-Stub unter dem Einfluss von DAPT
- 3-3 Einfluss von PS D385N auf SorLA-Stub
- 3-4 Presenilin-Knock-out-Zellen
- 3-5 swAPP₆₉₅ im *in vitro*- γ -Secretaseexperiment
- 3-6 SorLA-Stub-tags im *in vitro*- γ -Secretaseexperiment
- 3-7 Zeitabhängige Bildung von SorICD im *in vitro*- γ -Secretaseexperiment
- 3-8 Einfluss von Presenilin auf SorLA
- 3-9 Fehlendes SorLA-Stub in Presenilin Wildtyp-Zellen
- 3-10 Reifes SorLA in Presenilin-defizienten Zellen
- 3-11 Einfluss von DAPT auf endogenes SorLA in NT2-Zellen
- 3-12 Einfluss von DAPT auf die mRNA-Konzentration von SorLA bzw. SorLA-Stub
- 3-13 Immunpräzipitation und Detektion des Sor β
- 3-14 Aminosäuresequenz der Intrazellulärdomäne von SorLA
- 3-15 Lokalisierung des SorICD in COS-Zellen
- 3-16 Statistische Auswertung der SorICD-Lokalisierung
- 3-17 Abbau des SorICD
- 3-18 schematischer Überblick über die Transkriptionsaktivierung
- 3-19 Transkriptionsaktivierung von Gal4-SorICD

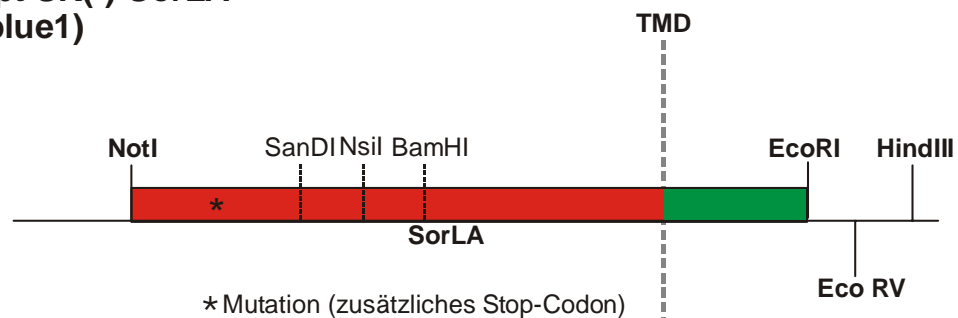
- 4-1 CTF-Anreicherung in der Membran nach Hemmung der γ -Secretase
- 4-2 Modell einer ligandenstimulierten RIP-abhängigen Signalkaskade von SorLA

7. Anhang

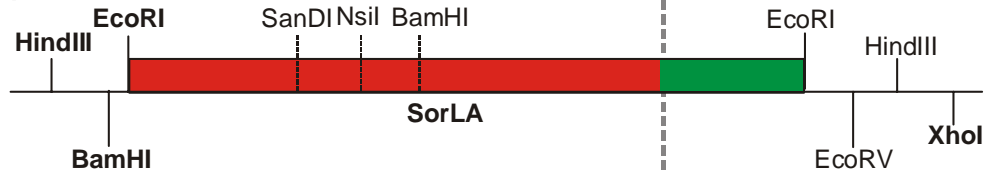
7.2 Vektorkarten

Die folgenden Vektorkarten sollen eine Übersicht über die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen der einzelnen Expressionsvektoren geben. Die Längenverhältnisse stimmen nicht mit den exakten auf der Zahl der Basen beruhenden Längenverhältnissen überein. Zur Vereinfachung ist die ungefähre Position der für die Transmembrandomäne codierende Sequenz (TMD) angegeben. Die Farben der Sequenzabschnitte richten sich nach den schematischen Abbildungen der exprimierten Proteine. Fett gedruckte Schnittstellen sind Teil des ursprünglichen Vektors. Schnittstellen, die durch Ligation mit einem nicht-kompatiblen Blunt-end-Fragment ligiert wurden oder durch eine Auffüllreaktion verloren gegangen sind, sind grau durchgestrichen. In Klammern wird die im Text üblicherweise verwendete Abkürzung für das jeweilige Konstrukt aufgeführt.

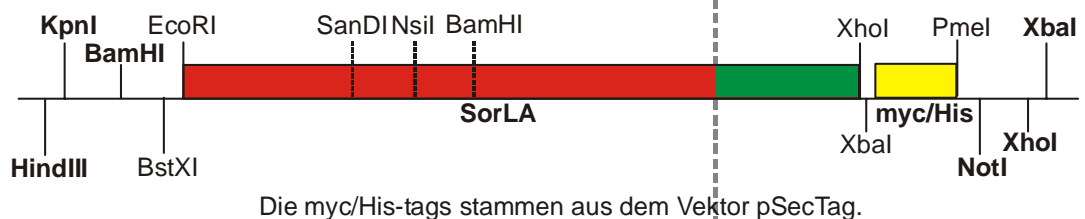
pBluescript SK(-)-SorLA (pSorLA-blue1)



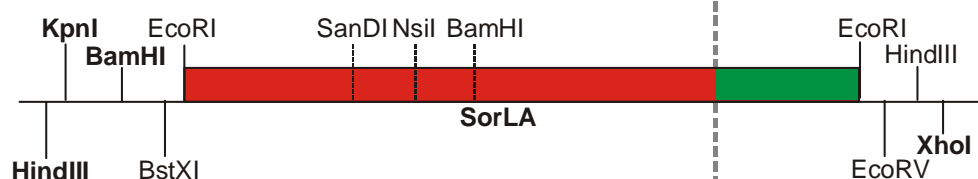
pcDNA3-SorLAok (pSorLAok)



pcDNA3.1/Hygro(+)-SorLA-tags (SorLA-tags)

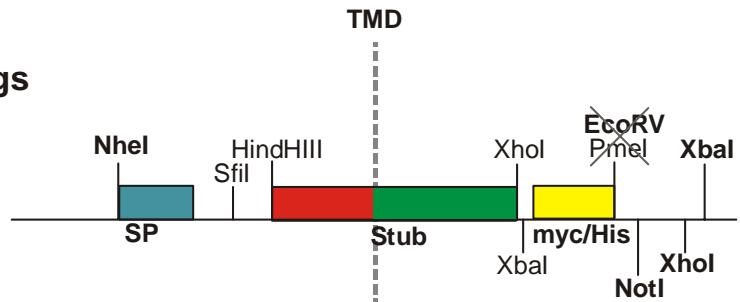


pcDNA3.1/Hygro(+)-SorLA (SorLA)



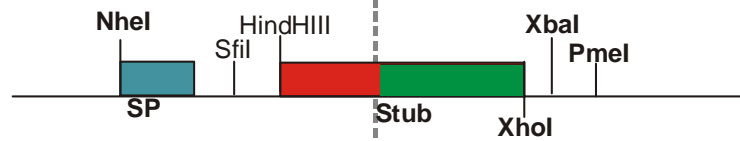
7. Anhang

pcDNA3.1/Hygro(+)-Stub-tags (Stub-tags)

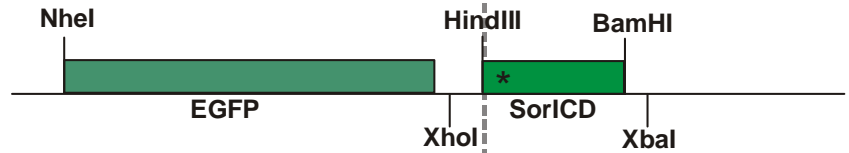


Signalpeptid (SP) und die myc/His-tags stammen aus dem Vektor pSecTag.

pcDNA3.1/Hygro(+)-Stub (Stub)

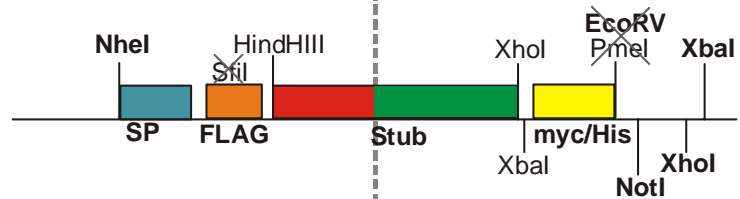


pEGFP-(Mut)SorICD

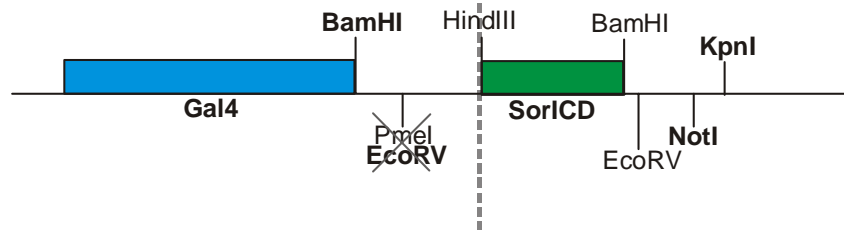


*codierend für ein potentielles NLS

pcDNA3.1/Hygro(+)-FLAG-Stub-tags (FLAG-Stub-tags)



pBIND-SorICD (Gal4-SorICD)



7. Anhang

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimersche Demenz
AICD	APP intracellular domain
APH-1	Anterior pharynx defective-1
ApoB100	Apolipoprotein B100
ApoE	Apolipoprotein E
ApoER2	ApoE receptor 2
APP	Amyloid precursor protein
Aqua dest.	demineralisiertes Wasser
BACE	β -site APP cleaving enzyme
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	codierende DNA
CTF α/β	C-terminalen Fragmente α/β
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal growth factor like
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
HA	Head activator
HAB	Head activator binding protein
LDL	Low-density lipoprotein
LDLR	Low-density lipoprotein receptor
LDLRA/B	Low-density lipoprotein receptor class A/B–Wiederholungen
LR11	LDLR relative with 11 binding repeats
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
min	Minuten
mRNA	messenger RNA

7. Anhang

NGF	Nerve growth factor
NICD	Notch intracellular domain
nt	Nukleotide
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-BB	Platelet derived growth factor – BB
PEG	Polyethylenglykol
Pen-2	Presenilin enhancer-2
PO	Peroxidase
PS	Presenilin
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RAP	Receptor associated protein
RIP	regulierte Intramembranproteolyse
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SorICD	Intrazellulärdomäne von SorLA
SorLA	Sorting protein-related receptor containing LDLR class A repeats
TACE	Tumor necrosis factor α converting enzyme
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator-Rezeptors
UTR	untranslatierte Region
VLDLR	Very low-density lipoprotein receptor
VPS10	Vacuolar protein sorting protein 10
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7. Anhang

7.5 Publikationen und Kongressbeiträge

- Munck, A., Böhm, C., Hampe, W.
Signal Transduction of the Neuronal Mosaic Receptor SorLA
XXth International Winter Meeting on Growth and Death in the Nervous System,
St. Moritz, 24.-28. März 2004
- Seibel, N., Munck, A., Böhm, C., Hampe, W.
Signal Transduction of the Neuropeptide Receptor SorLA
12th International Conference on Second Messengers and Phosphoproteins,
Montreal, 3.-7. August 2004
- Böhm, C., Munck, A., Hampe, W.
Interactionpartners of SorLA
Annual fall meeting, German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GMB)
& German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology
(DGPT), Halle (Saale), 7.-10. September 2002
- Hampe, W., Munck, A., Böhm, C.
Signal transduction of SorLA, a member of the lipoprotein-receptor family
Special FEBS 2003 meeting on Signal Transduction,
Brüssel, 4.-8. Juli 2003
- Böhm, C., Munck, A., Hampe, W.
SorLA – a novel γ -secretase substrate
FENS'04 4th Forum of European Neuroscience
Lissabon, 10.-14. Juli 2004
- Böhm, C., Munck, A., Hampe, W.
SorLA – a novel γ -secretase substrate
9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders
Philadelphia, 17.-22. Juli 2004
- Munck, A., Böhm, C., Seibel, N., Hashemol Hosseini, Z., Hampe, W.
Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the
endoplasmic reticulum
FEBS Journal 272 (2005) 1718–1726
- Böhm, C., Hampe, W.
Presenilin/gamma-secretase-dependent proteolytic processing of SorLA
In Vorbereitung

7. Anhang

Ich danke PD Dr. Wolfgang Hampe für die wissenschaftlichen Diskussionen, für die Bereitstellung des Themas und der benötigten Sachmittel.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel und Frau Prof. Dr. H. Chica Schaller für wissenschaftlichen Rat und Sachmittel bedanken.

Prof. Dr. Eckhard Mandelkow danke ich für das Erstellen eines Gutachtens zu meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Beisiegel für eine sehr schöne Arbeitsatmosphäre und für die fachbezogene Unterstützung.