
**SIGNALTRANSDUKTION DURCH DEN HUMANEN
TRANSMEMBRANREZEPTOR SORLA**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nicole Maria Seibel

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz Dr. W. HAMPE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Frau Professor Dr. E. PRATJE
Tag der Disputation: 02. März 2007

Hamburg, den 13. Februar 2007




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Die Arbeit wurde durchgeführt in der

Arbeitsgruppe Neurobiochemie im

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie am
Zentrum für Experimentelle Medizin des

Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Sie wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 444 B10)
und durch das Graduiertenkolleg „Neuronale Signaltransduktion und deren patho-
logische Störungen“.

Veröffentlichungen während dieser Arbeit:

Munck A, Bohm C, Seibel NM, Hashemol Hosseini Z, Hampe W. 2005. Hu-K4 is an ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. *FEBS Journal* 272(7):1718-26.

Bohm C, Seibel NM, Henkel B, Steiner H, Haass C, Hampe W. 2006. SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 281(21):14547-53.

Eingereicht

Seibel NM, Eljouni J, Nalaskowski MM, Hampe W. 2006 Nuclear localization of EGFP homomultimers. in *Biotechniques*

INHALT

Abkürzungsverzeichnis.....	I
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1 Struktur des Transmembranrezeptors SorLA	2
1.2 SorLA als Neuropeptidrezeptor	4
1.3 Signaltransduktion in der Familie der LDL-Rezeptoren	6
1.4 Funktionen der Rezeptoren mit Vps10-Domäne	8
1.5 LDL-Rezeptoren in der Alzheimer Krankheit	9
1.5.1 Die Prozessierung des Amyloiden Vorläuferproteins	10
1.5.2 Die Rolle von LRP1 und SorLA bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit	12
1.6 Regulierte Intramembran-Proteolyse	15
1.7 Regulierte Intramembran-Proteolyse von SorLA?	17
1.8 Zielsetzung und methodischer Ansatz	19
<u>2. Material und Methoden</u>	20
2.1 Verwendete Materialien	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.1.1 Computergesteuerte Geräte	21
2.1.1.2 Allgemeine Labormaterialien und –geräte	21
2.1.2 Programme und Internetseiten	22
2.1.3 Chemikalien	23
2.1.3.1 Allgemeine Chemikalien	23
2.1.3.2 Kopfaktivator	24
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.5 Kits	24
2.2 Zelllinien	25
2.2.1 Verwendete Standardlinien	25
2.2.2 Stabil transfizierte Zelllinien	26
2.3 Plasmide	27
2.4 Primer	30
2.5 Antikörper	31

2.6 Lösungen	33
2.7 Zellbiologische Methoden	34
2.7.1 Zellkultur und Inkubation mit KA und DAPT	34
2.7.2 Transfektion	34
2.7.3 Proliferationstest mit alamarBlue™	34
2.7.4 Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen	35
2.7.5 Kernlokalisierungsexperiment am Konfokal-Mikroskop	36
2.7.6 Durchflusszytometrie zur Zellzyklus-Analyse	36
2.7.7 Synchronisation von Zellen zur Zellzyklus-Analyse	36
2.8 Proteinbiochemische Methoden	37
2.8.1 Proteinernte	37
2.8.1.1 Gesamtzelllysat	37
2.8.1.2 Membranpräparation	37
2.8.1.3 Proteinernte zur Untersuchung von Phosphorylierungen	38
2.8.1.4 <i>In vitro</i> -Generation von SorICD	38
2.8.1.5 Versuche zum Abbau des SorICDs	39
2.8.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford	39
2.8.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	40
2.8.3.1 Eindimensionale Elektrophoresen	40
2.8.3.1.1 SDS-PAGE	40
2.8.3.1.2 InGEL Fluoreszenz	40
2.8.3.2 2-dimensionale Elektrophoresen	40
2.8.4 Immunologischer Proteinnachweis - Western Blot und Immundetektion	42
2.9 Klonierung	42
<u>3. Ergebnisse</u>	44
3.1 Mitose-Induktion nach Kopfaktivator-Stimulation von SorLA-exprimierenden Zellen	45
3.1.1 Spezifität von Histon H3P als Mitosemarker in der Immunfluoreszenz	46
3.1.2 Etablierung eines Systems zur Bestimmung der mitotischen Zellpopulation in der Durchflusszytometrie	47
3.1.3 Inkubation mit Kopfaktivator bewirkt keine Veränderung des Anteils mitotischer Zellen	50
3.1.4 Kopfaktivator hat keinen Einfluss auf die Proliferation von Zellen	51

3.2 Indirekte Signalübertragung durch Phosphorylierung	53
3.2.1 Der Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinase bleibt nach Kopf-aktivatorbehandlung unverändert	53
3.2.2 2D-Gelelektrophorese (Färbung mit Pro-Q [®] Diamond und DIGE)	54
3.3 Direkte Signalübertragung durch Freisetzung der Intrazellulärdomäne	58
3.3.1 SorLA ist ein Substrat der Gamma-Sekretase	58
3.3.1.1 Akkumulation von SorLAs CTF nach spezifischer Inhibition der γ -Sekretase	58
3.3.1.2. <i>In vitro</i> -Generation von SorICD	63
3.3.2 Translokation von SorICD in den Zellkern	65
3.3.2.1 Subzelluläre Verteilung von endogenem oder überexprimiertem SorICD	65
3.3.2.2 SorICD mit N-terminalem EGFP ist stabil und akkumuliert im Zellkern	68
3.3.2.3 Multimeres EGFP akkumuliert im Zellkern	71
3.3.2.4 Subzelluläre Verteilung von SorICD mit C-terminalem EGFP	74
3.3.3 Rasche Degradation des SorICD durch Proteasen	76
3.3.3.1 Degradierende Aktivität in endogen SorLA-exprimierenden Zellen	76
3.3.3.2 SorICD wird durch das Insulin-degradierende Enzym abgebaut	78
3.3.3.3 Überexpression von SorLA in Zellen mit dominant-negativem Insulin-degradierendem Enzym	82
4. Diskussion.....	86
4.1 Die zelluläre Antwort auf SorLA-vermittelte Signalkaskaden	87
4.2 Überprüfung von Phosphorylierungskaskaden nach KA-Stimulation	89
4.3 Signalübertragung durch sequentielle Proteolyse von SorLA	92
4.3.1 SorLA ist ein Substrat der γ -Sekretase	92
4.3.2 SorICD hat keinen Einfluss auf die Menge an Volllänge-SorLA	94
4.3.3 Kernlokalisierung von SorICD	95
4.3.4 Tetrameres EGFP ist stärker im Zytoplasma als im Kern lokalisiert	99
4.3.4 Ein freier N-Terminus von SorICD könnte dessen schnelle Degradation vermitteln	100
4.3.5 SorICD wird durch das Insulin-degradierende Enzym abgebaut	102

4.4 Modell der regulierten Intramembranproteolyse von SorLA	104
4.5 Zusammenhang zwischen SorLA und der Alzheimer Krankheit	107

<u>5. Zusammenfassung</u>	111
--	-----

<u>6. Literatur</u>	113
----------------------------------	-----

Anhang

I	Abbildungsverzeichnis
II	SorLA-Sequenz
III	Plasmidkarten
IV	Herstellerverzeichnis
V	Danksagung
VI	Publikationen und Kongressbeiträge
VII	Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

SORLA-TERMINOLOGIE

α -SorLA cp	Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne von SorLA
α -SorLA F3	Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von SorLA
cp	cytoplasmatischer Schwanz
CTF	C-terminales Fragment
CTF*	Künstliches C-terminales Fragment
CTF*-EGFP	Künstliches C-terminales Fragment mit EGFP-Anhang
DEGFP-MutSorICD	Fusionsprotein aus dimerem EGFP und SorICD mit mutiertem NLS
DEGFP-SorICD	Fusionsprotein aus dimerem EGFP und SorICD mit unmutiertem NLS
EGFP-MutSorICD	Fusionsprotein aus monomerem EGFP und SorICD mit mutiertem NLS
EGFP-SorICD	Fusionsprotein aus monomerem EGFP und SorICD mit unmutiertem NLS
F3	Fibronektin 3-Domäne
KHAA	Aminosäureabfolge Lysin-Histidin-Alanin-Alanin, Mutation des potentiellen Kernlokalisierungssignals
KHRR	Aminosäureabfolge Lysin-Histidin-Arginin-Arginin, potentielles Kernlokalisierungssignal
LR11	Low Density Lipoprotein Receptor Relative With 11 Ligand-binding Repeats
MetSorICD	künstliches zytoplasmatisches SorICD mit Start-Methionin
Sor β	SorLA-Analog zu p3 aus APP
SorICD	Intrazellulärdomäne von SorLA
SorICD-EGFP	Intrazellulärdomäne von SorLA mit EGFP-Anhang
SorLA	Sorting Protein-related Receptor Containing Low Density Lipoprotein Receptor Class A Repeats
SorLA-VL	SorLA-Volllänge
sSorLA	SorLA-Ektodomäne nach Schnitt der α -Sekretase

ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

2D	zweidimensional
2n	doppelter Chromosomensatz
2xEGFP	Dimeric Enhanced Green Fluoreszent Protein
3xEGFP	Trimeric Enhanced Green Fluoreszent Protein
4n	vierfacher Chromosomensatz
4xEGFP	Tetrameric Enhanced Green Fluoreszent Protein
6xEGFP	Hexameric Enhanced Green Fluoreszent Protein
7AAD	7-Amino-Actinomycin-D
A β	Amyloid- β -Peptid
A β 40	A β -Peptid mit 40 Aminosäureresten
A β 42	A β -Peptid mit 42 Aminosäureresten
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AICD	Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain
AK	Alzheimer Krankheit
α 2M	α -2 Makroglobulin
α -Sekretase	α -Schnittstelle prozessierende Protease, oft TACE oder ADAM

α -SorLA cp	Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne von SorLA
α -SorLA F3	Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von SorLA
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APH-1	Anterior Pharynx-defective phenotype
ApoE	Apolipoprotein E
ApoER2	Apolipoprotein E Receptor 2
APP	Amyloid Precursor Protein
APP ₆₉₅	neuronenspezifische Isoform des Amyloid Precursor Proteins mit 695 Aminosäureresten
APP ₇₇₀	Amyloid Precursor Protein, Splicevariante mit 770 ASPs
ART-27	Androgen-receptor Trapped Clone-27
ASR	Aminosäurerest
ATCC	American Type Culture Collection
BACE1	Beta-site APP Cleaving Enzyme
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
β -Sekretase bzw.	β -Schnittstelle prozessierende Protease, BACE1 beziehungsweise
CBP	Cyclic AMP Response Element Binding Protein Binding Protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat
cm	Zentimeter
CNR	Cadherin-related Neuronal Receptor
cp	cytoplasmatischer Schwanz
CREB	Cyclic AMP Response Element Binding Protein
CSL	C-Promotor Binding Factor/Supressor Of Hairless/Lag-1
C-Terminus	Carboxyterminus
CTF	C-terminales Fragment
CTF*	Künstliches C-terminales Fragment
CTF*-EGFP	Künstliches C-terminales Fragment mit EGFP-Anhang
Dab-1	Disabled-1
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-Butyl Ester
DCC	Deleted In Colorectal Cancer
DEGFP-MutSorICD	Fusionsprotein aus dimerem EGFP und SorICD mit mutiertem NLS
DEGFP-SorICD	Fusionsprotein aus dimerem EGFP und SorICD mit unmutiertem NLS
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DM	Definiertes Medium - serumfrei
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant-negativ
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluoreszent Protein
EGFP-MutSorICD	Fusionsprotein aus monomerem EGFP und SorICD mit mutiertem NLS
EGFP-SorICD	Fusionsprotein aus monomerem EGFP und SorICD mit unmutiertem NLS
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinase, MAPK-Untereinheiten

F3	Fibronektin 3
FANSHY	Aminosäureabfolge Phenylalanin-Alanin-Asparagin-Serin-Histidin-Tyrosin
FCS	Foetal Calf Serum, Fötale Kälberserum
Fe65	Amyloid Beta Precursor Protein-binding Family Member
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 ms ⁻²)
G1-Phase	Gap-Phase im Zellzyklus nach der mitotischen Teilung
G2-Phase	Gap-Phase im Zellzyklus nach der DNA-Replikation und vor der Mitose
γ-Sekretase	Intramembran-Protease-Komplex aus Presenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN-2
GAMPO	Goat Anti-Mouse Peroxidase
GARPO	Goat Anti-Rabbit Peroxidase
GDNF	Glia-derived Neurotrophic Factor
GGA-Protein	Golgi-localized, Gamma-ear Containing, ADP-ribosylation Factor Binding Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
H ₂ O _{dest}	Destilliertes Wasser
H3P	mitosespezifisch phosphoryliertes Histon H3
HAB	Head-activator Binding Protein
HEPES	Hydroxyethyl-piperazin-1-ethansulfonsäure
Hygro	Hygromycin-Resistenzgen
ICD	Intracellular Domain
IDE	Insulin-degrading Enzyme
IDE-DN, IDE-Mut	IDE mit E111Q-Mutation (dominant-negativ)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
IMF	Immunfluoreszenzfärbung
KA	Kopfaktivator
Kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KHAA	Aminosäureabfolge Lysin-Histidin-Alanin-Alanin, Mutation des potentiellen Kernlokalisierungssignals
KHRR	Aminosäureabfolge Lysin-Histidin-Arginin-Arginin, potentielles Kernlokalisierungssignal
kV	Kilovolt
L	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium, auch oft als Luria Bertani-Medium bezeichnet
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LDLRA	Low Density Lipoprotein Receptor Class A Repeats
LR11	Low Density Lipoprotein Receptor Relative With 11 Ligand-binding Repeats
LRP	LDLR Related Protein
M, Mut	Mutiert, Mutante
mA	Milliampère
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
Met	Methionin
MetSorICD	künstliches zytoplasmatisches SorICD mit Start-Methionin
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
MMC	Mitomycin C
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
Mut	mutiert
n	nuclear
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Nerve Growth Factor
NICD	Notch Intracellular Domain
NLS	Nuclear Localisation Signal
nM	Nanomolar
nm	Nanometer (Wellenlänge)
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NPxY	Aminosäureabfolge Asparagin-Prolin-beliebig-Tyrosin
N-Terminus	Aminoterminus
Opti-MEM	Modified Eagles Minimum Essential Medium
p	plasmatisch
P/S	Penicillin G und Streptomycin
p3-Fragment	durch α -Sekretase prozessiertes Analog zu A β
p75 ^{NTR}	Neurotrophin Receptor p75
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF-BB	Platelet-derived Growth Factor BB
PEN-2	Presenilin Enhancer
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii, Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIs	Complete Mini Protease-Inhibitoren
PKA	Protein Kinase A
PM	Plasmamembran
PP	Propeptid
PP1, PP2A, PP2B, PP2C	Threonin/Serin-spezifische Protein-Phosphatasen 1 und 2 A-C
PS1/2	Presenilin 1 oder 2
PSD-95	Post Synaptic Density Protein 95
PTB	Phospho-Tyrosin-Bindedomäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid (PVDF)
RAP	Receptor Associated Protein
Rb	Kaninchen
RIP	Regulierte Intramembran-Proteolyse
rpm	Rounds Per Minute
Rpm 800	Rainbow-Protein-Marker 800
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time quantitative Polymerase Chain Reaction
s	löslich (soluble)
S2P	Site-2 Protease
sAPP α / β	APP-Ektodomäne nach Schnitt der β - bzw. β -Sekretase
SAPs	Sphingolipid Activator Proteins
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

sek.	Sekunde(n)
SHH	Sonic Hedgehog
SOC-Medium	Super Optimal Broth (SOB) with Catobolite Repression
Sor β	SorLA-Analog zu p3 aus APP
SorICD	Intrazellulärdomäne von SorLA
SorICD-EGFP	Intrazellulärdomäne von SorLA mit EGFP-Anhang
SorLA	Sorting Protein-related Receptor Containing Low Density Lipoprotein Receptor Class A Repeats
SorLA-VL	SorLA-Volllänge
SP	Signalpeptid
S-Phase	DNA-Synthese-Phase im Zellzyklus
SPP	Signalpeptid-Peptidase
sSorLA	SorLA-Ektodomäne nach Schnitt der α -Sekretase
swAPP	„Schwedische“ Mutation (K595N/M596L) im Amyloid Precursor Protein
TACE	Tumour Necrosis Factor α Convertase, auch ADAM17 genannt
Taq-DNA Polymerase	DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline + Tween20
THG-1a	Transforming Growth Factor β -stimulated Clone-22 Homologue-1a
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA	Tropomyosin Receptor Kinase A
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
V	Volt
VL	Volllänge
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Receptor
VM	Vollmedium - serumhaltig
VPS10-D	Vacuolar Protein Sorting 10 Protein-Domäne
Vps10p	Vacuolar Protein Sorting 10 Protein
Wnt	Wingless-type Murine Mammary Tumor Virus Integration Site Family Member
WT	Wildtyp
YAP	Yes Associated Protein
YWTD	Aminosäureabfolge Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Aspartat
z.B.	zum Beispiel

EINLEITUNG

1. Einleitung

Die komplexe Organisation eines vielzelligen Organismus bedarf der Kommunikation einzelner Gewebe und Zellen. Im Laufe der Evolution haben sich viele verschiedene Mechanismen der Übertragung von Signalen etabliert. Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung der Mechanismen, die an der durch den humanen Typ-I-Transmembranrezeptor SorLA (Sorting Protein-related Receptor Containing Low Density Lipoprotein Receptor Class A Repeats) vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind.

1.1 Struktur des Transmembranrezeptors SorLA

SorLA, das Genprodukt von SORL1 auf Chromosom 11q23/24, wurde 1996 zum ersten Mal beschrieben (Jacobsen et al., 1996; Yamazaki et al., 1996). Es gehört aufgrund seiner 11 Wiederholungen der ligandenbindenden Domäne vom Komplement-Typ (Low Density Lipoprotein Receptor Class A Repeats, LDLRA) und den 5 YWTD-Domänen zur Familie der LDL- (Low Density Lipoprotein) Rezeptoren (Abb. 1.1). Ein Synonym für SorLA ist daher auch LR11 (Low Density Lipoprotein Receptor Relative With 11 Ligand-binding Repeats) (Yamazaki et al., 1996). Zusätzlich zu den typischen Merkmalen dieser LDL-Rezeptorfamilie enthält SorLA eine N-terminale VPS10- (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) und eine Fibronectin 3- (F3) Domäne (Jacobsen et al., 1996; Yamazaki et al., 1996). Somit stellt SorLA ein Bindeglied zwischen den multifunktionellen Familien der LDL- und der Vps10-Domänen-tragenden Rezeptoren dar. Neben der sehr großen, N-terminalen Ektodomäne besitzt SorLA eine mit 56 Aminosäureresten sehr kurze zytoplasmatische Domäne. Diese enthält die Aminosäurereste-Abfolge FANSHY, die als potentiell Internalisierungssignal, das die endozytotische Wiederaufnahme des Rezeptors von der Zelloberfläche ins Innere vermittelt, betrachtet wird (Jacobsen et al., 1996).

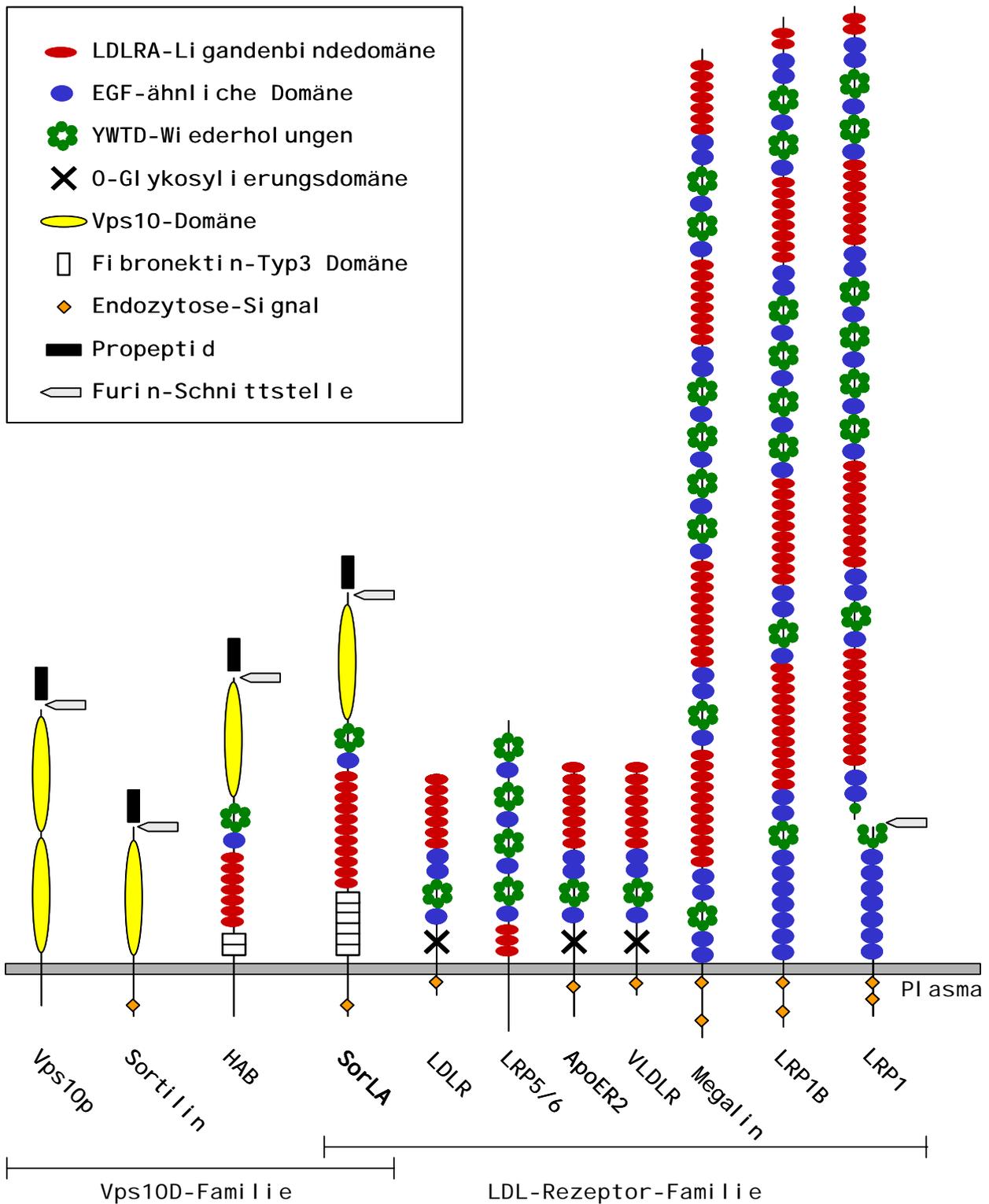


Abb. 1.1: Schematischer Vergleich der Strukturmerkmale von SorLA und verwandten Typ-I-Transmembranrezeptoren

Zur Familie der LDL-Rezeptoren gehören u.a. der Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR), LRP1, LRP1B, LRP5 und 6 (LDLR Related Protein), ApoER2 (Apolipoprotein E Receptor 2 = LRP8), VLDLR (Very Low Density Lipoprotein Receptor) und Megalin (= LRP2). Als Vertreter der Familie von Rezeptoren mit Vps10-Domäne (Vps10D) sind hier HAB (Head-activator Binding Protein), Sortilin und Vps10p (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) dargestellt.

LDLRA: Low Density Lipoprotein Receptor Class A Repeats; EGF: Epidermal Growth Factor; YWTD: Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Aspartat-Sequenz

1.2 SorLA als Neuropeptidrezeptor

Auffällig in Abbildung 1.1 ist die konservierte Domänenstruktur von SorLA im Vergleich zu seinem Ortholog HAB (Head-activator Binding Protein) aus dem Süßwasserpolypen *Chlorohydra viridissima*. HAB bindet das Neuropeptid Kopfaktivator (KA), welches spezifische Vermehrungs- und Differenzierungsprozesse bei der Ausbildung der Kopffregion in *Hydra* einleitet (Hampe et al., 1999; Schaller et al., 1989b; Bodenmüller and Roberge, 1985). Die Expression von HAB-mRNA in *Hydra* kennzeichnet Bereiche, in denen eine Differenzierung zu kopf- oder fußspezifischen Zellen stattfindet. Weiterhin wurde HAB als membranständige und sekretierte Form in *Hydra* identifiziert, wonach eine Regulation der Aktionsreichweite von Kopfaktivator durch HAB postuliert wird (Hampe et al., 1999).

Kopfaktivator wurde auch aus anderen tierischen Quellen sowie aus humanem Gehirn und Tumoren neuronalem oder neuroendokrinem Ursprungs isoliert (Schawaller et al., 1988; Bodenmüller and Schaller, 1981). Nicht nur in differenzierenden embryonalen Hirn- und Darmstrukturen von Mensch und Ratte sondern auch im adulten humanen Gehirn gelang der Nachweis von KA (Schaller et al., 1989b). *In vitro* werden neuronale Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus durch KA zur Einleitung der Mitose stimuliert (Schaller et al., 1989a) wobei ein Kalzium-Influx eine wichtige Rolle spielt (Ulrich et al., 1996). Bei der Suche nach humanen Orthologen von HAB wurde SorLA identifiziert (Hampe et al., 1999), dessen VPS10-Domäne mit nanomolarer Affinität Kopfaktivatorpeptide bindet (Lintzel et al., 2002). Als Folge der Bindung von KA konnte eine verstärkte Prozessierung der Ektodomäne, die in den Kulturüberstand entlassen wird, sowie ein positives Feedback auf die SorLA-Synthese festgestellt werden (Hampe et al., 2000).

Neben Kopfaktivator bindet SorLA sein eigenes Propeptid (Lintzel et al., 2002) und GDNF (Glia-derived Neurotrophic Factor) (Westergaard et al., 2004) an der VPS10-Domäne. Ein weiterer Ligand, RAP (Receptor Associated Protein), der an viele LDL-Rezeptoren (Bu and Schwartz, 1998; Bu, 2001) sowie an Sortilin bindet (Petersen et al., 1997), assoziiert mit SorLA sowohl über dessen VPS10-Domäne als auch die LDLRA-Wiederholungen (Lintzel et al., 2002). Apolipoprotein E (ApoE)-reiche Lipo-

proteine wie z.B. β -VLDL (β -Very Low Density Lipoprotein) (Jacobsen et al., 1996; Taira et al., 2001), Lipoprotein-Lipase (Jacobsen et al., 2001), PDGF-BB (Platelet-derived Growth Factor-BB) und Komponenten des Plasminogen-aktivierenden Systems (Gliemann et al., 2004) werden durch die LDLRA-Wiederholungen gebunden. Für PDGF, RAP und ApoE-reiche Lipoproteine wie β -VLDL konnte eine Internalisierung durch SorLA gezeigt werden (Gliemann et al., 2004; Taira et al., 2001).

In Übereinstimmung mit einer Funktion als Neurorezeptor liegt eine starke Expression von SorLA im adulten Gehirn vor, hauptsächlich in Neuronen des Cortex, Hippocampus, des Kleinhirns, des Hirnstamms und der Purkinje-Zellen (Motoi et al., 1999; Hermans-Borgmeyer et al., 1998). In Mäuse-Embryonen findet sich SorLA-mRNA in Neuronen des cerebralen Cortex vor der finalen Differenzierung (Hermans-Borgmeyer et al., 1998). Weiterhin wurde SorLA-mRNA in Hoden, Leber, Pankreas und adrenergen Drüsen von Kaninchen (Yamazaki et al., 1996) sowie im Hoden und Rückenmark von Menschen (Jacobsen et al., 1996) nachgewiesen. Die subzelluläre Verteilung zeigt etwa 10% oberflächenassoziiertes SorLA, die restlichen 90% sind intrazellulär, hauptsächlich im Golgi-Apparat, lokalisiert (Jacobsen et al., 2001).

Die starke evolutionäre Konservierung von SorLA von frühen mehrzelligen Organismen mit ersten Ansätzen von Nervensystemen bis hin zum Menschen lässt auf eine wichtige Funktion in der Entwicklung und/oder Aufrechterhaltung neuronaler Strukturen schließen. SorLA-defiziente Mäuse sind jedoch lebensfähig und fertil und zeigen keine augenscheinlichen Defizite in der Gehirnarchitektur (Andersen et al., 2005), was auf redundante Mechanismen hindeuten könnte. Redundanz ist für entwicklungsbiologisch essentielle Proteine nicht ungewöhnlich (siehe nächstes Kapitel).

1.3 Signaltransduktion in der Familie der LDL-Rezeptoren

Wie in Abbildung 1.1 gezeigt, vereint SorLA Strukturmerkmale der Rezeptoren mit Vps10-Domäne mit denen der Familie der LDL (Low Density Lipoprotein)-Rezeptoren. Der Namensgeber dieser Familie, der LDL-Rezeptor (LDLR), spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Cholesterol-Haushalts und der Eliminierung der LDL aus dem Blutkreislauf. Über ein NPxY-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne des LDLR wird die Endozytose des Komplexes aus LDLR und Ligand über Clathrin-ummantelte Vesikel vermittelt (Herz, 2001; Chen et al., 1990). Außer dieser endozytotischen wurde bisher keine weitere Funktion für den LDLR beschrieben. Die Funktionen anderer Mitglieder der Familie gehen jedoch weit über eine Aufnahme von Lipoprotein-Partikeln hinaus. Hier soll ein kleiner Einblick in die Beteiligung von Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie an Signalweiterleitungen gegeben werden.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Lipoproteinrezeptoren an einer Signalkaskade gaben VLDLR- (Very Low Density Lipoprotein Receptor) und ApoE-Rezeptor 2 (ApoER2)-defiziente Doppel-Knockout-Mäuse (Trommsdorff et al., 1999). Diese Tiere zeigten Defizite in der neuronalen Positionierung. Das intrazelluläre Adapterprotein Dab-1 (Disabled-1) bindet mit seiner Phospho-Tyrosin-Bindedomäne (PTB) an das NPxY-Motiv der Rezeptoren. Mittlerweile ist bekannt, dass die Bindung des extrazellulären Liganden Reelin an die Rezeptoren die intrazelluläre Tyrosin-Phosphorylierung von Dab-1 bewirkt (Herz, 2001; Tissir and Goffinet, 2003). Die Phosphorylierung könnte über Cadherin-verwandte Neuronale Rezeptoren (CNRs) oder $\alpha_3\beta_1$ -Integrine, beides neuronale Ko-Rezeptoren für Reelin, vermittelt werden, da diese Kinasen in die unmittelbare Nähe zu Dab-1 rekrutieren. Die Dab-1-Phosphorylierung, so wird postuliert, führt zu einer Signaltransduktion über die Aktivierung von Nichtrezeptor-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Nykjaer and Willnow, 2002; Andersen and Petersen, 2003; Beffert et al., 2004). Aufgrund der Redundanz von VLDLR und ApoER2 in der Reelin-vermittelten Signalübertragung entstand erst durch die Ausschaltung der Gene für beide Rezeptoren ein spezifischer Phänotyp.

Das Konzept der Ligandenbindung in Kombination mit Ko-Rezeptoren ist ein weitverbreitetes Prinzip in der Familie der LDL-Rezeptoren. Es ermöglicht die Erken-

nung einer Vielzahl von Liganden und damit eine Vielzahl von Funktionen. Das multifunktionelle LRP1 (LDLR Related Protein 1), ein gut untersuchtes Mitglied der Familie, bindet so über 30 verschiedene Liganden und ist am Lipidmetabolismus, an der Regulation extrazellulärer Proteinasen und ihrer Inhibitoren, der zellulären Signaltransduktion und der Neurotransmission beteiligt (Herz and Strickland, 2001). So kommt es z.B. in postsynaptischen Membranen nach Bindung des hochaffinen Liganden α 2-Makroglobulin (α 2M), einem Proteaseinhibitor, an LRP1 zu einem Kalzium-Influx. Dieser wird durch den N-methyl-D-aspartat-(NMDA)-Rezeptor vermittelt. Eine Interaktion der beiden Rezeptoren könnte direkt oder über das intrazelluläre Adapterprotein PSD-95 (Post Synaptic Density Protein 95) stattfinden (Nykjaer and Willnow, 2002).

Weiterhin sind die Familienmitglieder LRP5 und LRP6 wichtige Ko-Rezeptoren im Wnt-Signalweg (Herz, 2001; Nykjaer and Willnow, 2002) und Megalin spielt in der Neuroentwicklung eine Rolle bei der Signalübertragung durch SHH (Sonic Hedgehog), vermutlich über die Internalisierung des SHH-Rezeptors Patched (McCarthy and Argraves, 2003).

LRP1 zeigt die vermutlich höchste Endozytoserate aller Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie (Rebeck et al., 2006). Über eine gesteuerte Endozytose der Ko-Rezeptoren ist LRP1 mitverantwortlich für die Exposition dieser Ko-Rezeptoren an der Plasmamembran (Gonias et al., 2004). Ein Beispiel ist die Regulation der Menge des uPA (Urokinase-type Plasminogen Activator) Rezeptors an der Plasmamembran. SorLA wirkt in diesem Fall als LRP1-Antagonist. Eine langsamere Internalisierung des Rezeptor-Liganden Komplexes durch SorLA wirkt stabilisierend auf die Exposition des uPA-Rezeptors an der Plasmamembran und bewirkt dadurch die Migration von vaskulären, glatten Muskelzellen (Zhu et al., 2004; Gliemann et al., 2004).

1.4 Funktionen der Rezeptoren mit Vps10-Domäne

Die Vps10-Domäne ist benannt nach dem Hefe-Rezeptor Vps10p (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein), der die Carboxypeptidase Y zwischen spätem Golgi-Apparat und prevakuolären endosomen-ähnlichen Kompartimenten sortiert (Marcusson et al., 1994). Zur Familie der humanen Rezeptoren mit Vps10-Domäne gehören neben SorLA nur 4 weitere Proteine: der Neurorezeptor Sortilin (Petersen et al., 1997) und die bisher wenig charakterisierten SorCS1 bis 3 (Hampe et al., 2001).

Sortilin, auch als Neurotensin Receptor-3 bezeichnet, bindet und internalisiert das Neuropeptid Neurotensin (Navarro et al., 2001). Auch Sortilin ist an verschiedenen Signalübertragungswegen beteiligt. Nach der Bindung von Neurotensin kommt es zu einer Aktivierung des MAPK- (Mitogen-activated Protein Kinase) Weges und anschließend zur Genexpression von verschiedenen Zytokinen (Dicou et al., 2004).

Weiterhin ist Sortilin an der Einleitung der Apoptose durch das Vorläuferprotein von NGF (Nerve Growth Factor) beteiligt. Reifes NGF bindet an p75^{NTR} (Neurotrophin-Receptor p75) und/oder TrkA (Tropomyosin Receptor Kinase A) und induziert ein Überleben der Nervenzellen. Dagegen bindet das NGF-Vorläuferprotein an Komplexe aus Sortilin und p75^{NTR}, wodurch in den Zellen die Apoptose eingeleitet wird (Nykjaer et al., 2004).

Eine weitere, interessante Aufgabe übernimmt Sortilin in der Sortierung von SAPs (Sphingolipid Activator Proteins) zwischen Golgi-Apparat und Lysosomen unter Beteiligung von GGA-Proteinen (Golgi-localized, Gamma-ear Containing, ADP-ribosylation Factor Binding Protein) (Lefrancois et al., 2003; Hassan et al., 2004; Ni et al., 2006).

Die Zugehörigkeit SorLAs zur Familie der Rezeptoren mit Vps10-Domäne und die Tatsache, dass auch SorLA GGA-Proteine bindet (Jacobsen et al., 2002), deuten auf eine mögliche Funktion von SorLA in Proteinsortierungsprozessen hin.

1.5 LDL-Rezeptoren in der Alzheimer Krankheit

Der LDL-Rezeptor wird im Gehirn nur schwach, LRP1 hingegen stärker exprimiert (Andersen and Willnow, 2006; Thilakawardhana et al., 2005; Tooyama et al., 1995). LRP1 spielt in Neuronen eine Rolle in der Cholesteroll-Homöostase sowie bei der Neurotransmission (Harris-White and Frautschy, 2005). Es scheint auch auf verschiedene Weise an der Akkumulation des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$), einer pathogenen Komponente in der Alzheimer Krankheit (AK) beteiligt zu sein. $A\beta$ ist der Hauptbestandteil der extrazellulären senilen Plaques, die in den Gehirnen erkrankter Personen gefunden werden (Blennow et al., 2006). Obwohl einige Arbeitsgruppen LRP1 als eine genetische Komponente bei der Entstehung der spät einsetzenden Form der Alzheimer Krankheit ansehen, wird bisher vor allem sein Ligand ApoE, der auch an SorLA bindet, als genetischer Risikofaktor beschrieben (Harris-White and Frautschy, 2005; Waldron et al., 2006). Das Gen für ApoE kommt im Menschen in den Allelen $\epsilon 2$, 3 und 4 vor, wobei bereits heterozygote Träger des Allels $\epsilon 4$ ein signifikant höheres Risiko aufweisen, an der späten Form der Krankheit zu erkranken (Corder et al., 1993). LRP1 und einige seiner Liganden wurden in den senilen Plaques nachgewiesen (Waldron et al., 2006). Weiterhin kann an $\alpha 2$ -Makroglobulin oder ApoE gebundenes $A\beta$ durch LRP1 aus dem Zellüberstand *in vitro* entfernt werden (Van Uden et al., 2000). Für die Familienmitglieder LRP1B und ApoER2 wurden kürzlich ebenfalls Hinweise auf einen möglichen Einfluss dieser Rezeptoren auf die Entstehung von $A\beta$ beschrieben (Cam and Bu, 2006).

2004 wurde über eine verminderte SorLA-Expression in Gehirnen von Patienten mit der Alzheimer Krankheit berichtet, was auch für eine Beteiligung von SorLA an der AK-Pathogenese spricht (Scherzer et al., 2004).

1.5.1 Die Prozessierung des Amyloiden Vorläuferproteins

Zunächst soll hier auf die Entstehung des pathogenen A β -Peptids eingegangen werden. Dieses entsteht durch sequentielle proteolytische Spaltung des Amyloiden Vorläuferproteins APP (Amyloid Precursor Protein), einem Typ-I-Transmembranprotein (Abb. 1.2). Zunächst erfolgt die Abspaltung (Shedding) der Ektodomäne durch die β -Sekretase BACE1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme) (Vassar et al., 1999). Diese Ektodomäne (sAPP β) wird in den Extrazellulärraum abgegeben. Das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (β CTF) wird unmittelbar anschließend durch die γ -Sekretase, einem Komplex aus Presenilin 1 oder 2 (PS1/2), Nicastrin, APH-1 (Anterior Pharynx-defective phenotype) und PEN-2 (PS-enhancer), prozessiert (Edbauer et al., 2003; Haass, 2004). Interessant an diesem Schnitt ist, dass er das Fragment innerhalb seiner Transmembrandomäne spaltet und keine Sequenzspezifität zeigt. Es resultieren aus dieser Prozessierung A β -Peptide mit 37 bis 43 Aminosäureresten (A β 37-A β 43). A β 40 und 42 stehen im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit, wobei A β 42 aufgrund seiner Neigung Aggregate zu bilden, die pathogenere Wirkung zukommt (Cam and Bu, 2006; Haass, 2004; Wolfe, 2006).

Neben diesem amyloidogenen Weg konnte auch eine nicht-amyloidogene Prozessierung von APP beobachtet werden. Dabei erfolgt die Abspaltung der Ektodomäne (sAPP α) nicht an der β -, sondern an der α -Schnittstelle durch Zink-Metalloproteasen, u.a. durch TACE (Tumour Necrosis Factor α Convertase, auch ADAM17 genannt), ADAM9 oder ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase) (Allinson et al., 2003). Diese α -Schnittstelle liegt innerhalb der A β -Sequenz und führt nach der Prozessierung durch die γ -Sekretase zur Freisetzung des nicht-pathogenen p3-Fragments (Haass et al., 1993; Haass, 2004; Lichtenthaler, 2006). Die γ -Sekretase schneidet in beiden Wegen nicht nur an der A β 40-42-Schnittstelle, sondern gleichzeitig auch nahe dem zytoplasmatischen Ende der Transmembrandomäne (ϵ -Schnitt), wodurch die Intrazellulärdomäne (AICD) freigesetzt wird (Haass, 2004).

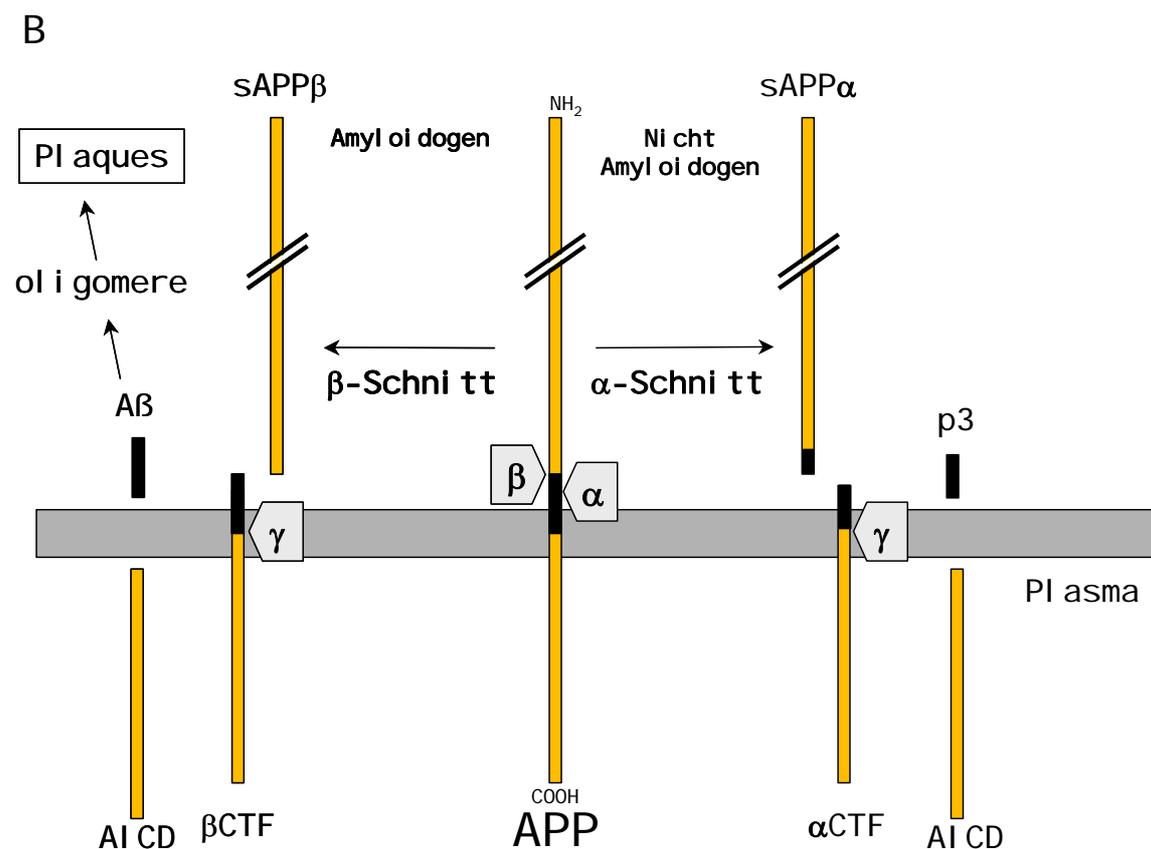
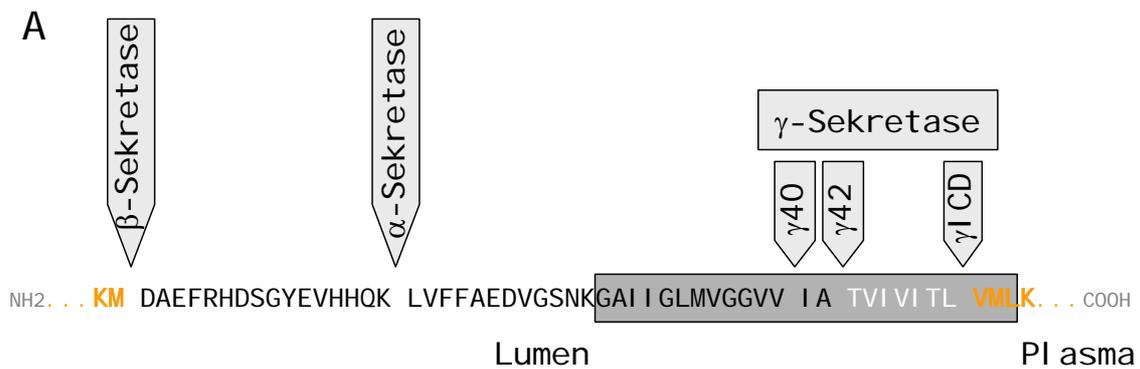


Abb. 1.2: Prozessierung des Amyloiden Vorläuferproteins APP

A) Schnittstellen der Sekretasen im APP-Molekül. Die Transmembransequenz ist grau unterlegt. Die Aβ-Sequenz ist in schwarzen Buchstaben dargestellt (nach Haass, 2004). B) Amyloidogene (links) und nicht-amyloidogene (rechts) Prozessierung von APP. Beschreibung siehe Text.

Die α-Sekretase-Aktivität findet sich hauptsächlich in der Plasmamembran, wohin APP im Laufe seines Reifungsprozesses gelangt (Vetrivel and Thinakaran, 2006). BACE1 wird hingegen im Golgi-Apparat und in Endosomen gefunden, bevorzugt eine cholesterolreiche Umgebung und zeigt die höchste Aktivität im sauren Milieu (Vassar et al., 1999). Nur etwa 6% der γ-Sekretase-Komplexe kommen an der Plasmamembran vor, der Rest wurde im ER, im Golgi-Apparat, im Trans-Golgi-Netzwerk und in

späten Endosomen gefunden (Vetrivel and Thinakaran, 2006). Allerdings wird zur Zeit sehr kontrovers diskutiert, wo genau der Schnitt durch die γ -Sekretase vollzogen wird (Kaether et al., 2006). Die Vermutung liegt nahe, dass APP für die amyloidogene Prozessierung internalisiert werden muss. Eine Inhibierung der Endozytose führt tatsächlich zu einer Verminderung in der A β -Produktion (Koo and Squazzo, 1994). Obwohl APP eigene Internalisierungssignale besitzt, spielen Mitglieder der Familie der LDL-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Sortierung von APP (Cam and Bu, 2006).

1.5.2 Die Rolle von LRP1 und SorLA bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit

Für LRP1 konnte bereits früh gezeigt werden, dass es APP über das Adapterprotein Fe65 bindet und internalisiert (Trommsdorff et al., 1998; Kinoshita et al., 2003; Minopoli et al., 2001; Review in Waldron et al., 2006). Vermutlich ist diese Internalisierung für die im Vergleich zu LRP1^{-/-}-Zellen erhöhte A β - und verminderte sAPP α -Produktion in endogen LRP1-exprimierenden Zellen verantwortlich. Die Internalisierung befördert APP in Zellkompartimente mit β -Sekretase-Aktivität und entfernt es von der Plasmamembran, an der hauptsächlich die nicht-amyloide Prozessierung stattfindet (Cam and Bu, 2006). ApoE4 wirkt – vermutlich durch Beeinflussung des LRP1-vermittelten Recyclings von APP - verstärkend auf die Produktion von A β (Ye et al., 2005). LRP1B, das ähnlich wie LRP1 strukturiert ist, aber eine deutlich geringere Endozytoserate aufweist, bewirkt bei Überexpression eine verminderte A β -Ausschüttung in den Zellüberstand (Cam and Bu, 2006).

Auch für SorLA konnte eine Interaktion mit APP gezeigt werden (Andersen et al., 2005). Die Ektodomäne bindet über die 11 LDLRA-Wiederholungen die Kohlenhydrat-Domäne von APP im Verhältnis 1:1 (Andersen et al., 2006). Zusätzlich konnte auf eine bisher nicht weiter charakterisierte intrazelluläre Interaktion geschlossen werden (Spoelgen et al., 2006). Durch die Interaktion mit SorLA wird die subzelluläre Lokalisation von APP verändert: Die Komplexe werden nun hauptsächlich

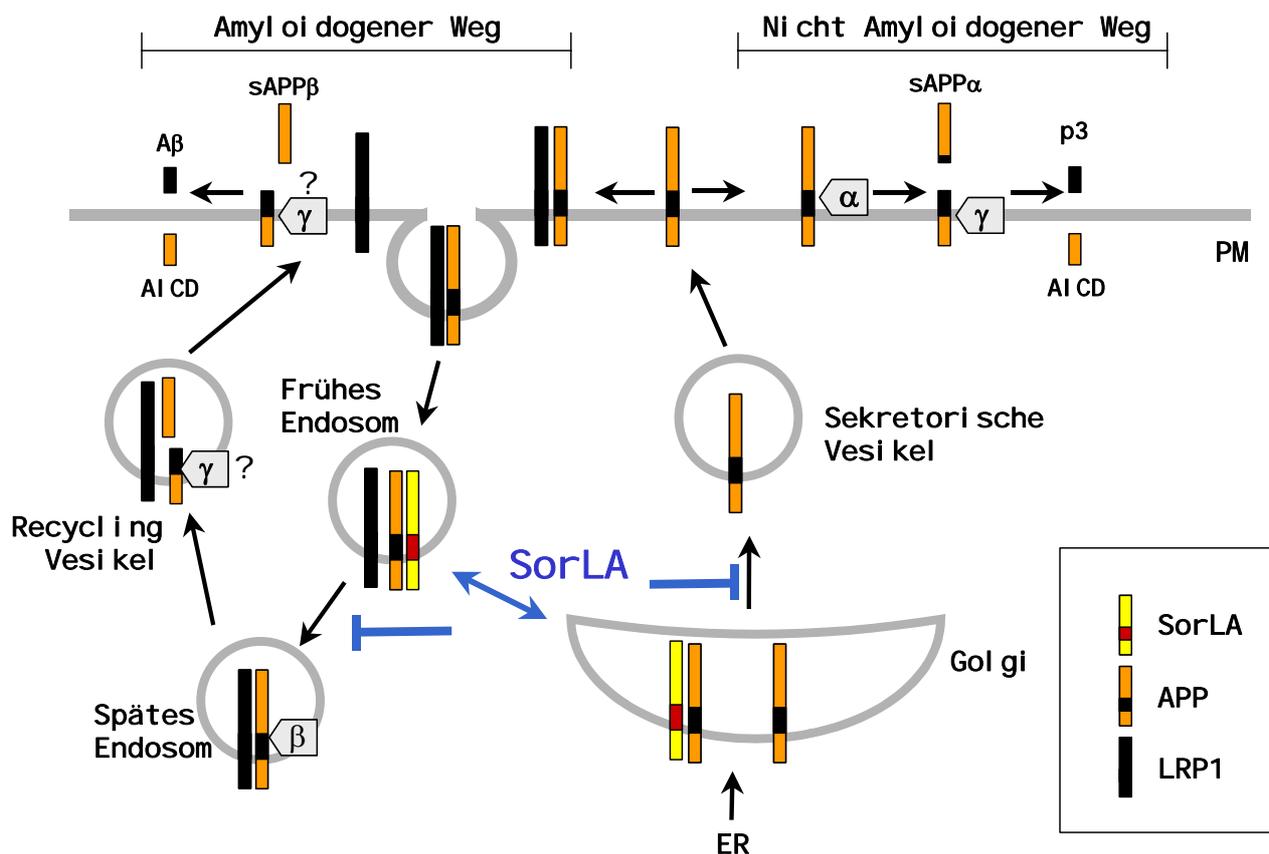


Abb. 1.3: Modell der Sortierung von APP durch SorLA und LRP

APP muss erst auf dem sekretorischen Weg an die Plasmamembran (PM) gelangen, um auf dem nicht-amyloidogenen Weg durch α - und γ -Sekretase prozessiert zu werden. Alternativ kann APP über LRP1-vermittelte Endozytose in die späten Endosomen gelangen, wo die Prozessierung durch die β -Sekretase stattfindet. Über Recycling-Vesikel, die LRP1 an die Plasmamembran zurücktransportieren, können die Spaltprodukte wieder an die Zelloberfläche gelangen, wo $A\beta$ und $sAPP\beta$ in den Extrazellulärraum entlassen werden. Nicht geklärt ist, ob der γ -Sekretaseschnitt schon auf dem Weg zur oder erst an der Plasmamembran stattfindet. SorLA hält als Sortierungsrezeptor APP in intrazellulären Kompartimenten wie Golgi-Apparat und/oder frühen Endosomen zurück und verringert so die Zugänglichkeit von APP zur β -Sekretase. Ob dies hauptsächlich durch verminderten Transport von APP an die Plasmamembran oder durch Rücktransport aus den Endosomen in den Golgi-Apparat ausgelöst wird, ist nicht geklärt.

AICD = Intrazellulärdomäne von APP; ER = Endoplasmatisches Retikulum; sAPP = Ektodomäne von APP.

in endosomalen und Golgi-Kompartimenten gefunden (Abb. 1.3). Diese Umverteilung führt zu einer verminderten Produktion von $A\beta$ (Andersen et al., 2005; Andersen et al., 2006; Offe et al., 2006). In Analogie zeigen SorLA-defiziente-Mäuse eine erhöhte Menge $A\beta$ im Gehirn (Andersen et al., 2005). Bisher ist unklar, ob durch die Interaktion der sekretorische Weg an die Plasmamembran unterbrochen wird, oder ob ein Rücktransport von internalisiertem APP aus frühen Endosomen in den Golgi-Apparat stattfindet, und dadurch weniger APP in die späten Endosomen mit erhöhter

β -Sekretase-Aktivität gelangt (Andersen et al., 2005). Ein Einfluss von SorLA auf die Sortierung von APP steht im Einklang mit der oben bereits erwähnten Hypothese, dass SorLA aufgrund seiner Verwandtschaft zum Hefe-Transportprotein Vps10p und der intrazellulären Interaktion mit GGA1 und -2 am Transport von Proteinen zwischen Endosomen und Golgi-Apparat beteiligt ist (Jacobsen et al., 2002). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beschreibung einer indirekten Bindung von GGA-Proteinen an APP (von Arnim et al., 2006). Eine SorLA-vermittelte Endozytose von APP wurde nicht beobachtet (Spoelgen et al., 2006).

In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Beobachtungen wurde in Gehirnen von Patienten mit der spät einsetzenden Form der Alzheimer Krankheit eine verminderte SorLA-Expression in besonders von der Krankheit betroffenen Regionen wie dem frontalen Cortex beobachtet. In nicht-betroffenen Hirnregionen konnte keine Veränderung in der SorLA-Expression festgestellt werden (Offe et al., 2006; Dodson et al., 2006), ebensowenig in Gehirnen von Patienten mit der familiären Form der AK. Die familiäre Form der Alzheimer Krankheit ist selten und beruht auf Defekten in den Genen für APP oder eines der beiden Preseniline, die die katalytisch aktive Komponente der γ -Sekretase darstellen. Diese Defekte führen zur Bildung von großen Mengen Plaque-bildenden A β 42-Peptiden, wodurch die Krankheit bereits früh ausbricht (Blennow et al., 2006). Die verminderte SorLA-Expression in Gehirnen von Personen, die an der spät einsetzenden Form der Krankheit litten, spricht dafür, dass SorLA einen Einfluss auf die A β -Akkumulationen hat und nicht von dieser ausgelöst wird (Dodson et al., 2006).

Sowohl LRP1 (May et al., 2002; Lleo et al., 2005) als auch SorLA (Bohm et al., 2006) wurden als Substrate für die γ -Sekretase identifiziert und könnten als kompetitive Inhibitoren die Prozessierung von APP vermindern. Vermutlich kann allerdings eher davon ausgegangen werden, dass die γ -Sekretase-Prozessierung dieser Rezeptoren an deren Regulation beteiligt ist, worauf im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

Die Kontrolle der A β -Generierung und -Akkumulation wird als wichtiger therapeutischer Ansatz zur Behandlung und Prophylaxe der Alzheimer Demenz betrachtet und involvierte Proteine sind als potentielle Behandlungsansätze Schwerpunkt

intensiver Forschung. Auch die Aufklärung der Rolle von SorLA in der AK-Pathogenese wird in nächster Zeit wohl intensiv bearbeitet werden.

1.6 Regulierte Intramembran-Proteolyse

Die im oberen Abschnitt beschriebene Prozessierung von APP ist ein Beispiel für einen besonderen Mechanismus der zellulären Signalübertragung, der Regulierten Intramembran-Proteolyse (RIP). Die heterogene Familie der Proteasen, die die intramembrane Prozessierung katalysieren, ist evolutionär stark konserviert und auch in Prokaryoten und Archaeobakterien vertreten. Zu ihr gehören Aspartat-Proteasen inklusive der γ -Sekretase, deren katalytische Aktivität durch die Presenilin-Untereinheit vermittelt wird, und der Signalpeptid-Peptidase (SPP), Zink-Metalloproteasen der S2P- (Site-2 Protease-) Familie und Serinproteasen der Rhomboid-Familie (Landman and Kim, 2004; Weihofen and Martoglio, 2003; Ehrmann and Clausen, 2004). Kennzeichnend für den RIP-Mechanismus sind die Prozessierung der Typ-I- (γ -Sekretase und Rhomboide) bzw. Typ-II- (S2P und SPP) Transmembranproteine innerhalb der Lipiddoppelschicht und die Freisetzung eines biologisch aktiven Fragmentes (Landman and Kim, 2004).

Die beschriebene sequentielle Proteolyse des APPs wird durch dessen Lokalisation in subzellulären Kompartimenten reguliert. In anderen Fällen erfolgt die Regulation durch Liganden-induzierte Abspaltung der Ektodomäne mit Hilfe von α -Sekretasen. Allgemein erkennen die Intramembran-Proteasen, mit Ausnahme der Rhomboide, nur solche Substrate, die bereits durch mindestens einen proteolytischen Schnitt „markiert“ wurden (Landman and Kim, 2004).

Die Signalweiterleitung durch den Notch-Rezeptor gilt als typisches und gut charakterisiertes Beispiel Liganden-abhängiger RIP. Notch-Homologe sind in der Evolution von *Caenorhabditis elegans* bis hin zum Menschen stark konserviert. In Säugetieren spielt es u.a. eine wichtige Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Es wird als Präproprotein synthetisiert und durch Abspaltung des Propeptides durch eine Furin-ähnliche Protease aktiviert. Nach Bindung eines seiner Liganden, Delta oder Jagged/Serrate, ebenfalls Typ-I-Transmembranproteine,

kommt es zur Abspaltung der Ektodomäne durch eine Metalloprotease aus der ADAM-Familie (Selkoe and Kopan, 2003). Das verbleibende membranständige Fragment kann nun – wie APP - durch die Nicastrin-Untereinheit der γ -Sekretase erkannt werden (Shah et al., 2005). Die durch die γ -Sekretase ins Zytoplasma freigesetzte Intrazellulärdomäne (NICD) trägt ein NLS (Nuclear Localisation Signal) und kann nun in den Nukleus gelangen (Schroeter et al., 1998; Lewis, 1998; De Strooper et al., 1999). Dort interagiert sie mit Transkriptionsfaktoren der CSL (C-Promotor Binding Factor/Suppressor Of Hairless/Lag-1) Familie, wodurch diese von Transkriptions-Repressoren zu -Aktivatoren werden und die Expression von Zielgenen einleiten. Diese kodieren u.a. für basische Helix-Loop-Helix Proteine, die ihrerseits die Expression von Genen für die neuronale Differenzierung unterdrücken. So wird ein physiologisches Verhältnis von Neuronen zu Gliazellen erreicht (Bray, 2006; Bianchi et al., 2006). Auch die Liganden unterliegen dieser presenilin-abhängigen RIP, wodurch die Signalvermittlung sogar bidirektional stattfinden und auch auf Liganden-präsentierende Zellen wirken kann (Landman and Kim, 2004).

Die Anzahl an Typ-I-Transmembranproteinen, für die eine presenilinabhängige RIP gezeigt werden konnte, steigt ständig an, ebenso die vielfältigen Funktionen der freigesetzten, biologisch aktiven Fragmente. Weitere Substrate sind z.B. LRP1, dessen freigesetzte Intrazellulärdomäne mit der von APP um das Adaptermolekül Tip60, einer Histon-Acetyltransferase konkurriert (May et al., 2002; Kinoshita et al., 2003), CD44 und N-cadherin, deren Intrazellulärdomänen direkte Gegenspieler in der Aktivierung von CBP- (Cyclic AMP Response Element Binding Protein (CREB) Binding Protein) vermittelter Transkription sind (Marambaud et al., 2003; Nagano and Saya, 2004) und viele mehr. Doch nicht nur die Intrazellulärdomänen können biologisch aktiv sein. So werden z.B. für die Ektodomäne und das A β -Peptid des APPs ebenfalls Funktionen postuliert (Anliker and Müller, 2006): für die Ektodomäne von APP wurde eine Funktion als Regulator der Proliferation von Vorläuferzellen in neurogenen Bereichen des adulten zentralen Nervensystems (Caille et al., 2004) und für A β eine Rolle in der Regulation der Cholesterol- und Sphingomyelin-Biosynthese beschrieben (Grimm et al., 2005).

Wenig ist bisher über die Beendigung der RIP-vermittelten Signale, insbesondere den Verbleib der Fragmente mit Signalaktivität, bekannt. Von einem sehr schnellen

Abbau vieler Intrazellulärdomänen wird ausgegangen, da diese schwer nachweisbar sind (z.B. Hermey et al., 2006; Kanning et al., 2003). Über die Degradationswege wurde aber bisher sehr wenig berichtet. Relativ gut untersucht sind nur der Abbau des NICDs durch das Proteasom (Oberg et al., 2001; Gupta-Rossi et al., 2001) und des AICDs durch das Insulin-degradierende Enzym (Edbauer et al., 2002; Farris et al., 2003).

1.7 Regulierte Intramembran-Proteolyse von SorLA?

Die Prozessierung von SorLA weist Homologien zu der von Notch auf. Auch SorLA wird als Präproprotein synthetisiert (Abb. 1.4). Im ER wird zunächst das Signalpeptid abgespalten und im Golgi-Apparat kommt es zur Aktivierung des Rezeptors durch Entfernung des Propeptids durch Furin (1) (Hampe et al., 2000; Lintzel et al., 2002; Jacobsen et al., 2001). Erst nach dieser Aktivierung kann SorLA den Liganden Kopfaktivator binden (2) (Lintzel et al., 2002), wodurch die Abspaltung der Ektodomäne nahe der Plasmamembran durch die α -Sekretase TACE (Tumour Necrosis Factor α Convertase) eingeleitet wird (3) (Guo et al., 2002; Hampe et al., 2000; Lintzel et al., 2002). Eine Prozessierung durch die β -Sekretase wurde für SorLA, trotz nachgewiesener Interaktion mit BACE1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme) (Spoelgen et al., 2006), bisher nicht gezeigt. In der Arbeitsgruppe erfolgte kürzlich der Nachweis einer Prozessierung von SorLAs C-terminalem Fragment (CTF) durch die γ -Sekretase (4) (Bohm et al., 2006). Dieses Ergebnis wurde parallel von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt, die auch für die Vps10-Domäne-tragenden Rezeptoren Sortilin und SorCS1 eine γ -Sekretase-vermittelte Prozessierung nachgewiesen haben (Nyborg et al., 2006; Hermey et al., 2006). Erste Hinweise deuten darauf hin, dass die intrazelluläre Domäne von SorLA (SorICD) in geringem Maße zur Einleitung der Transkription eines Reportergens fähig ist (Bohm et al., 2006).

Die Frage, ob die freigesetzte SorICD eine biologische Aktivität besitzt und in den Zellkern gelangen kann, war Teil der Untersuchungen dieser Arbeit, ebenso sollten Experimente zum Abbau der SorICD der Klärung der Signal-Beendigung dienen (5).

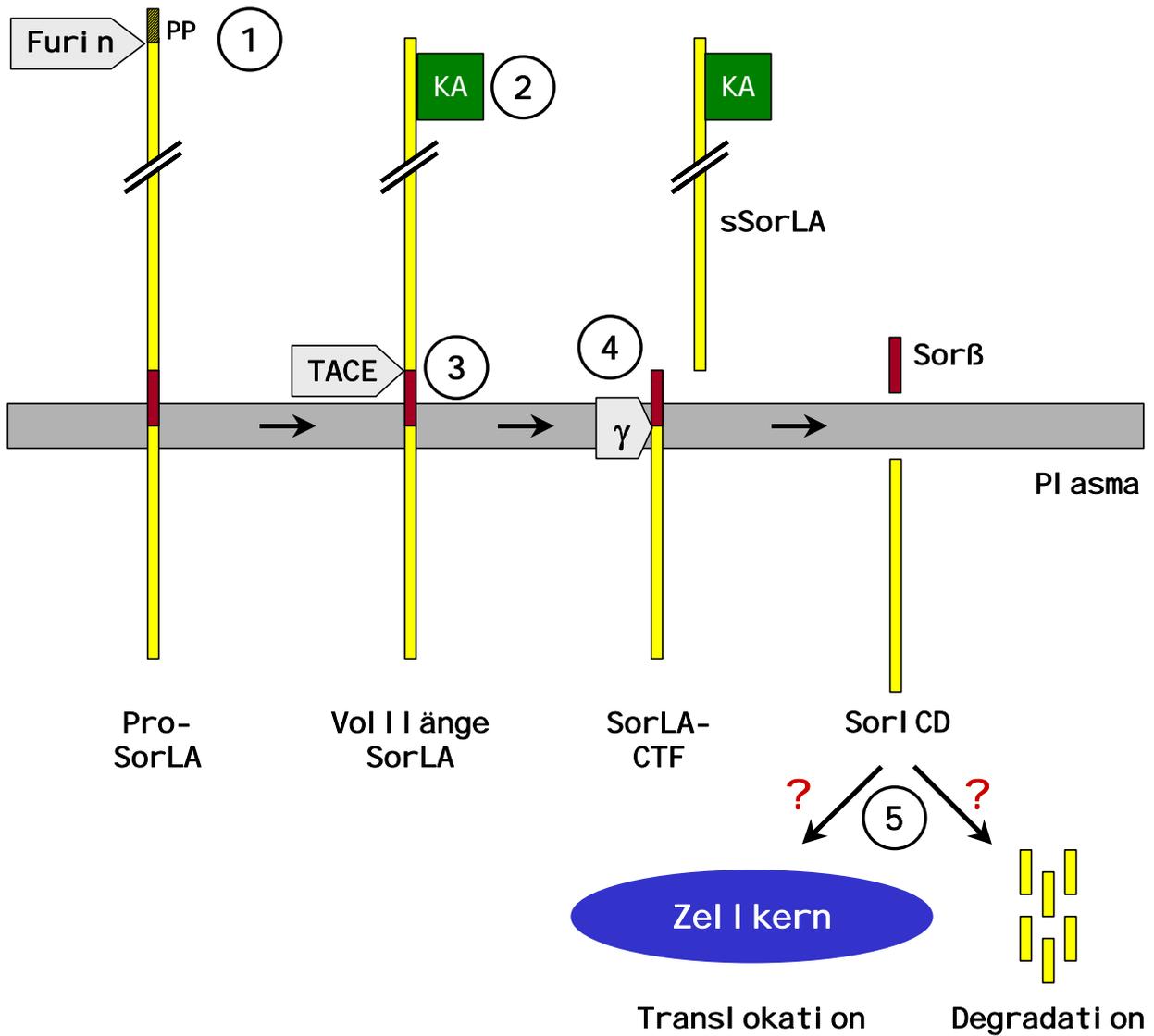


Abb. 1.4: Prozessierung von SorLA

Beschreibung siehe Text. KA = Kopfaktivator; PP =Propeptid; Sor β = SorLA-Analog zum nicht-pathogenen p3 aus dem Amyloiden Vorläuferprotein

1.8 Zielsetzung und methodischer Ansatz

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von SorLA-vermittelten Signalübertragungswegen, um damit die physiologische Funktion dieses evolutionär stark konservierten Rezeptors näher zu charakterisieren.

Nachdem für viele verwandte Proteine von SorLA eine Beteiligung an verschiedenen Signalkaskaden beschrieben wurde, sollten zunächst mögliche Signalwege von SorLA-exprimierenden Zellen nach Stimulation mit einem spezifischen Liganden, dem Neuropeptid Kopfaktivator, untersucht werden. Diese Untersuchungen beinhalteten

- die Entwicklung eines Tests der mitogenen Wirkung des Neuropeptides als physiologische Kontrolle möglicher Signalkaskaden sowie
- vergleichende zweidimensionale Gelelektrophoresen und die Verwendung spezifischer Antikörper zur Prüfung von indirekten Signalübertragungen durch Phosphorylierung von Adaptermolekülen

Eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung besteht in der sequentiellen proteolytischen Prozessierung des Rezeptors, beispielsweise durch eine Regulierte Intramembran-Proteolyse. Zur Identifizierung einer biologischen Aktivität der Intrazellulärdomäne von SorLA wurden folgende Versuche durchgeführt:

- *In vitro*-Freisetzung der Intrazellulärdomäne durch die γ -Sekretase
- Untersuchung der Translokation der Intrazellulärdomäne in den Zellkern als Voraussetzung für eine mögliche Funktion in der Genregulation und
- Ermittlung der abbauenden Aktivität der Intrazellulärdomäne.

MATERIAL UND METHODEN

2. Material und Methoden

Im nachfolgenden sind alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien samt Herstellern aufgelistet. Alle Adressen der Hersteller können dem Anhang entnommen werden. Anschließend folgt die Aufführung der Durchführungsprotokolle der experimentellen Arbeit.

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Computergesteuerte Geräte

Folgende computergesteuerte Geräte mit dazugehörigen Softwares wurden verwendet:

Durchflusszytometer FC 500 mit Software CXP, Version 2.0 von Beckman Coulter, Inc.

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 mit Kamera AxioCam color und Software Axio Vision Viewer von Carl Zeiss

Konfokales Laser-Mikroskop LSM 510 META mit Software LSM Image Browser von Carl Zeiss und ImageJ von Wayne Rasband National Institutes of Health

Agarosegel-Dokumentation BDA Digital mit Kamera Canon Power Shot G3 und Software BioDoc Analyze von Biometra und Canon

Platten-Spektrometer Biotrak II Plate Reader mit Software Biochrom Data Capture von GE Healthcare

Bildscanner (ImageScanner) mit Software Corel PhotoPaint, Version 9.397, GE Healthcare und Corel

Fluoreszenzleser Typhoon 9410, Variable Mode Imager mit Softwares Typhoon Scanner Control v5.0, Image Quant (Molecular Dynamics), ImageMaster™ 2D Platinum (Version 5.0) und DeCyder™ Biological Variation Analysis Software Version 5.01.01, alles von GE Healthcare

Fluoreszenzplatten Leser Victor 1420 Multilabel Counter mit Software Wallac 1420 Manager Version 1.00 von Perkin Elmer

2.1.1.2 Allgemeine Labormaterialien und –geräte

Diese Aufzählung beinhaltet Standardlaborgeräte und –werkzeuge:

Autoklav GVA460 von Fritz Gössner

CO₂-Brutschrank CB210 von Binder

Elektroporation Gene Pulser II, Puls Controller Plus und Capacitance Extender Plus, alle von Bio-Rad

Entwickler für Röntgenfilme X-Omat 1000 Processor von Kodak

Gelkammern Vertikale Gele: X Cell sure Lock™ von Invitrogen, Mini-Protean3 von Bio-Rad, Horizontale Gele: Wide Mini-Sub® Cell von Bio-Rad

Kühl- und Gefrierschränke von Liebherr

Mikroskop CKX 31 von Olympus

Multipipette Multipette Plus von Eppendorf

PCR-Thermozykler T3 Thermocycler von Biometra

pH-Meter Basic pH-Meter MP220 von Mettler Toledo

Photometer Bio Photometer von Eppendorf

Pipetten Research 100 - 1 000 µl, Research 10 - 100 µl, Research 0,5 - 10 µl von Eppendorf

Pipettierhilfe Pipetboy acu von Integra Bio-Sciences

Rührer und Vortexer von Wesarg Medizintechnik

Schüttler HS 260 Basic von IKA, Temperaturschüttler Unitron von Infors HT

Stromversorgung für Elektrophoresen Power Pac 300 von Bio-Rad

Thermomixer compact von Eppendorf

Ultraschallgerät Sonifier 450 mit doppelstufiger 1/8 Mikrohornspitze von Branson

Waage BP410S von Satorius

Wasserbereitung Water Purification System von Millipore

Zellkultur-Werkbank Hera Safe von Thermo Fisher Scientific

Zellzähler CASY®-1 Cell Counter von Schärfe System mit Canon BJ-30 Drucker

Zentrifugen Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R von Eppendorf, Kühlzentrifuge 6K15 von Sigma-Zentrifugen, Ultrazentrifuge TL100 von Beckmann-Coulter Inc.

Geräte für 2D:

Isoelektrische Fokussierung IPGphor von GE Healthcare

2D-Elektrophoresekammer Ettan DALTwelve System Separation Unit, Power Supply und Control Unit, alle von GE Healthcare

2.1.2 Programme und Internetseiten

Folgende Computerprogramme und Internetseiten wurden verwendet:

Klonierung DNASStar, Version 4.0 von DNASTAR Inc., CloneManager 7, Version 7.04 von Scientific and Educational Software

Datenverarbeitung MSOffice von Microsoft

Bildbearbeitung Photoshop 6.0 von Adobe

Literaturrecherche und Gendatenbank

Pub Med (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>)

Zellkulturdatenbank

ATCC (<http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>)

Proteinanalysen und Lokalisationsvorhersagen

Expasy (<http://www.expasy.ch/>) beinhaltet PsortII und andere bioinformatische Programme

2.1.3 Chemikalien

2.1.3.1 Allgemeine Chemikalien

Alle explizit erwähnten Chemikalien sind samt Hersteller hier aufgeführt:

7AAD (Beckman Coulter, Inc.)	Ethanol (JT Baker)	Neomycin (= Genicidin®) (Invitrogen)
Agar (BD)	Ettan™ CyDye DIGE Fluor minimal dyes Cy2, Cy3 und Cy5 (GE Healthcare)	Novex® Native TrisGly Sample Buffer (Invitrogen)
Agarose (SeaKem® LE) (Cambrex)	Fluoromount (Southern Biotechnology Associates)	NuPAGE® MES SDS-Laufpuffer (20X) (Invitrogen)
alamarBlue™ (Serotec)	FuGENE6 (Roche)	NuPAGE® Novex Bis-Tris-Gradientengele 4-12 % (Invitrogen)
Alkalische Phosphatase CIP (New England Biolabs)	Glycerin (Sigma-Aldrich)	Okadaic-Säure (Merck)
Bacitracin (Sigma-Aldrich)	Glycin (Carl Roth)	PBS (Invitrogen)
Bacto Trypton (BD)	Harnstoff (Serva)	PCR Puffer Minus Mg (10X) (Invitrogen)
Borsäure (Merck)	Hefe-Extrakt (BD)	PFA (Sigma-Aldrich)
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich)	HEPES (Sigma-Aldrich)	Pharmalyte (GE Healthcare)
BSA (PAA)	Hygromycin B (Invitrogen)	Platinum® Taq-DNA Polymerase (5 U/μl) (Invitrogen)
BSA (Pierce)	IEF-Streifen Immobiline DryStrips (GE Healthcare)	Plus™ Reagenz (Invitrogen)
CaCl ₂ (Merck)	Insulin (Sigma-Aldrich)	Ponceau S (Serva)
CHAPS (Sigma-Aldrich)	KCl (Sigma-Aldrich)	Pro-Q® Diamond (Invitrogen)
Chemilumineszenz-Substrat: Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)	Klenow-Enzym (New England Biolabs)	Restriktionsenzyme und Puffer (New England Biolabs)
Citrat (Merck)	Lactacystin (Sigma-Aldrich)	Roti-Nanoquant (Carl Roth)
Colchicin (Sigma-Aldrich)	Liptofectamine™ (Invitrogen)	Sarponin (Sigma-Aldrich)
Complete Minis Protease-Inhibitoren (PIs) (Roche)	Magermilchpulver (Reformhaus)	SDS (Serva)
DAPI (Sigma-Aldrich)	Magnesium Chlorid-Lösung (Invitrogen)	SYPRO® Ruby (Invitrogen)
DAPT (γ-Secretase Inhibitor IX) (Merck)	Medien und Zellkulturchemikalien, Antibiotika, PBS, Trypsin, FCS (Invitrogen)	Thymidin (Fluka)
DMSO (Sigma-Aldrich)	Methanol (Carl Roth)	Tris (Sigma-Aldrich)
dNTPs (Nukleotide) (Fermentas)	Mitomycin C (Sigma-Aldrich)	Triton X-100 (Merck)
DTT (Sigma-Aldrich)	NaCl (JT Baker)	Tween20 (Sigma-Aldrich)
EDTA (Sigma-Aldrich)	NaN ₃ (Fluka)	Ziegen Serum (Jackson Immuno Research Laboratories)
EGTA (Sigma-Aldrich)	NaOH (Sigma-Aldrich)	β-Mercaptoethanol (Serva)
Eisessig (Merck)	Natrium-Vanadat (ICN Biomedicals)	

2.1.3.2 Kopfaktivator

Synthetisch hergestellte Kopfaktivatormoleküle wurden vor Gebrauch monomerisiert, um ihre biologische Aktivität zu erhalten (Bodenmuller et al., 1986).

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Falcon-Tubes von BD

Kanülen 23-Gauge Kanülen von BD

Küvetten zur DNA-Bestimmung: UVette® 220-1 600 nm von Eppendorf; zur Elektroporation: Gene Pulser® Cuvette von Bio-Rad

Marker auf Proteinebene: Rpm 800 von GE Healthcare, MultiMark von Invitrogen, PeppermintStick™-Phosphoproteinmarker von Invitrogen

auf DNA-Ebene: 1 Kb DNA Ladder von Invitrogen,

Mikrotiterplatten von Nunc und OptiPlate-96 Black 96-well Microplate von Perkin Elmer für Fluoreszenzmessungen

PVDF Membran Immobilon P mit einer Porengröße von 0,45 µm von Millipore

Objektträger von Engelbrecht Medizin- & Labortechnik

Pipettenspitzen von Sarstedt

Reaktionsgefäße von Eppendorf, Biozym oder Sarstedt

Röntgenfilme Biomax MR Scientific Imaging Film von Kodak oder Medical X-Ray Film Super RX von Fujifilm

Runde Deckgläschen (= Cover Slips) mit Ø13 mm von Assistent

Stabpipetten von BD

Ultrazentrifugenröhrchen Polyallomer 11 x 34 mm von Beckman Coulter, Inc.

Zellkulturmaterialien von Nunc, Sarstedt oder BD

Zytometer-Röhrchen von BD

2.1.5 Kits

2D-CleanUp Kit (GE Healthcare)

pGEM®-T Easy Kloning Kit (Promega)

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Rapid DNA Ligation Kit (Roche)

SEQLAB-Laccase-Kit (Sequence Laboratories Göttingen GmbH)

2.2 Zelllinien

2.2.1 Verwendete Standardlinien

Im folgenden sind alle Zelllinien angegeben, die für die Versuche in dieser Arbeit verwendet wurden. Zur besseren Zuordnung sind deren Nummern in der American Type Culture Collection (ATCC)-Datenbank – sofern bekannt – angegeben, sowie Literaturverweise. Außerdem sind Ursprungsorganismus und Kulturmedien aufgezählt.

ZELLINIEN				
Name	ATCC-Nr.	Medium	Ursprung	Literatur
BON	-	F12 + 5% FCS, 1% P/S	Human	Evers et al., 1994
NT2	CRL-1973	Opti-MEM mit GlutaMax + 5% FCS, 1% P/S	Human	Pleasure and Lee, 1993
HEK293	CRL-1573	D-MEM (high glucose) + 10% FCS, 1% P/S	Human	Graham, 1992
COS7	CRL-1651	D-MEM (high glucose) + 10% FCS, 1% P/S	Afrikanische grüne Meer- katze	Gluzman, 1981
CHO-K1	CCL-61	F12 + 10% FCS, 1% P/S	Chinesischer Hamster	Kao and Puck, 1967 Puck et al., 1958

FCS = Fötale Kälberserum, P/S = 10 000 Units/ml Penicillin G und 10 000 µg/ml Streptomycin

Die Zelllinien BON und NT2 exprimieren endogen SorLA, alle anderen wurden aufgrund ihrer Eigenschaft, sich leicht transfizieren zu lassen, verwendet. Weiterhin wurden in einer Kooperationsarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Markus Nalaskowski die Zelllinien 3T3 (Maus, Flip-In System von Invitrogen) und H1299 (humane Lungenzellen) verwendet.

2.2.2 Stabil transfizierte Zelllinien

Im folgenden sind die in der Arbeit verwendeten, stabil transfizierten Zelllinien mit überexprimierten Proteinen, Ursprungslinie, Literatur und Selektionsbedingungen angegeben.

STABIL TRANSFIZIERTE ZELLINIEN		
Stabile Überexpression	Literatur	Selektionsbedingungen
HEK293		
SorLA-Volllänge APP ₆₉₅ (swAPP) Presenilin Wildtyp	Bohm et al., 2006 Citron et al., 1992 Wolfe et al., 1999	200 µg/ml Hygromycin B für SorLA 200 µg/ml Zeocin für Presenilin 1 200 µg/ml Neomycin für swAPP
SorLA-CTF* APP ₆₉₅ (swAPP) Presenilin Wildtyp	Bohm et al., 2006 Citron et al., 1992 Wolfe et al., 1999	200 µg/ml Hygromycin B für SorLA-CTF* 200 µg/ml Zeocin für Presenilin 1 200 µg/ml Neomycin für swAPP
IDE-Wildtyp APP ₆₉₅ (swAPP)	Edbauer et al., 2002	200 µg/ml Zeocin für IDE 200 µg/ml Neomycin für swAPP
IDE-Dominant Negativ APP ₆₉₅ (swAPP)	Edbauer et al., 2002	200 µg/ml Zeocin für IDE 200 µg/ml Neomycin für swAPP
SorLA-Volllänge	Eigene Herstellung	200 µg/ml Hygromycin B für SorLA
SorLA-Volllänge IDE-Wildtyp APP ₆₉₅ (swAPP)	Eigene Herstellung	200 µg/ml Hygromycin B für SorLA 200 µg/ml Zeocin für IDE 200 µg/ml Neomycin für swAPP
SorLA-Volllänge IDE-Dominant Negativ APP ₆₉₅ (swAPP)	Eigene Herstellung	200 µg/ml Hygromycin B für SorLA 200 µg/ml Zeocin für IDE 200 µg/ml Neomycin für swAPP
BON und CHO-K1		
CTF*-EGFP	Eigene Herstellung	200-800 µg/ml Neomycin

APP₆₉₅ (swAPP) = "Schwedische" Mutation (K595N/M596L) der neuronenspezifischen Isoform des Amyloid Precursor Proteins mit 695 Aminosäureresten; CTF* = Künstliches C-Terminales Fragment; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein; IDE = Insulin-degradierendes Enzym, IDE-Dominant Negativ = IDE mit E111Q-Mutation

Die das Insulin-degradierende Enzym (IDE) aus der Ratte in Wildtyp- bzw. dominant negativer Form stabil überexprimierenden HEK293-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Harald Steiner (Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

2.3 Plasmide

Hier sind die in der Arbeit verwendeten Plasmide samt späterer Verwendung angegeben. Die Selektionsmarker Ampicillin und Kanamycin wurden für die bakterielle Selektion und Hygromycin B sowie Neomycin für die von tierischen Zellen (siehe 2.2.2) benutzt.

AUSGANGSPLOSMIDE			
Name	Bezugsquelle	Verwendung	Selektionsbedingungen
pcDNA3.1/Hygro	Invitrogen	Klonierung	Ampicillin Hygromycin
pcDNA3.1/Hygro-SorLA	Bohm et al., 2006	Überexpression SorLA-Volllänge	Ampicillin Hygromycin
pcDNA3.1/SorLA-CTF*	Bohm et al., 2006	Überexpression SorLA-CTF*, Klonierung	Ampicillin Hygromycin
pEGFP-N1, -N2 und -C2	Clontech	Klonierung, Kontrollen Kernlokalisationsversuche	Kanamycin Neomycin
pGEM®-T Easy	Promega	Klonierung pMetSorICD	Ampicillin
pSorLAok	Lintzel et al., 2002	PCR Template pMetSorICD	Ampicillin Neomycin
pEGFP-SorICD	Bohm et al., 2006	Klonierung, Kernlokalisationsversuche	Kanamycin Neomycin
pEGFP-MutSorICD	Bohm et al., 2006	Klonierung, Kernlokalisationsversuche	Kanamycin Neomycin

Hygro = Hygromycin-Resistenzgen; CTF* = Künstliches C-Terminales Fragment; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein; Mut = mutiert; SorICD = Intrazellulärdomäne SorLAs

Die folgende Tabelle stellt die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide dar. Die Vektorplasmide und Inserts sind aufgeführt, ebenso ist die Klonierungsstrategie angedeutet. Die Nomenklatur der Restriktionsenzyme wurde vom Hersteller übernommen. Klenow bedeutet, dass die auffüllende Aktivität des Klenowenzym genutzt wurde, um glatte und somit kompatible Enden zu erzeugen. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft und sind im Anhang genauer dargestellt. Diese Plasmide wurden zur Bestimmung der Lokalisation der SorLA-Intrazellulärdomäne eingesetzt.

Weiterhin wurden in Kooperation mit Dr. Markus Nalaskowski Plasmide mit 2, 3, 4 und 6 EGFP-Multimeren verwendet (p2x - p6xEGFP). Die Konstrukte wurden wie beschreiben kloniert (Genove et al., 2005) und das Hexamer wurde freundlicherweise von den Autoren zur Verfügung gestellt. Grundgerüst war dabei das pEGFP-N1-Plasmid, dessen Monomere durch den Linker Gly-Pro-Val-Ala-Thr verbunden wurden.

PLASMIDE AUS EIGENER HERSTELLUNG				
Name	Expression von	Klonierung		Selektionsbedingungen
		Vektor	Insert	
pDEGFP	Dimerem EGFP	pEGFP-N2 (NheI und XhoI)	EGFP aus pEGFP-C2 (NheI und XhoI)	Kanamycin Neomycin
pDEGFP-SorICD	Dimerem EGFP mit C-terminalem SorICD	pEGFP-C2 (Sall → Klenow, BamHI)	EGFP-SorICD aus pEGFP-SorICD (NheI → Klenow, BamHI)	Kanamycin Neomycin
pDEGFP-MutSorICD	Dimerem EGFP mit C-terminalem MutSorICD	pEGFP-C2 (Sall → Klenow, BamHI)	EGFP-MutSorICD aus pEGFP-MutSorICD (NheI → Klenow, BamHI)	Kanamycin Neomycin
pMetSorICD	Zytoplasmatischem SorICD mit Start-Methionin (Met)	pcDNA3.1/Hygro (HindIII und BamHI)	pSorLAok (PCR, Zwischenklonierung, HindIII und BamHI)	Ampicillin Hygromycin
pCTF*-EGFP	Membranständigem SorLA-CTF* mit C-terminalem EGFP	pEGFP-N1 (NheI und XhoI)	SorLA-CTF* aus pcDNA3.1/SorLA-CTF* (NheI und XhoI)	Kanamycin Neomycin

CTF* = Künstliches C-Terminales Fragment; DEGFP = Dimeric Enhanced Green Fluorescent Protein; Met = Methionin; Mut = mutiert; SorICD = Intrazellulärdomäne SorLAs

Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit überexprimierten Proteine.

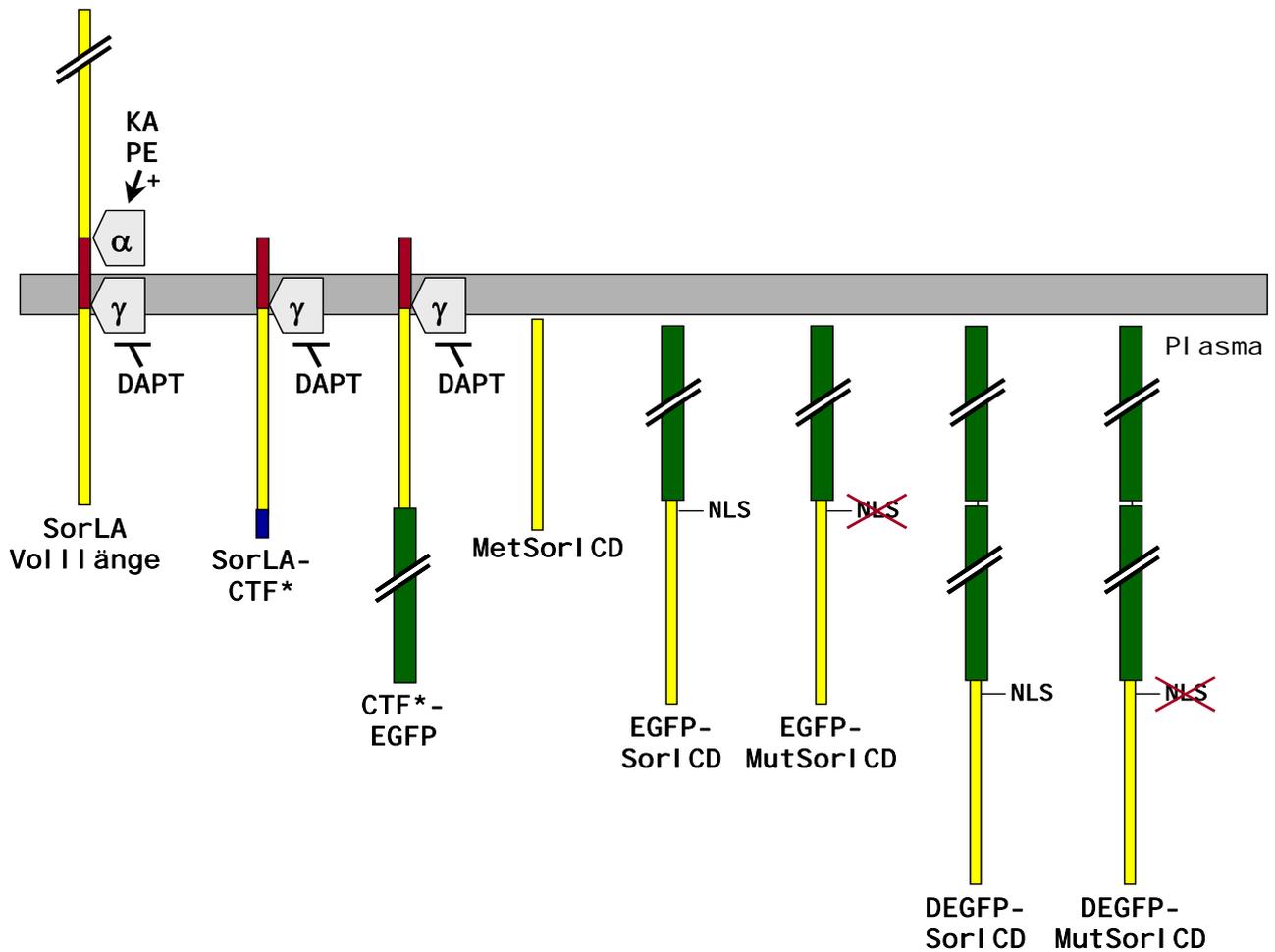


Abb. 2.1: In dieser Arbeit überexprimierte SorLA-Proteine/-fragmente

Kopffaktivator (KA) und Phorbol ester (PE) aktivieren die Ektodomänenabspaltung in Volllänge-SorLA durch die α -Sekretase. SorLA-CTF* initiiert den transmembran verbleibenden Rest nach dieser Prozessierung. Da die α -Sekretasen-Schnittstelle in SorLA nicht bekannt ist, wurde der N-Terminus willkürlich festgelegt. In blau ist ein Myc-Anhang dargestellt. CTF*-EGFP enthält statt des Myc-Anhangs in SorLA-CTF* ein EGFP (Enhanced Green Fluoreszent Protein) am C-Terminus (grün). Alle drei sind Substrate für die γ -Sekretase, deren Aktivität durch DAPT unterdrückt wird. Die folgenden Proteine werden direkt ins Zytoplasma synthetisiert: MetSorICD soll die freigesetzte Intrazellulärdomäne nach γ -Sekretaseschnitt imitieren. EGFP-SorICD ist eine Fusion aus SorICD mit einem N-terminalem EGFP und DEGFP-SorICD mit zwei N-terminalen EGFPs. EGFP-MutSorICD und DEGFP-MutSorICD entsprechen den beiden Letztgenannten, das potentielle Kernlokalisierungssignal (NLS) wurde jedoch durch eine Mutation entfernt.

2.4 Primer

Alle Primer wurden von der Firma metabion hergestellt. Zur Sequenzierung der Übergänge zwischen den Untereinheiten des dimerem EGFP wurde ein PCR-Produkt aus den Primern EGFP505for und EGFP209rev eingesetzt.

PRIMER		
Name	Sequenz	Verwendung
3SICD	5' GGG GAT CCT CAG GCT ATC ACC ATG GGG AC 3'	PCR pMetSorICD
5MetSICD	5' GGA AGC TTC CAC CAT GGT GTA CAC GAA GCA 3'	PCR pMetSorICD
CMV*	5' CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG 3'	Sequenzierung - pCTF*-EGFP - pDEGFP - pDEGFP-SorICD - pDEGFP-MutSorICD
EGFP505for	5' CGC CAC AAC ATC GAG GAC GG 3'	Sequenzierung - pDEGFP - pDEGFP-SorICD - pDEGFP-MutSorICD
EGFP209rev	5' GGG GTA GCG GCT GAA GCA CT 3'	Sequenzierung - pCTF*-EGFP - pDEGFP - pDEGFP-SorICD - pDEGFP-MutSorICD
SorLA6580rev	5' AAG GCG GTG AAG CTG CTC TG 3'	Sequenzierung - pDEGFP-SorICD - pDEGFP-MutSorICD
T7_neu	5' ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G 3'	Sequenzierung pMetSorICD

*Sequenz ursprünglich von Invitrogen

2.5 Antikörper

Die Tabelle ist aufteilt in Primär- und Sekundärantikörper. Die Bestellnummern (#) der kommerziell erhältlichen Antikörper sind angegeben. Die antigenen Epitope zur Produktion der SorLA-Antikörper sind im Anhang in der Proteinsequenz von SorLA hervorgehoben. Ursprünglich wurden diese Epitope aus murinem SorLA (Genbank-Nr. AAC16739) gewählt. Diese Antikörper funktionieren aber auch gegen humanes SorLA.

PRIMÄRANTIKÖRPER					
Name	Antigen	Typ	Bezugsquelle	Verdünnung	
				Western	IMF
α -SorLA cp	C-Terminale 18 ASRs (2016-2033) von murinem SorLA	Rb	Hampe et al., 2000	1 : 3 000	1 : 3 000
α -SorLA F3	ASRs 1384-1676 in der F3-Domäne von murinem SorLA	Rb	Hampe et al., 2000	1 : 1 000	1 : 1 000
α -GFP (VL)	Volllänge GFP aus <i>Aequorea victoria</i>	Rb	Santa Cruz Biotechnology # sc-8334	1 : 5 000	1 : 1 000
α -APP cp	C-terminale 20 ASRs (751-770) von humanem APP ₇₇₀	Rb	Merck (Calbiochem) # 171610	1 : 5 000	-
α -c-Myc (A-14)	C-Terminus von humanem c-Myc	Rb	Santa Cruz Biotechnology # sc-789	1 : 1 000	-
α -H3P	ASRs 7-20 von humanem Histon H3 mit phosphoryliertem Serin 10	Rb	Upstate/ Millipore #06-570	1 : 1 000	1 : 1 000
α -ACTIVE® MAPK (ERK1/2)	pT ₁₈₃ EpY ₁₈₅ des Säugetier-ERK2s	Rb	Promega #V8031	1 : 5 000	-
α -ERK1/2	Peptid in humanem ERK1	Rb	Promega # V114A	1 : 5 000	-
α - β Aktin (Klon AC-15)	N-Terminale 15 ASRs Vom Säugetier- β Aktin	M	Sigma-Aldrich # A5441	1 : 10 000	-

APP₇₇₀ = Amyloid Precursor Protein, Splicevariante mit 770 ASPs; ASRs = Aminosäurereste; cp = cytoplasmatic; ERK = Extracellular Signal-regulated Kinase; F3 = Fibronectin III; GFP = Green Fluorescent Protein; H3P = phosphorylierte Form des Histon H3s, IMF = Immunfluoreszenz; M = aus Maus; MAPK = Mitogen-activated Protein Kinase; Rb = aus Kaninchen; VL = Volllänge

SEKUNDÄRANTIKÖRPER					
Name	Antigen	Ursprungsorganismus	Bezugsquelle	Verdünnung	
				Western	IMF
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit	Kaninchen IgG Schwere Kette	Ziege	Invitrogen # A11008	-	1 : 1 000
Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit	Kaninchen IgG Schwere Kette	Ziege	Invitrogen # A11010	-	1 : 1 000
Goat Anti-Rabbit Peroxidase (GARPO)	Kaninchen IgG Schwere Kette	Ziege	Jackson Immuno Research Lab. # 111-035-045	1 : 40 000	-
Goat Anti-Mouse Peroxidase (GAMPO)	Maus IgG Schwere Kette	Ziege	Jackson Immuno Research Lab. # 115-035-146	1 : 40 000	-

2.6 Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen in destilliertem Wasser angesetzt. Die folgende Tabelle zeigt alle eingesetzten Lösungen und verweist auf die Methodenkapitel, in denen sie verwendet werden.

LÖSUNGEN		
Name	Zusammensetzung	Verwendung
4x SDS-Probenpuffer	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	2.8.1.2 2.8.1.4 2.8.1.5 2.8.3.1.1
Agarplatten	LB-Medium, 15 g/L Agar	2.9
Citratpuffer	150 mM Citrat, pH 6,74	2.8.1.4
Dehybridisierungspuffer	100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS (w/v), 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7	2.8.4
Fixierlösung	50% Methanol, 10% Eissessig	2.8.3.2
Harnstoff-Lysispuffer	8 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 1 % Pharmalyte, 60 mM DTT	2.8.1.3
Hypotoner Puffer	10 mM HEPES, 10 mM KCl, pH 7,0	2.8.1.4
LB-Medium	10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 10 g/L NaCl	2.9
LB-Selektionsmedium/ -Agar	30 mg/L Kanamycin oder 50 mg/L Ampicillin in LB-Medium/-Agar	2.9
Lysispuffer	50 mM Tris, 2 mM CaCl ₂ , 1% Triton X-100, pH 8,0, PIs	2.8.1.1.
Permeabilisierungslösung	0,5% Glycin, 0,1% Sarponin in PBS	2.7.4
TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1,6 mM EDTA	2.9
TBST-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20	2.8.4
Waschpuffer	1% FCS, 0,1% NaN ₃ in PBS	2.7.6

PIs = Complete Mini Protease-Inhibitoren, 25x Stammlösung

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Zellkultur und Inkubation mit KA und DAPT

Die Versuche dieser Arbeit wurden alle mit *in vitro* gezüchteten Zelllinien durchgeführt. Die sterile Bearbeitung der Kulturen fand in einer Hera Safe Werkbank statt und die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Alle Medien und Zellkulturchemikalien wurden von Invitrogen bezogen. Die verwendeten Zelllinien sind in 2.2.1 aufgeführt. Weiterhin wurden stabil transfizierte HEK293-, BON- und CHO-K1-Zellen verwendet, die in 2.2.2 dargestellt sind. Diese wurden unter Selektionsdruck kultiviert.

Zur Zucht aller Zellen wurde jeweils serumhaltiges Medium (Vollmedium) verwendet. Vor allen Kopfaktivator (KA)-Versuchen wurden BON- und NT2-Zellen mit definiertem Medium ohne Serum (Kayser et al., 1998) über Nacht inkubiert. Die Verwendung von definiertem Medium erlaubt eine Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren, ohne die Zellen zu arretieren (Bottenstein and Sato, 1979). Die KA-Stimulation erfolgte ebenfalls in definiertem Medium.

Versuche, die eine 16 h Inkubation mit DAPT (N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-Butyl Ester) erforderten, wurden ebenfalls über Nacht, jedoch in Vollmedium mit Zusatz von 1 µM DAPT in DMSO bzw. die Kontrolle mit gleichem Volumen DMSO (Dimethylsulfoxid) inkubiert.

2.7.2 Transfektion

Die Transfektion von COS7- und CHO-K1-Zellen erfolgte durch Elektroporation (Einstellungen: 0,3 kV, 500 µF) (Chu et al., 1987). Alternativ wurden folgende Chemikalien laut Herstelleranweisung zur Lipofektion eingesetzt: FuGENE6 für HEK293, sowie Lipofectamin und Plus Reagenz für BON-Zellen.

Die Kontrolle der Transfektion erfolgte 24-48 h nach der Transfektion. Transfizierte Zellen wurden entweder fixiert und in der Immunfluoreszenzfärbung (2.7.4) eingesetzt, die Proteine geerntet (2.8.1) oder über längere Zeit mit Antibiotika selektioniert, um stabile Klone zu erhalten (2.2.2).

2.7.3 Proliferationstest mit alamarBlue™

Als indirekter Nachweis für die Zellproliferation nach KA-Induktion wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels alamarBlue gemessen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Proliferationsversuchen liegt darin, dass die selben Zellen vor und nach der Induktion untersucht werden können.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem CASY®-1 Zellzähler gezählt und gleiche Zellzahlen (10^4 - 10^5 Zellen) in Wells einer 24-Well-Platte in Vollmedium ausgesetzt. Nach einem Tag Adhärenzzeit wurde morgens das Medium ersetzt durch 500 μ l Medium mit 1/10 Volumen alamarBlue™. Die Platten wurden nun bei 37°C weiter inkubiert. Nach 1 - 2 h wurden zur Bestimmung des Ausgangswertes ($t=0$) 100 μ l Zellüberstand in eine Fluoreszenzreader-Platte gegeben. Durch den Austausch des alamarBlue-enthaltenden Mediums gegen 500 μ l Medium mit bzw. ohne 1 nM KA wurde der Proliferationstest gestartet. In definierten Zeitabständen wurde die alamarBlue-Inkubation der Zellen wiederholt. Abschließend wurde per Mikroskop sichergestellt, dass die Zellen sich nicht bis zur Konfluenz vermehrt hatten. Bei Versuchen über mehrere Tage erfolgte mindestens an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel.

Als Kontrollen dienten alamarBlue-enthaltende Medien aus Wells mit doppelter Menge ausgesetzter Zellen, aus Wells ohne Zellen sowie Zellüberstände ohne alamarBlue. Die Messung der Fluoreszenzintensität des alamarBlues fand ca. 30 min. nach der Abnahme bei RT in einem Victor 1420 Multilabel Counter statt. Gemessen wurde im ReadWell-Modus bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (Gain 1.0, PMT 500, Read length: 1 sek.). Die erhaltenen Werte wurden mit Microsoft Excel ausgewertet, indem die Fluoreszenzintensitäten des Medium aus Wells mit behandelten Zellen (+/- KA) durch diese von Medium aus den selben Wells an Tag 0 geteilt wurden.

2.7.4 Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen

Die auf Deckgläschen ausgesetzten, zu untersuchenden Zellen wurden zweimal mit warmem PBS gewaschen, um anschließend in 60°C warmen, 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für 30 min. fixiert zu werden. War eine Permeabilisierung der Zellen gewünscht, so wurden diese 5 min. in 0,5% Glycin und 0,1% Sarponin in PBS sanft geschüttelt. Eine Blockierung freier Bindestellen erfolgte für 30 min. in Permeabilisierungslösung mit 1% BSA und 8-10% Ziegen Serum. Nach der Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern (siehe 2.5) in Blockierlösung für je 1 h bzw. 45 min. bei RT wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen. Die Kern-Färbung mit DAPI (1 μ g/ml) erfolgte gleichzeitig mit der Sekundärantikörperfärbung, jedoch nur für 10 min.. Abschließend wurden die gefärbten Zellen mit Fluoromount am Objektträger fixiert und am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 oder am konfokalen Lasermikroskop LSM 510 META mikroskopiert.

2.7.5 Kernlokalisierungsexperiment am Konfokal-Mikroskop

Um Studien zur subzellulären Lokalisation durchzuführen, wurden die Zellen entweder mit Antikörpern laut 2.7.4 fluoreszenzmarkiert oder nach Transfektion mit EGFP-Konstrukten fixiert und DAPI-gefärbt. Am konfokalen Lasermikroskop LSM 510 META wurden Aufnahmen mit einer Schichtdicke von 1 µm gemacht. Es wurde darauf geachtet, dass die konfokale Ebene den Zellkern der betrachteten Zelle schnitt. Gegebenenfalls wurden auch Z-Stapel aufgenommen, die mehrere, sich teilweise überlagernde Schnitte durch die Zelle zeigten. Mit der Software ImageJ konnten anschließend die Fluoreszenzintensitäten von einzelnen Regionen in Kern und Zytoplasma bestimmt werden. Je nach Transfektionseffizienz wurden 10 bis >30 Zellen ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students-t-Test.

2.7.6 Durchflusszytometrie zur Zellzyklus-Analyse

SorLA-exprimierende Zellen der Linien BON oder NT2 wurden über Nacht in definiertem serumfreien Medium und anschließend mit 1 nM KA inkubiert. Nach Ablösung durch Trypsin und einmaligem Waschen der Zellen in Waschpuffer wurden diese in 75%igem Ethanol mindestens über Nacht bei -20°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Fluoreszenzmarkierung bei RT mit Anti-H3P (1 : 1 000 in Waschpuffer) für 1 h gefolgt vom Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (1 : 1 000) für 45 min.. Die DNA der Zellen wurde mit 10 µl 7AAD 20 min. im Dunkeln und bei RT gefärbt. Nach jedem dieser Schritte wurden die Zellen gewaschen. Die Fluoreszenzintensitätsmessung erfolgte in einem Durchflusszytometer der Firma Beckman-Coulter (FC 500) bei einer Emission von 519 nm für den H3P-gebundenen Alexa Fluor 488 Antikörper und bei 647 nm für 7AAD. Jeweils 20 000 Zellen wurden untersucht, bzw. die Messung bei geringerer Zellkonzentration nach 300 sek. abgebrochen. Die Auswertung erfolgte mit der Software CXP Version 2.0.

Ein Aliquot der gefärbten Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 auf erfolgreiche Färbung geprüft.

2.7.7 Synchronisation von Zellen zur Zellzyklus-Analyse

Um die Population mitotischer Zellen in der Durchflusszytometrie zu bestimmen, wurden NT2-Zellen in definierten Zellzyklusphasen arretiert (Jackman and O'Connor, 2001). Anschließend folgte eine Färbung für die Durchflusszytometrie nach 2.7.6.

Zur Synchronisation am G1/S-Übergang mit Thymidin, welches reversibel die Ribonucleotid-Reduktase blockiert, wurden subkonfluent dichte Zellkulturflaschen für 17 h in 2 mM Thymidin in PBS inkubiert und anschließend 3 mal mit PBS gewaschen. Nach neunstündiger Kultivierung in Vollmedium erfolgte eine zweite Thymidinbehandlung für weitere 17 h. Die

Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin geerntet oder zur Analyse der Wirkung von KA weiter inkubiert.

Die Quervernetzung der DNA-Doppelstränge mit Mitomycin C (MMC) führt zu einer irreversiblen Synchronisation der Zellen bevorzugt in der S- aber auch in der G2-Phase. Nach einer zweistündigen Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml MMC konnten die Zellen trypsinisiert und zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet werden.

Colchicin verhindert durch seine Bindung an Tubulin den Zusammentritt der Untereinheiten und zerstört die Mikrotubuli, wodurch die Zellen irreversibel in der Metaphase der Mitose arretieren. 50 µg/ml Colchicin wurden für 17 – 18 h zu den Zellen gegeben, diese abschließend mit Medium abgespült und für die Durchflusszytometrie verwendet.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Proteinernte

Bei der Ernte von Proteinen aus kultivierten Zellen wurde – sofern nicht anders angegeben - mit auf 4°C gekühlten Materialien gearbeitet und bei 4°C inkubiert und zentrifugiert. In der Regel wurden Complete Mini Protease-Inhibitoren (PIs) dazugegeben, wobei als 26x Stammlösung stets eine Tablette in 400 µl H₂O_{dest} aufgenommen worden war.

2.8.1.1 Gesamtzellysat

Diese Methode diente der Gewinnung einer homogenen Mischung des gesamten Proteoms der Zellen. Diese wurden in PBS abgelöst, durch 5 min. Zentrifugation bei 1 000 g sedimentiert und in PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in 100-250 µl Lysispuffer aufgenommen und mit 4 - 10 µl PIs versetzt. Die 20 minütige Lyse der Zellen auf Eis wurde durch zehnmahlige Passage durch 23-Gauge Kanülen noch verstärkt. Durch 20 min. Zentrifugation bei 14 000 g wurden alle unlöslichen Bestandteile sedimentiert und der Überstand wurde als Gesamtzellysat weiter untersucht.

2.8.1.2 Membranpräparation

Sofern es nötig war, Zytoplasma und Membranen voneinander zu trennen, z.B. um Membranproteine anzureichern, wurde eine Membranpräparation durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Zellen in PBS abgeschabt und gewaschen. Die Zellpellets wurden in 100-300 µl PBS + PIs aufgenommen und sechs mal 10 sek. bei 50% Amplitude sonifiziert. Um größere Fraktionen wie genomische DNA und Membranaggregate zu entfernen, wurde

15 min. bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur 60-minütigen Ultrazentrifugation bei ca. 100 000 g eingesetzt. Daraus resultierten die zytosolische Fraktion im Überstand und die Membranfraktion im Pellet. Beide wurden in SDS-Probenpuffer 5 min. bei 95°C aufgeköcht und zur weiteren Analyse in SDS-Gelen separiert (2.8.3.1.1).

2.8.1.3 Proteinernte zur Untersuchung von Phosphorylierungen

Zur Untersuchung von phosphorylierten Proteinen müssen bei der Bearbeitung der Proben besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Als Inhibitoren für Phosphatasen wurden in alle Puffer 0,1 mM Natrium-Vanadat (hemmt Tyrosin-Phosphatasen.), 1,5 mM EGTA, 1,0 mM EDTA (hemmen Proteinphosphatasen (PP) PP2C und – weniger gut – PP2A.), und 5,0 µM Okadaic-Säure zur Hemmung von PP1, PP2A und PP2B gegeben. Die Konzentrationen wurden anhand der Herstellerangaben gewählt.

Nicht zu dicht gewachsene NT2- oder BON-Zellen wurden über Nacht in definiertem, serumfreiem Medium und anschließend mit 1 nM KA für definierte Zeiten inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit und zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Lyse in 300 µl Harnstoff-Lysispuffer. Nach einer Sonifikation (6x 10 sek. bei 50% Amplitude) und 15 min. Zentrifugation bei 16 000 g wurden die Proteine bis zur weiteren Verwendung in einer SDS-PAGE oder in Zweidimensionalen Elektrophoresen (2.8.3) bei –80°C gelagert.

2.8.1.4 *In vitro*-Generation von SorICD

Da die freigesetzten Intrazellulärdomänen der γ -Sekretase-Substrate sehr instabil sind, wurde ein für die Anreicherung der Intrazellulärdomäne des Amyloiden Vorläuferproteins entwickeltes Protokoll (Sastre et al., 2001; Pinnix et al., 2001; McLendon et al., 2000) angewendet, um SorICD anzureichern.

Nicht zu dicht bewachsene SorLA-CTF*- oder SorLA-Volllänge-überexprimierende HEK293-Zellen wurden in 5 ml kaltem PBS abgeklopft und 5 min bei 1 000 g und 4°C zentrifugiert. Pro 75 ml Zellkulturflasche wurden 500 µl hypotoner Puffer und 20 µl PIs zum Zellpellet gegeben und mit der Pipette suspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mittels zehnmahliger Passage durch 23-Gauge Kanülen aufgebrochen. Kerne und größere Membranaggregate wurden durch 15 min. zentrifugieren bei 4°C und 1000 g entfernt. Die Gewinnung der Membranfragmente erfolgte durch vierzigminütige Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C. Die Membranpellets wurden in 25 µl Citratpuffer und 1 µl PIs pro eingesetzter 75 ml Zellkulturflasche resuspendiert. Die Membransuspension wurde entweder in Ansätze von 25 µl aufgeteilt oder in größeren Volumina zur Generation von SorICD verwendet. Als Negativkontrolle diente dabei immer ein Ansatz mit 5 µM DAPT, der ansonsten gleich behandelt wurde. Teilweise wurden zu den Ansätzen Inhibitoren wie Insulin

gegeben (2.8.1.5). Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C und 500 rpm oder zur Kontrolle auf Eis inkubiert und anschließend 1 h bei 100 000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun u.a. die aus den Membranfragmenten freigesetzten ICDs von SorLA und auch von APP (AICD), da die verwendeten Zellen auch Volllänge-APP überexprimierten. Eine Proteinmengenbestimmung im Überstand ergab eine Konzentration von ca. 2,2 µg/ml. Die Überstände wurden entweder sofort in 4x SDS-Probenpuffer aufgekocht oder für Abbauversuche (siehe 2.8.1.5) weiterverwendet. Die DAPT-behandelten Negativkontrollen wurden immer sofort aufgekocht. Gegebenenfalls wurde auch das Membranpellet in mind. 100 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die weitere Untersuchung der Proben erfolgte per SDS-PAGE mit Gradientengelen und immunologischem Proteinnachweis mit Antikörpern gegen SorLAcp, c-Myc oder APPcp.

2.8.1.5 Versuche zum Abbau des SorICDs

Frisches Zytoplasma, dessen SorICD-abbauende Enzymaktivität untersucht werden sollte, wurde aus IDE-überexprimierenden HEK293- oder endogen SorLA exprimierenden BON- bzw. NT2-Zellen gewonnen. Dazu wurden diese Zellen in PBS abgeklöpft oder –geschabt und bei 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Pellets in 100 – 200 µl PBS aufgenommen und 30x durch 23-Gauge Kanülen gezogen. Nach Abtrennung der Kerne und folgender 40 min. Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C konnte das Zytoplasma zur Proteinmengenbestimmung nach Bradford (2.8.2) eingesetzt werden.

Zur Untersuchung der abbauenden Aktivität des SorICDs wurde dieses in größeren Mengen wie in 2.8.1.4 beschrieben hergestellt. Die Überstände aus der Ultrazentrifugation der SorICD-Generation wurden in 20 µl Ansätze aufgeteilt und mit definierten Mengen des frisch isolierten Zytoplasmas und/oder potentiellen Inhibitoren des Abbaus versetzt und mit PBS auf gleiche Volumina gebracht. Folgende Inhibitoren wurden eingesetzt: 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 200 µg/ml Insulin und 10 µM Lactacystin. Die Ansätze wurden dann 2 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend sofort in 4x SDS-Probenpuffer aufgekocht

2.8.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Wenn definierte Proteinmengen eingesetzt werden sollten, wurde eine Proteinmengenbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Jeweils 2 und 5 µl Proteinprobe wurden in 50 µl 0,1N NaOH aufgenommen und 950 µl Roti-Nanoquant (1:5 in H₂O) dazugegeben. Gleichzeitig wurde eine Eichkurve mit 0 – 2 mg/ml BSA mitgeführt. Die optische Dichte der Proben bei 595 nm wurde in einem Biotrak II Plate Reader gemessen und die Proteinkonzentration in den Proben anhand der Eichkurve abgeschätzt.

2.8.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

2.8.3.1 Eindimensionale Elektrophoresen

2.8.3.1.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von größeren Proteinen wurden in der Regel denaturierende Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGEs) mit einer Acrylamid-konzentration von 10% (Laemmli, 1970) verwendet. Waren besonders die kleineren Fragmente eines Proteingemisches von Interesse, z.B. zur Detektion der Intrazellulärdomäne, so wurden kommerziell erhältliche 4-12% NuPAGE® Novex Bis-Tris-Gradientengele mit dazugehörigem Laufpuffer verwendet. Die zu denaturierenden Proben wurden mit 1/3 Volumen 4x SDS-Probenpuffer für 5 min. bei 95°C aufgeköcht. In jedem Gellauf wurde zusätzlich ein Proteinmarker (Rpm 800 oder MultiMark) aufgetragen. Die Spannung für den Gellauf variierte zwischen 80 und 120 V.

2.8.3.1.2 InGEL Fluoreszenz

Der in der Präparation von Gesamtzelllysaten (2.8.1.1) gewonnene Überstand wurde 1:1 mit Novex® Native TrisGly Sample Buffer versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der nicht-reduzierten Proben in einer Standard-SDS-PAGE mit 0,1% SDS in Gel und Puffer. Unmittelbar nach dem Lauf wurde mit einem Fluorescence Reader Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) mittels eines Lasers mit 488 nm Anregungswellenlänge und einer Emissionswellenlänge von 526 nm die im Gel enthaltene Fluoreszenz detektiert. Da keine nicht-reduzierten und fluoreszierenden Marker vorhanden waren, wurde in diesen Elektrophoresen auf Marker verzichtet.

2.8.3.2 2-dimensionale Elektrophoresen

Zur allgemeineren Analyse von Phosphorylierungsreaktionen nach der Gabe von KA zu NT2- oder BON-Zellen wurden zweidimensionale Elektrophoresen durchgeführt. Zur Visualisierung der Proteinspots wurden zwei unterschiedliche Verfahren, zum einen die Färbung mit einem Phosphoprotein-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff (Pro-Q® Diamond) nach dem Gellauf, zum anderen die Markierung mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen vor dem Gellauf (Ettan™ DIGE System) verwendet. Diese Methode erlaubt die gleichzeitige Analyse von 2-3 Proben in einem einzigen Gel und erleichtert den Vergleich.

Für die spätere Färbung mit Pro-Q Diamond wurden die unter 2.8.1.3 gewonnenen Proben mit einem 2D-CleanUp Kit nach Vorschrift gereinigt und zur Proteinmengenbestimmung (2.8.2) eingesetzt.

Die 2D PAGE wurde unter Verwendung des IPGphor IEF Systems der Firma Amersham Biosciences nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur isoelektrischen Fokussierung wurden Immobiline DryStrips der pH Reichweiten 3–10, 4-7 und 5,3-6,5 verwendet. Die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte in 10%igen SDS-Gelen. Als Größenstandards dienten entweder der PeppermintStick™-Phosphoproteinmarker, der später gleichzeitig als Positivkontrolle der Phosphofärbung diente, oder der Marker Rpm 800.

Die Fixierung der Gele in 50% Methanol und 10% Eissessig sowie die Färbung des Phosphoproteoms mit Pro-Q Diamond mit anschließender Gesamtproteinfärbung mit SYPRO® Ruby erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Fluoreszenzen wurden in einem Fluorescence Reader Typhoon 9410 bei 532 nm Anregungswellenlänge und 580 nm Emission für Pro-Q Diamond-gefärbte und 610 nm Emission für SYPRO Ruby-gefärbte Gele gemessen. Auswertung und Vergleich der Gele wurden mit der Software 2D-Platinum ImageMaster™ 2D Platinum Version 5.0 durchgeführt.

Wurde das Ettan™ DIGE System zur Visualisierung der Proteinspots eingesetzt, erfolgte prinzipiell das gleiche Auftrennungsverfahren, die Proben wurden jedoch bereits vor dem Gellauf einer Fluoreszenzfarbstoff-Markierung nach Herstellerangaben unterzogen. Direkt nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele noch in den Glasplatten im Typhoon 9410 gelesen (Einstellungen: 488 nm Anregungswellenlänge und 520 nm Emission für CyDye2, 532 nm Anregungswellenlänge und 580 nm Emission für CyDye3 und 633 nm Anregungswellenlänge und 670 nm Emission für CyDye5). Die Auswertung erfolgte mit der Software DeCyder™ Biological Variation Analysis Software.

2.8.4 Immunologischer Proteinnachweis - Western Blot und Immundetektion

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen auf einer Membran wurden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zunächst in einer Mini-Protean3-Kammer für 45 min. bei 400 mA aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen (Towbin et al., 1979). Der Erfolg dieser Methode wurde mit einer Ponceau S-Färbung überprüft. Zur Blockierung der freien Bindestellen auf der Membran wurde diese in 20 ml TBST-Puffer mit 5% Magermilchpulver und 1% BSA über Nacht bei 4°C geschüttelt. Wenn als Primärantikörper solche gegen phosphorylierte Proteine eingesetzt wurden, erfolgte stattdessen die Blockierung in 1% BSA für 1h bei 37°C. Die Bindung des Primärantikörpers (siehe 2.5) erfolgte für 2 h bei RT in Blockierlösung unter Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für mind. 15 min. wurde 45 min mit dem Sekundärantikörper (2.5) in Blockierlösung inkubiert. Nun wurde abermals drei mal 15 min. mit TBST-Puffer gewaschen, die Membran mit PBS abgespült und mit dem Chemilumineszenz-Substrat kurz inkubiert. Röntgenfilme wurden für definierte Zeiten belichtet und im Kodak X-Omat 1000 Processor mit dazugehörigen Entwicklerlösungen entwickelt. Sollte eine zweite Detektion auf der Membran durchgeführt werden, so wurden die gebundenen Antikörper 30 min. bei 50°C in Dehybridisierungspuffer ohne Schütteln abgelöst. Nach zweimaligem Waschen mit TBST in großem Volumen konnte mit dem Blockierungsschritt des nächsten immunologischen Proteinnachweises begonnen werden. Densitometrische Auswertungen der Bandenintensität auf den Röntgenfilmen erfolgten nach Herstellerangaben mit dem Programm Image Quant (GE Healthcare).

2.9 Klonierung

Alle Klonierungen wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) und Herstellerangaben vorgenommen. Abschnitt 2.3 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Bei den selbst hergestellten Plasmiden ist angegeben, ob das Insert über eine Restriktion oder per PCR hergestellt wurde. Genauere Darstellungen der hergestellten Plasmide können dem Anhang entnommen werden. Die Antibiotika zur Selektion sind ebenfalls in 2.3 angegeben. Alle Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen wurden an einem Eppendorf Bio Photometer durchgeführt.

Polymerase-Ketten-Reaktionen wurden mit der Platinum Taq-DNA Polymerase nach Standardprotokollen bei 55°C Primerbindungstemperatur in einem T3 Thermocycler durchgeführt. PCR-Fragmente wurden ggf. zur weiteren Klonierung nach Herstellerangaben

in einen pGEM[®]-T Easy-Vektor zwischenligiert. Die verwendeten Primer können Abschnitt 2.4 entnommen werden.

Restriktionen und Auffüllreaktionen sowie Vektor-Dephosphorylierungen wurden mit Enzymen der Firma New England Biolabs durchgeführt. Zur Auftrennung der Restriktionsfragmente wurden 1%ige Agarose-Gele mit TBE-Puffer eingesetzt. Sollten definierte Fragmente aus dem Gel eluiert werden, kam ein QIAquick Gel Extraction Kit zum Einsatz.

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde ein Rapid DNA Ligation Kit nach Herstellerangabe eingesetzt. Chemokompetente *Escherichia coli*-Zellen des Stammes Top 10 F- (ursprünglich Invitrogen) wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (Hanahan, 1985) vorbereitet und nach Anleitung von Invitrogen transformiert, anstelle von SOC-Medium wurde jedoch LB-Medium verwendet. Die Anzucht möglicher Klone fand unter entsprechendem Selektionsdruck auf Agarplatten statt (siehe 2.6). Einzelne Kolonien wurden in 3 ml LB-Selektionsmedium angezogen und die Plasmide mit dem SEQLAB-Laccone-Kit isoliert. Solche Plasmide mit korrektem Kontrollrestriktionsmuster wurden in der Serviceabteilung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg sequenziert. Die Sequenzierungsprimer sind in 2.4 dargestellt. Eine Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mit dem Programm DNA-Star.

ERGEBNISSE

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Signalübertragung durch den neuronalen Typ-I-Transmembranrezeptor SorLA zu analysieren und näher zu charakterisieren.

Der bereits in der Literatur (Hampe et al., 2000; Kayser et al., 1998) beschriebene Effekt, dass die Stimulation von SorLA-exprimierenden Zellen mit seinem Liganden Kopfaktivator (KA) zu einer erhöhten Anzahl mitotischer Zellen führt, sollte dazu als physiologische Kontrolle der Signalübertragung dienen. In Kapitel 3.1 werden Versuche beschrieben, mit denen diese Mitose-Stimulation gemessen wurde und die für spätere Experimente als Kontrolle dienen sollten.

Die Kapitel 3.2 und 3.3 widmen sich der Untersuchung von indirekten und direkten Signalübertragungen durch den Rezeptor durch Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden (Kapitel 3.2) als auch durch Freisetzung der zytoplasmatischen Domäne und deren Translokation in den Zellkern (Kapitel 3.3).

3.1 Mitose-Induktion nach Kopfaktivator-Stimulation von SorLA-exprimierenden Zellen

Kayser et al. (1998) untersuchten die Reaktionen von humanen Zellen der Linie BON, auf eine Behandlung mit KA. Die Zelllinie BON entstammt neuroendokrinen Karzinoid-Tumoren (Evers et al., 1994). Diese Zellen exprimieren endogen SorLA und nutzen KA als autokrinen Wachstumsfaktor (Kayser et al., 1998; Hampe et al., 2000). Die DNA der Zellen wurde von Kayser et al. fluoreszenzmarkiert und die Zellen mittels Durchflusszytometrie unter Berücksichtigung ihrer Granularität (Side Scatter) auf den Anteil mitotischer Zellen überprüft. Gefunden haben die Autoren eine Erhöhung der Anzahl an Zellen, die sich nach 2 h Behandlung mit KA in Mitose befanden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch an neuronalen Vorläuferzellen der Linie NT2 beobachtet werden. Diese Daten stammten jedoch nicht aus durchflusszytometrischen Analysen, stattdessen wurden NT2-Zellen mit markierter DNA (Hampe et al., 2000) oder nach Fluoreszenzmarkierung des mitosespezifisch-phosphorylierten Histon H3s am Mikroskop ausgezählt (Lintzel et al., 2002).

Diese Ergebnisse sollten in der vorliegenden Arbeit mittels eines neuen, erweiterten Versuchsaufbaus, bei dem die zur Durchflusszytometrie eingesetzten Zellen zusätzlich zur DNA-Färbung noch mit einem Antikörper gegen die mitosespezifische phosphorylierte Form des Histon H3s (H3P) fluoreszenzgefärbt wurden, bestätigt werden. Zusätzlich wurde in einem Wachstumsversuch mit alamarBlue, einem Farbstoff, mit dem die Stoffwechselaktivität von Zellen als indirekter Nachweis der Zellzahl gemessen werden kann, die Vermehrungsrate von Kopfaktor-stimulierten im Vergleich zu unstimulierten Zellen gemessen.

Da üblicherweise für die Zellkultur eingesetztes Kälberserum Kopfaktor und unspezifizierte Wachstumsfaktoren enthält (Bodenmüller and Roberge, 1985), erfolgte vor dem jeweiligen Versuch eine Inkubation in definiertem Medium ohne Serum (Bottenstein and Sato, 1979; Kayser et al., 1998).

3.1.1 Spezifität von Histon H3P als Mitosemarker in der Immunfluoreszenz

Um den Anteil mitotischer Zellen einer Population zu ermitteln, sollte ein experimentelles Protokoll etabliert werden, das den Vorteil der Durchflusszytometrie, sehr viele Zellen in sehr kurzer Zeit zu analysieren, nutzt. Als Mitosemarker wurden dabei zum einen der DNA-Gehalt der Zellen, zum anderen die spezifische Phosphorylierung des Histon H3s am Serinrest 10 verwendet. Zunächst wurde in einer Immunfluoreszenzfärbung (2.7.4) die Markierung der mitotischen Zellen untersucht.

Abbildung 3.1 zeigt die Spezifität des Antikörpers gegen phosphoryliertes Histon H3 (α -H3P) für mitotische Zellen (A), deren kondensierte DNA nach Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7AAD (B) gut zu erkennen ist. Im Durchlicht (D) erkennt man eine veränderte Morphologie der sich teilenden Zellen. Dieses Färbeprotokoll war demnach geeignet, mitotische Zellen zu identifizieren.

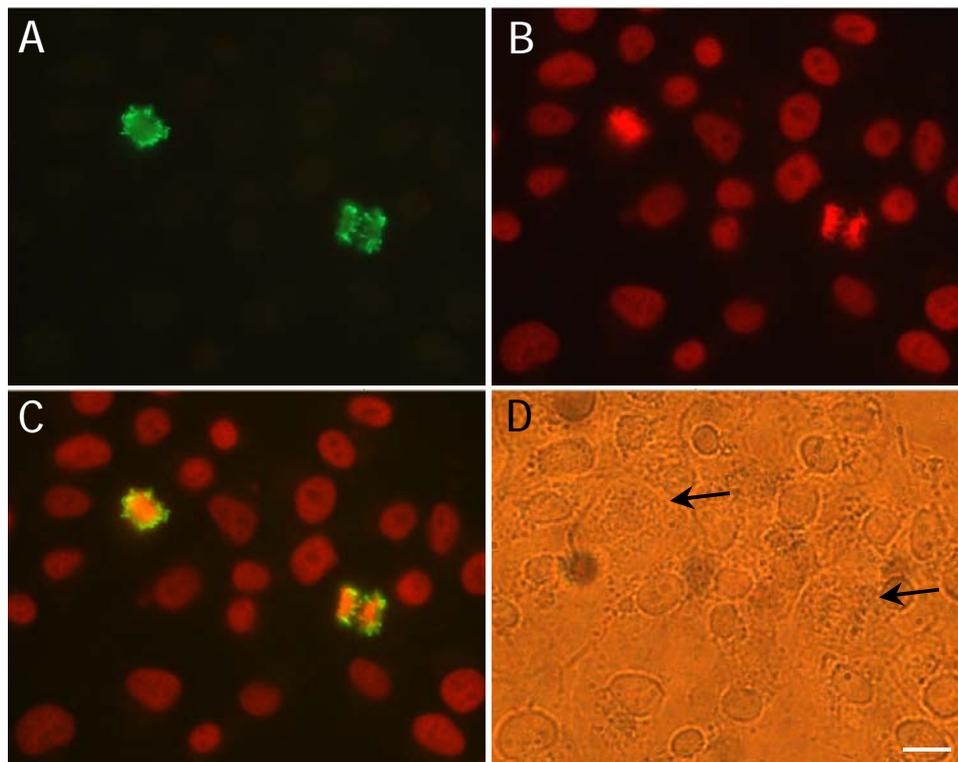


Abb. 3.1: Immunfluoreszenzfärbung von NT2-Zellen zur Prüfung der in der Durchflusszytometrie eingesetzten Markierung mitotischer Zellen

NT2-Zellen wurden über Nacht in definiertem Medium inkubiert, fixiert und mit einer Kombination aus dem Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 (α -H3P) und einem Alexa488-gekoppelten sekundären Antikörper markiert. Gleichzeitig erfolgte eine DNA-Färbung aller Zellen mit 7AAD. Mittels nicht-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde der Erfolg der Färbung geprüft. **A)** Spezifische Färbung mitotischer Zellen mit α -H3P. **B)** DNA-Färbung mit 7AAD. **C)** Überlagerung der Fluoreszenzbilder. **D)** In der Durchlichtaufnahme sind die mitotischen Zellen mit Pfeilen markiert. Die Größenangabe entspricht 20 μ m.

3.1.2 Etablierung eines Systems zur Bestimmung der mitotischen Zellpopulation in der Durchflusszytometrie

Um festzustellen, welche Population in der Durchflusszytometrie die mitotischen Zellen darstellt, wurden zunächst NT2-Zellen mit α -H3P und 7AAD gefärbt und im Zytometer analysiert (2.7.6). Abbildung 3.2 zeigt eine typische Verteilung der Zellen bei Messung der DNA- (A) bzw. H3P-Färbung (B). Die Verteilung der DNA-Fluoreszenzintensitäten in einer Population aus 20 000 Zellen hat typischerweise einen Peak für die Zellen in der G1-Phase mit doppeltem Chromosomensatz ($2n$) und einen für solche nach der S-Phase mit verdoppeltem DNA-Gehalt ($4n$). Dazwischen liegt die Population der Zellen, die in der S-Phase einen DNA-Gehalt zwischen 2 und $4n$ haben. Zellaggregate haben höhere Fluoreszenzwerte. Ein Großteil der H3P-gefärb-

ten Zellen besitzt eine starke Hintergrundfluoreszenz, während diese bei positiven Färbungen mindestens um Faktor 10 verstärkt ist.

Nach Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten (C) wird eine Zellpopulation **M** erkennbar, welche die mitotischen Zellen beinhaltet. Um diese Population konnte mit der Software CXP ein Analysefenster gelegt werden, mit dem der Anteil dieser Zellen im Vergleich zur analysierten Gesamtzahl bestimmt werden konnte.

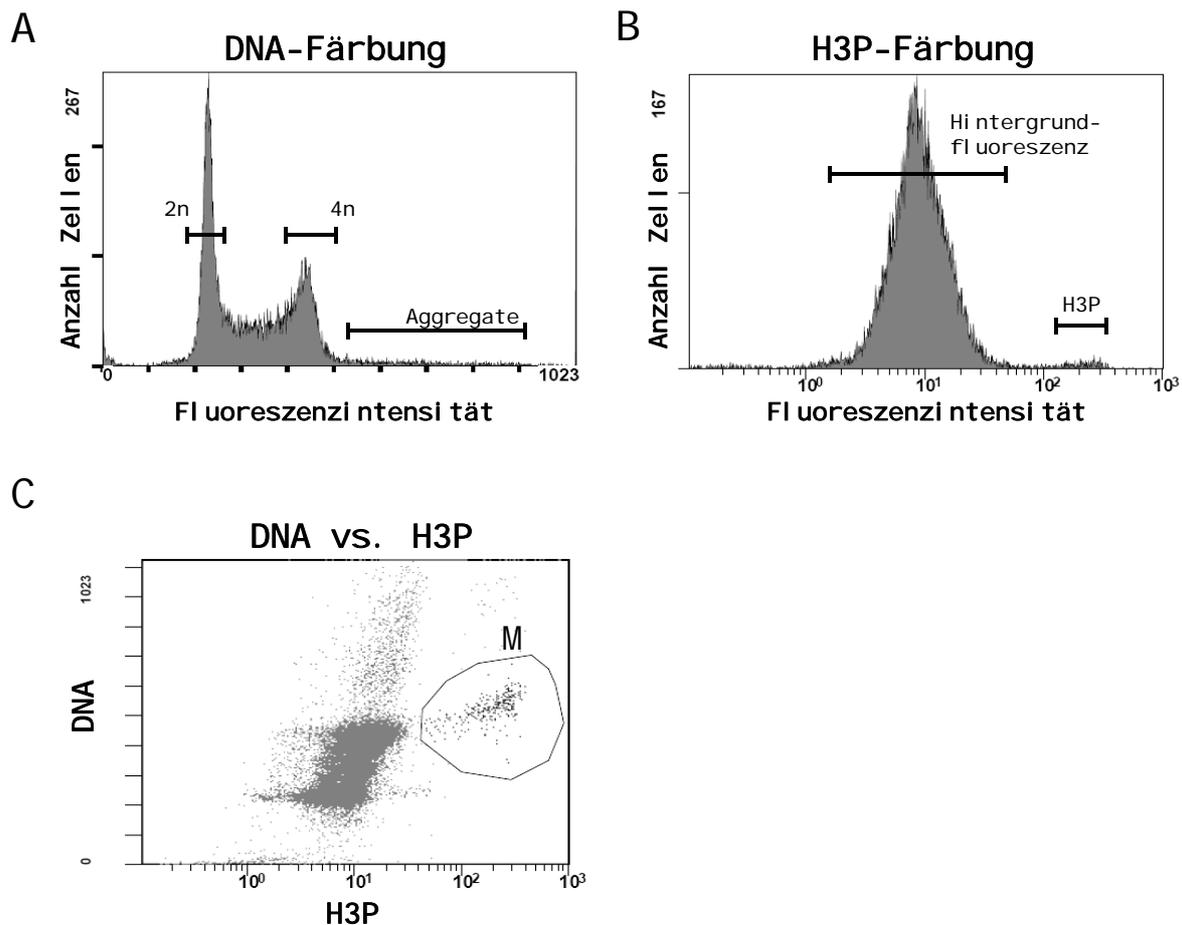


Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils der mitotischen Zellen einer Population

NT2-Zellen wurden in Lösung mit α -H3P und einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper sowie mit 7AAD gefärbt und anschließend einer Analyse am Durchflusszytometer unterzogen. **A)** DNA-Färbung. **B)** Indirekte H3P-Färbung. **C)** Direkter Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der H3P- und der DNA-Färbung. Die Population mitotischer Zellen ist gekennzeichnet (**M**).

2n = doppelter Chromosomensatz; 4n = vierfacher Chromosomensatz; H3P = mitosespezifisch phosphoryliertes Histon H3

Die Population **M** sollte zusätzlich als Mitose-Population bestätigt werden, indem NT2-Zellen in definierten Zellzyklus-Phasen synchronisiert wurden (2.7.7 und Abb. 3.3). Thymidin arretiert die Zellen am G1/S-Übergang (B). Der Prozentsatz der Zellen

im Fenster **M** liegt bei 0,28% im Vergleich zu 1,37% in der unsynchronisierten Kontrolle (A). Eine Mitomycin C-Behandlung führt zur Arretierung der Zellen hauptsächlich in der S-Phase, mit 0,18% mitotischen Zellen (C), und Colchicin eignet sich zur Synchronisation der Zellen in Mitose (D). Dies äußert sich im 47%igen Anteil der Zellen im Fenster **M**.

Besonders die Behandlung der Zellen mit Colchicin bestätigt die Zuordnung der Population **M** in der Gegenüberstellung von H3P- und 7AAD-markierten Zellen als mitotische Fraktion. Somit war ein experimentelles Protokoll etabliert, das eine Bestimmung des Anteils mitotischer Zellen zuließ.

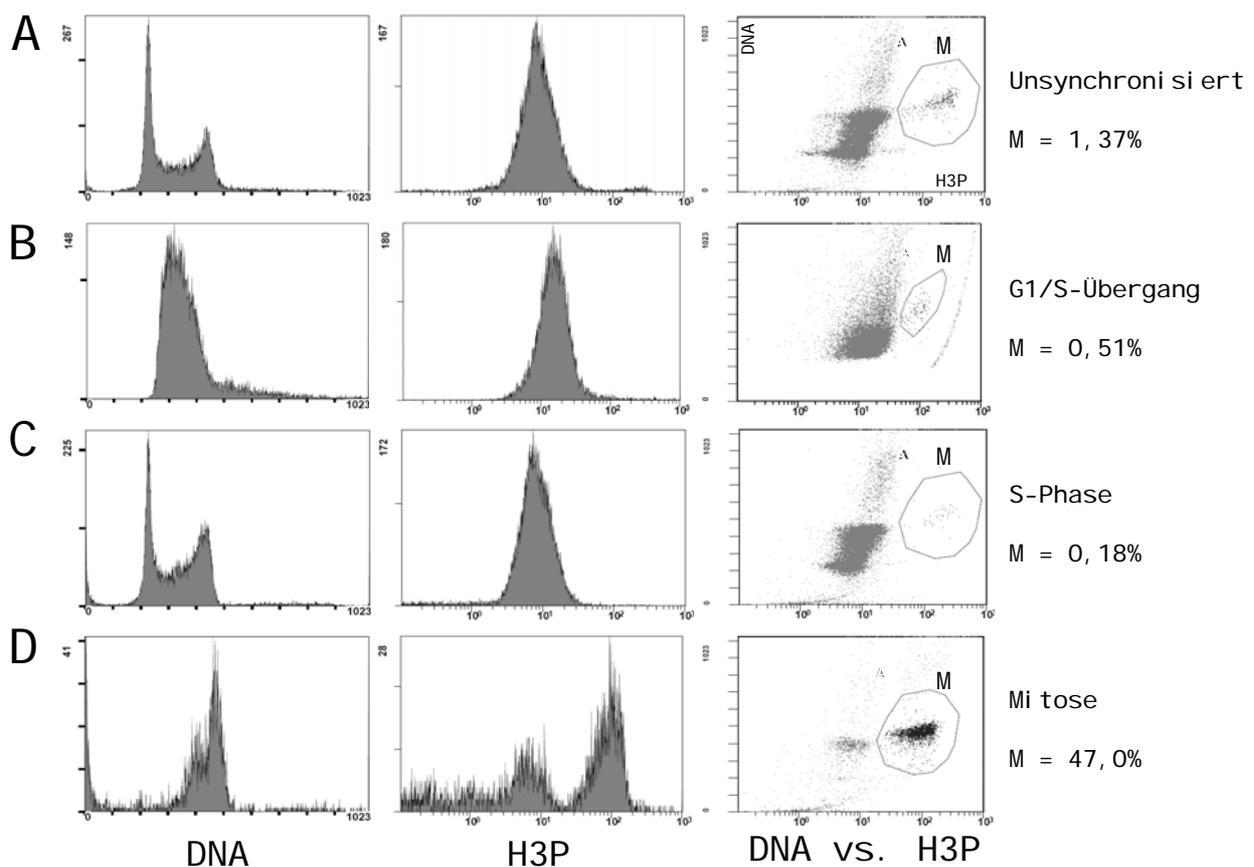


Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Analyse von synchronisierten NT2-Zellen

NT2-Zellen wurden synchronisiert und wie in Abbildung 3.2 beschrieben analysiert. **A)** Unsynchronisierte NT2-Zellen. **B)** Arretierung in der G1-Phase. Thymidinbehandlung führt zu einem hohen Anteil an $2n$ -Zellen und geringem Anteil mitotischer Zellen. Diese Präparation wurde unabhängig von den anderen dargestellten analysiert und zeigt daher eine leichte Verschiebung der Hintergrundfluoreszenz der H3P-Färbung. Auch die Größe des Fensters **M** muss bei jeder Messung der Population angepasst werden. **C)** Arretierung in der S-Phase durch Mitomycin C resultiert in erhöhten Zellzahlen mit einem DNA-Gehalt zwischen $2n$ und $4n$ und einer geringeren Anzahl von Zellen in Mitose. **D)** Arretierung in der Mitose durch Colchicin führt zur Erhöhung des Anteils an Zellen mit einem DNA-Gehalt von $4n$ und einer positiven H3P-Färbung.

3.1.3 Inkubation mit Kopfaktivator bewirkt keine Veränderung des Anteils mitotischer Zellen

Zur Bestimmung des mitosestimulierenden Effekts von Kopfaktivator (KA) wurden NT2-Zellen für mit KA inkubiert und der Anteil mitotischer Zellen in durchflusszytometrischen Analysen gemessen.

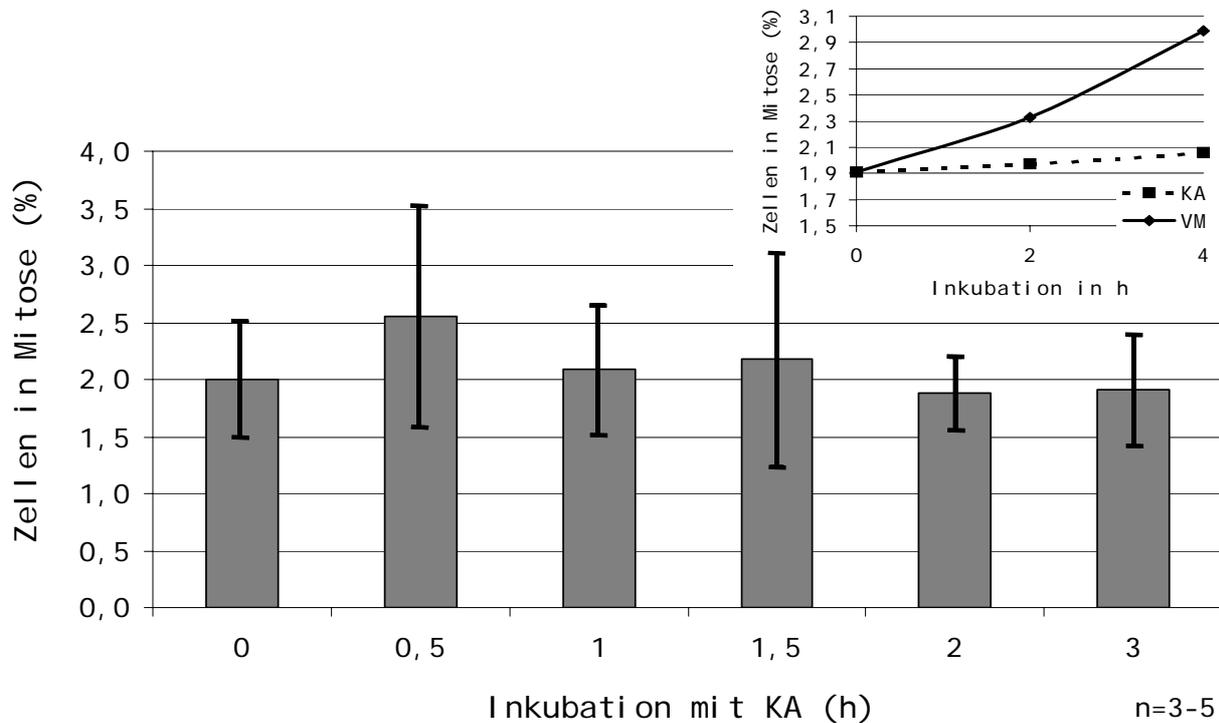


Abb. 3.4: Der Anteil mitotischer Zellen nach KA-Behandlung von NT2-Zellen

NT2-Zellen wurden über Nacht in definiertem Medium und anschließend für 0-3 Stunden mit 1 nM KA inkubiert. Die Analyse erfolgte wie in Abbildung 3.2 beschrieben. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 bis 5 unabhängigen Versuchen mit jeweils 20 000 gemessenen Zellen. Die eingerückte Abbildung zeigt als Zunahme der mitotischen Zellpopulation nach 2 und 4 h Vollmedium (VM) im Vergleich zur KA-Stimulation (Positivkontrolle).

Der Anteil an mitotischen Zellen in NT2-Kulturen ohne KA-Behandlung lag zwischen 1,2 und 2,5 % (Abb. 3.4). Nach 0,5 bis 3-stündiger Inkubation mit KA konnte keine signifikante Zunahme dieses Anteils festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben lagen meist noch im Bereich der versuchsbedingten Schwankungen bei der Fensterdefinition. Ähnliche Ergebnisse wurden in einem Versuch mit BON-Zellen erzielt (nicht gezeigt).

Da ein mitogener Effekt von KA bei synchronisierten Zellen eventuell stärker hervortritt, wurde der obige Versuch mit NT2-Zellen nach Synchronisation mit Thyminid wiederholt. Auch hier konnte kein erhöhter Anteil an mitotischen Zellen nach

KA-Behandlung festgestellt werden (nicht gezeigt). Da die Thymidin-Arretierung die einzige reversible der verwendeten Synchronisationsmethoden war, konnte der Effekt von KA auf Zellen in anderen Zellzyklus-Phasen nicht geprüft werden.

Auch mittels immunologischem Proteinnachweis mit dem Antikörper gegen H3P konnte nicht festgestellt werden, dass eine Behandlung von unsynchronisierten BON-Zellen mit 1 nM KA zu einer vermehrten Phosphorylierung des Histon H3s führt (n=2, nicht gezeigt).

3.1.4 Kopfaktivator hat keinen Einfluss auf die Proliferation von Zellen

Als alternative Nachweismethode zur Untersuchung der mitogenen Wirkung von Kopfaktivator wurde eine indirekte Zellzahlbestimmung mit alamarBlue™ durchgeführt (2.7.3). Eine chemische Reduktion des Zellkulturüberstandes während der Zellatmung ist abhängig von der Zahl der Zellen und kann durch eine Fluoreszenzzunahme des Farbstoffes gemessen werden. Vergleiche der Reduktion des Farbstoffes durch Kontroll- und KA-behandelte Zellen sollten Rückschlüsse über eine Änderung der Proliferationsaktivität in Abhängigkeit von KA ermöglichen.

Die Versuchsparameter wurden optimiert und es wurde sichergestellt, dass die Zugabe von alamarBlue keinen negativen Effekt auf das Wachstum der Zellen hat.

Abbildung 3.5 A zeigt, dass die Fluoreszenzwerte abhängig sind von der Anzahl der ausgesetzten Zellen. Allerdings ist die Abhängigkeit nicht linear (doppelte Zellmengen bedeuten nicht doppelte Fluoreszenzintensität), was entweder daran liegen könnte, dass nicht alle Zellen gleichmäßig angewachsen sind oder aber die Stoffwechselaktivität der dichteren Zellen etwas nachlässt. Der selbe Effekt wurde auch für BON-Zellen beobachtet (nicht gezeigt). Es kann jedoch festgehalten werden, dass die Methode zum Zellzahlvergleich geeignet ist. Auf Grund von hohen Standardabweichungen ist sie aber evt. nicht sensitiv genug, um kleinere Veränderungen zu messen.

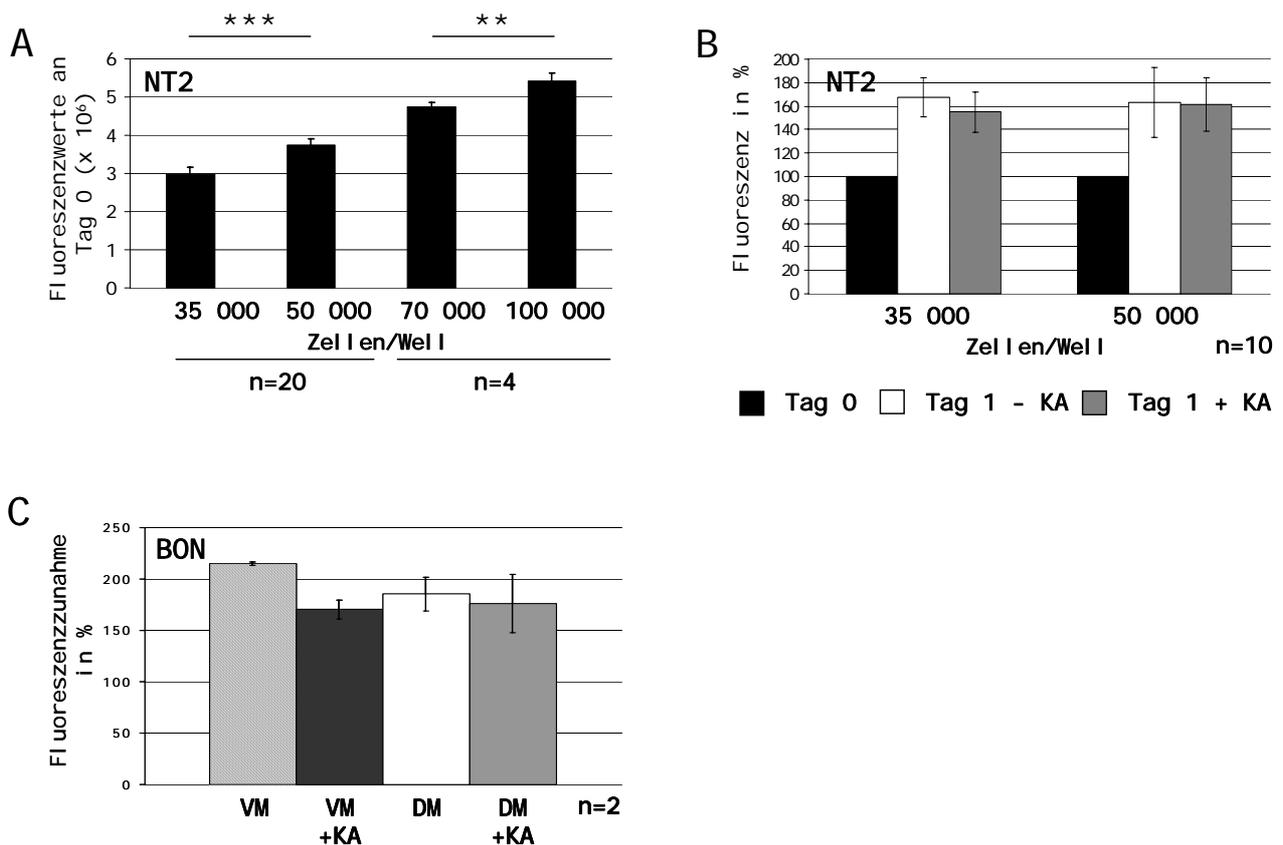


Abb. 3.5: Proliferationstest mit alamarBlue nach KA-Behandlung

Zwischen 30 000 und 100 000 Zellen wurden pro Well einer 24-Well-Platte ausgesetzt und an den angegebenen Tagen für 2 h mit 1/10 Mediumvolumen alamarBlue inkubiert und die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs gemessen. **A**) Kontrolle. Die am Tag 0 mit alamarBlue gemessene Stoffwechselaktivität von NT2-Zellen in Abhängigkeit von der Aussaatdichte (n=20 bzw. 4). **B**) Effekt von 1 nM KA auf NT2-Zellen nach eintägiger Inkubation. Die Fluoreszenzintensität an Tag 0 wurde hier als 100% definiert (n=10). **C**) Effekt von 1 nM KA in definiertem (DM) und serumhaltigem Medium (VM) auf BON-Zellen mit einer Aussaatdichte von 40 000 Zellen/Well nach fünftägiger Inkubation. Die Fluoreszenzintensität an Tag 0 wurde als 100% zugrunde gelegt (n=2). Statistik: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ermittelt im Students-t-Test.

In Abbildung 3.5 B ist gezeigt, dass in NT2-Zellen keine Veränderung der alamarBlue-Fluoreszenzintensität nach eintägiger Inkubation mit oder ohne KA festzustellen war. Fünf Tage Inkubation mit KA in definiertem Medium hatten auf die langsamer proliferierenden BON-Zellen ebenfalls keinen proliferationsstimulierenden Effekt (Abb. 3.5 C). Weiterhin scheint die Zugabe von KA zu Vollmedium eher einen negativen Effekt auf die Wachstumsrate von BON-Zellen zu haben. Dass die mit Vollmedium behandelten Zellen eine höhere alamarBlue-Fluoreszenzintensität zeigten als die in definiertem Medium inkubierten Zellen, war eine interne Positivkontrolle. Diese Beispiele spiegeln die Tendenz der Versuche wider, da keines von mehreren Experimenten mit verschiedenen Versuchsparametern (Dauer,

Zellzahl) eine prägnante und reproduzierbare Veränderung der Vermehrungsrate nach KA-Behandlung zeigte.

Somit ist festzuhalten, dass in zwei unabhängigen und optimierten Prüfmethode n kein mitogener Effekt von KA auf NT2- und/oder BON-Zellen nachgewiesen werden konnte.

3.2 Indirekte Signalübertragung durch Phosphorylierung

Parallel zur Mitoseinduktion in 3.1 wurden mögliche SorLA-Signalübertragungswege untersucht. Dieser Teil der Arbeit widmet sich der Untersuchung von Phosphorylierungskaskaden.

3.2.1 Der Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinase bleibt nach Kopfaktivatorbehandlung unverändert

Aufgrund des in der Literatur (Kayser et al., 1998) berichteten Influx von Kalziumionen ins Zytoplasma nach KA-Stimulus wurde zunächst der MAPK-Signalweg (Mitogen-activated Protein Kinase) zur Untersuchung ausgewählt, da die Zelle auf Ca^{2+} -Eintritt mit Aktivierung dieser Kaskade reagiert. Über Nacht in definiertem Medium kultivierte BON-Zellen wurden für 1 bis 30 min. mit 1 nM KA inkubiert. Die Zellproteingewinnung erfolgte in Gegenwart von Phosphatase-Inhibitoren (2.8.1.3). Gleiche Proteinmengen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels immunologischem Proteinnachweis mit einem Antikörper gegen die phosphorylierten, d.h. aktivierten Formen der MAPK-Untereinheiten ERK1 und ERK2 (Extracellular Signal-regulated Kinase) untersucht. Als anschließende Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen phosphorylierte und unphosphorylierte MAPK-Untereinheiten. Es konnten keine Unterschiede in den aktivierten Formen der ERK1- und 2-Proteine nach KA-Behandlung gefunden werden (nicht gezeigt). Statt einer Untersuchung weiterer spezifischer Kaskaden, wurde nun ein generalisierter Ansatz auf 2D-Basis zur Identifizierung möglicher Signalwege verfolgt.

3.2.2 2D-Gelelektrophorese (Färbung mit Pro-Q® Diamond und DIGE)

Um unspezifisch nach Veränderungen im Zellproteom als Reaktion auf eine KA-Behandlung zu suchen, wurden unter Verwendung von zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D) eine Vielzahl von Proteinen gleichzeitig analysiert. Modifikationen von Proteinen sollten mit dieser Methode unabhängig von in der Literatur beschriebenen Signalübertragungswegen aufgeklärt werden.

Zunächst wurde der neu entwickelte Farbstoff Pro-Q Diamond zur spezifischen Visualisierung der phosphorylierten Proteine nach Auftrennung in 2D-Gelen verwendet. Nach der Färbung mit diesem Farbstoff kann zusätzlich das Gesamtproteom mit SYPRO® Ruby gefärbt werden, um so stark phosphorylierte seltene von schwach phosphorylierten häufigen Proteinen zu unterscheiden. Ein Vergleich der Phosphorylierungsmuster von KA-behandelten und unbehandelten Proben sollte Hinweise auf möglicherweise an einer SorLA-Signalkaskade beteiligte Proteine geben.

Phosphoproteome von NT2-Zellen konnten nach KA-Behandlung und Proteinernte mit Phosphatase-Inhibitoren (2.8.1.3) trotz zahlreicher Optimierungsversuche nicht reproduzierbar mit Pro-Q Diamond gefärbt werden, obwohl die Auftrennung und die Färbung mit dem Gesamtprotein-Farbstoff sehr gut funktioniert hatte (Abb. 3.6).

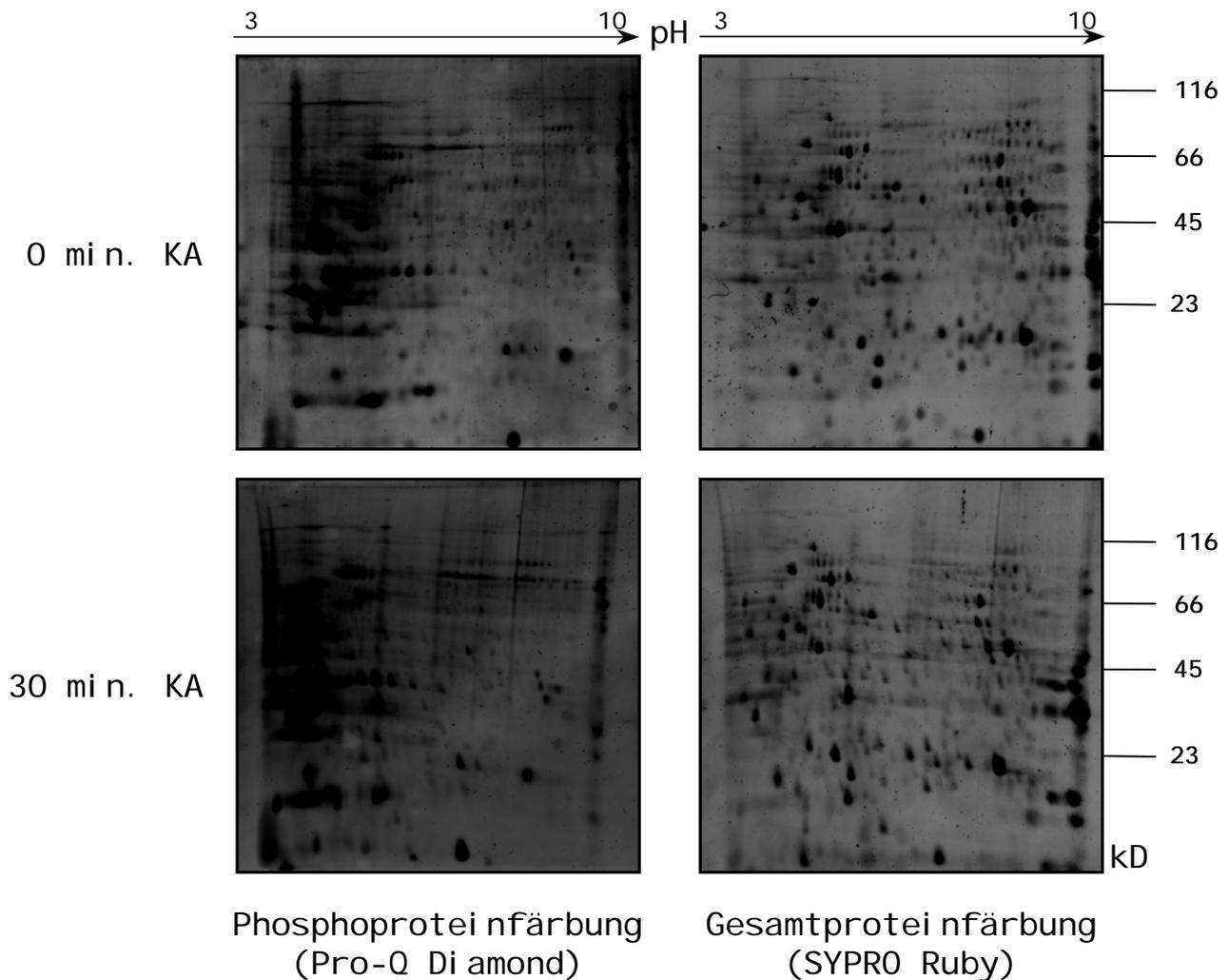


Abb. 3.6: Phosphoproteinfärbung nach 2-dimensionaler Auftrennung von KA-behandelten Proben

NT2-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 1 nM KA inkubiert und die Proteine nach dem Protokoll zur Ernte von phosphorylierten Proteinen präpariert. Es folgte die isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 3 – 10 über eine Länge von 7 cm und im Anschluss die Auftrennung anhand der Proteingröße in 10%igen SDS-Gelen. Zunächst wurden in den Gelen die Phosphoproteine mit Pro-Q Diamond gefärbt (linke Seite). Die hier dargestellten Bilder zeigen eine „sehr gute“ Färbung, die jedoch selten erreicht wurde. Man beachte die nicht-konstante Hintergrundfärbung, die eine Quantifizierung erschwert. Anschließend erfolgte die Gesamtproteinfärbung mit SYPRO-Ruby (rechts). Die Visualisierung erfolgte jeweils mit dem Fluoreszenzleser Typhoon.

Aufgrund dieser Problematik wurde nach alternativen Methoden zur Identifizierung phosphorylierter Proteine gesucht. Eine Überlegung war, sich die durch die Phosphorylierung bedingte Verschiebung des isoelektrischen Punktes (IE) eines Proteins zunutze zu machen und dadurch Unterschiede in den Proteomen KA-behandelter und –unbehandelter Zellen zu finden.

Das Prinzip der DIGE-Färbung (Difference Gel Electrophoresis) erlaubt die simultane Auftrennung mehrerer unterschiedlich markierter Proben in einem 2D-Gel. Überlagerungen von fluoreszenzmarkierten Proteinen, die in allen Proben vorkommen und gleiche Intensitäten aufweisen, zeigen in der Auswertung weiße Punkte. Farbige Punkte entstehen, wenn eine der drei Fluoreszenzen alleine vorkommt oder fehlt. Es wurde untersucht, ob eventuelle IE-Verschiebungen durch Phosphorylierungen nach KA-Induktion feststellbar sind. Im gleichen Experimentalansatz könnten auch – nach längerer KA-Induktion – Veränderungen im Expressionsmuster aufgedeckt werden.

Proben aus NT2- oder BON-Zellen wurden nach unterschiedlich langer KA-Behandlung mit Fluoreszenzfarbstoffen des Ettan™ DIGE Systems markiert und zweidimensional aufgetrennt (2.8.3.2). Die Visualisierung mit dem Fluoreszenzleser Typhoon 9410 zeigte den Erfolg der Auftrennung (Abb. 3.7).

Die exemplarischen Gele aus Abbildung 3.7 zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der Proteinmuster. Horizontale Verschiebungen von Proteinpunkten wären auf einen veränderten isoelektrischen Punkt des Proteins z.B. durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung zurückführbar. Allerdings waren selbst bei genauer Analyse solche Verschiebungen nicht erkennbar. Vertikale Verschiebungen kamen hingegen vielfach vor und sind auf das Versuchssystem zurückzuführen. Die Cy2-markierten Proteine zeigen anscheinend ein leicht erhöhtes und die Cy5-markierten ein leicht vermindertes Laufverhalten im SDS-Gel im Vergleich zu den Cy3-markierten Proteinen. Fehlende oder neu hinzugekommene Spots waren nicht erkennbar. Der grüne Punkt rechts unten in beiden Gelen ist unspezifisch und unabhängig von der Probe in allen Gelen zu finden. Eine reproduzierbare Veränderung war auch nach Auftrennung in engeren pH-Bereichen (z.B. 5,3 – 6,5) nicht nachweisbar (nicht gezeigt).

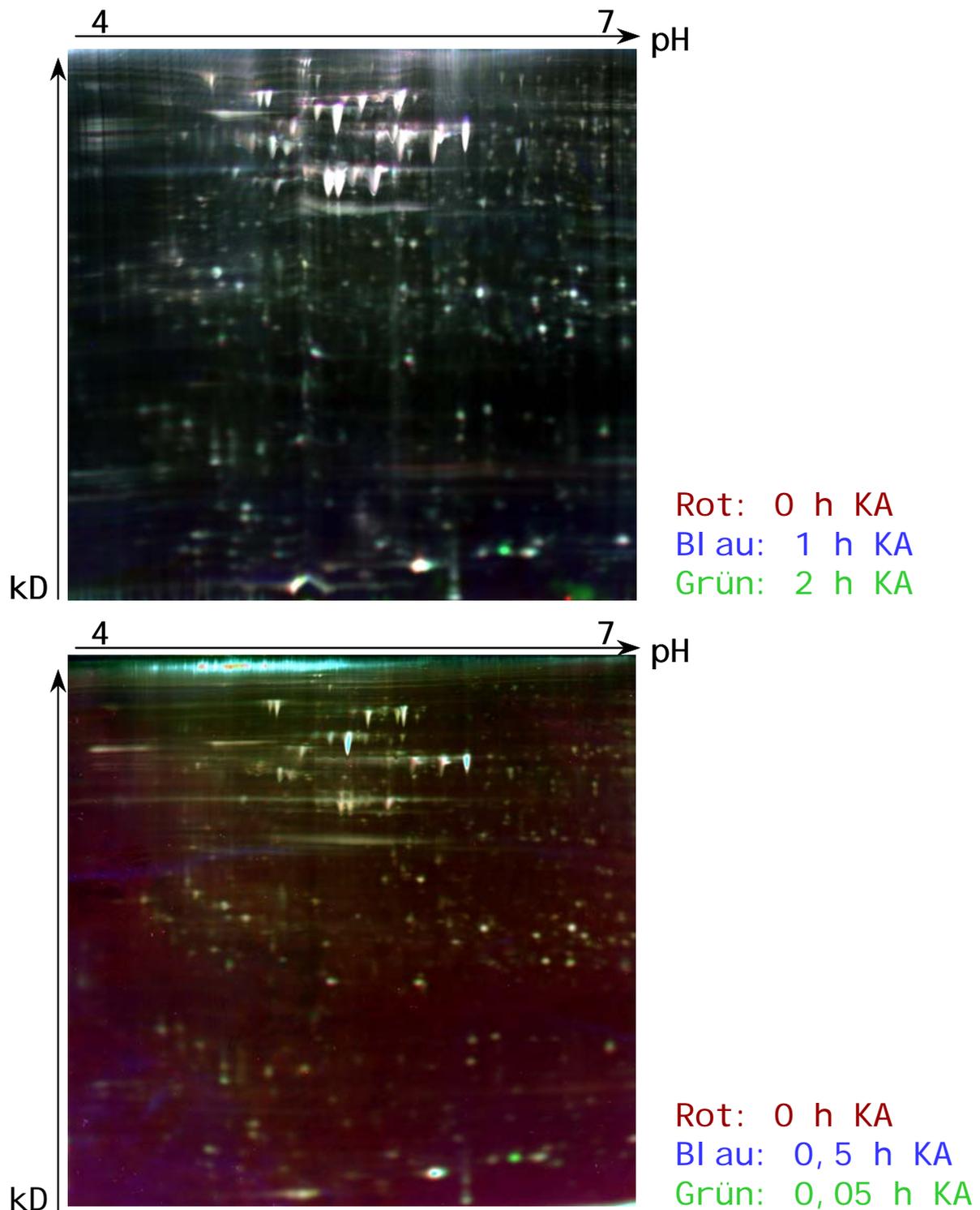


Abb. 3.7: 2-dimensionale Auftrennung von DIGE-markierten Proben

BON-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 1 nM KA inkubiert. Die Proteine wurden nach dem Protokoll zur Ernte von phosphorylierten Proteinen präpariert und jeweils mit den DIGE-Farbstoffen Cy2 (Rot), Cy3 (Blau) und Cy5 (Grün) markiert. Es folgte die isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 4 – 7 über eine Länge von 24 cm und im Anschluss die Separation anhand der Proteingröße in 10%igen SDS-Gelen. Die Visualisierung erfolgte mit dem Fluoreszenzleser Typhoon. Die dargestellten Gele resultieren aus zwei unabhängigen Versuchen.

Auch in diesen KA-abhängigen Versuchen konnte keine Veränderung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die nachfolgenden Versuche wurden daher unabhängig von KA durch direkte biochemische Analysen des Rezeptors selbst vorgenommen.

3.3 Direkte Signalübertragung durch Freisetzung der Intrazellulärdomäne

Im letzten Teil der Arbeit wird die direkte Signalübertragung durch den Rezeptor SorLA selbst untersucht. Für den Rezeptor Notch konnte eine direkte Signalübertragung nachgewiesen werden: die durch die γ -Sekretase freigesetzte Intrazellulärdomäne gelangt in den Kern, wo sie die Expression spezifischer Gene vermittelt (Selkoe and Kopan, 2003). Wie in Bohm et al. (2006) veröffentlicht, wird auch die Intrazellulärdomäne von SorLA durch die γ -Sekretase aus der Membran entlassen. Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse unterstützen diese Aussagen und zeigen Untersuchungen zum zellulären Verbleib, d.h. zum Abbau und zur Lokalisierung der freigesetzten, intrazellulären Domäne.

3.3.1 SorLA ist ein Substrat der Gamma-Sekretase

3.3.1.1 Akkumulation von SorLAs CTF nach spezifischer Inhibition der γ -Sekretase

Wie bereits für andere Typ-I-Transmembranproteine wie Notch (De Strooper et al., 1999), dem Amyloiden Vorläuferprotein APP (Sastre et al., 2001) und dem SorLA-verwandten LRP1 (May et al., 2002) gezeigt werden konnte, führt die differentielle Prozessierung dieser Rezeptoren durch α - und γ -Sekretasen zur Freisetzung der Intrazellulärdomänen (ICDs) ins Zytoplasma.

Um zu zeigen, dass auch SorLA ein Substrat für die γ -Sekretase ist, wurden SorLA-überexprimierende Zellen mit dem spezifischen γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (Dovey et al., 2001) behandelt. Wie Abbildung 3.8 A zeigt, sollte durch diese Inhibition nicht das intrazelluläre, 10 kD große SorICD (SorLA Intracellular Domain) freigesetzt

werden, sondern das membranständige, etwa 13 kD große CTF (C-Terminal Fragment) auflaufen.

DAPT-behandelte Zellen akkumulieren - wie erwartet - ein etwa 13 kD großes Fragment (Abb. 3.8 B). Weiterhin ist zu erkennen, dass in den DMSO-behandelten Kontrollzellen weder das CTF, noch das intrazelluläre Fragment (SorICD) mit dem Antikörper gegen den C-Terminus nachgewiesen werden kann. Dies wurde auch für andere γ -Sekretase-Substrate beobachtet und auf den schnellen Abbau der ICDs zurückgeführt.

Voraussetzung für einen γ -Sekretaseschnitt ist eine Prozessierung der Transmembranrezeptoren durch eine α -Sekretase. Dieser α -Schnitt von SorLA findet in geringem Umfang konstitutiv statt (Hampe et al., 2000) und könnte aufgrund von Bestandteilen des Vollmediums noch verstärkt worden sein.

Da die verwendeten SorLA-überexprimierenden HEK293 Zellen auch die neuronale Form von APP (APP₆₉₅) überexprimieren, war die Möglichkeit einer internen Kontrolle der Wirkung des spezifischen γ -Sekretase-Inhibitors gegeben. In Analogie zu SorLA konnte für APP eine Akkumulation des CTFs nach DAPT-Behandlung und kein ICD-Fragment nachgewiesen werden (Abb. 3.8 B rechts).

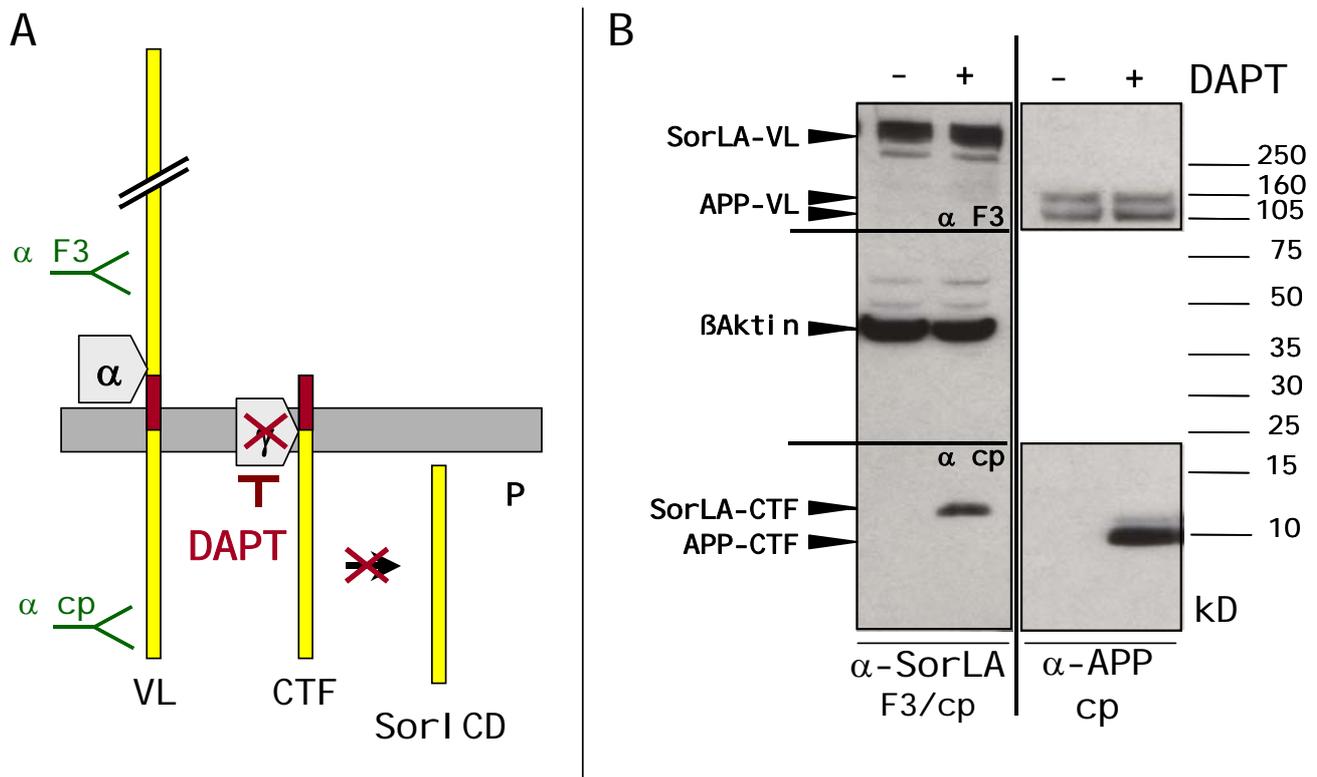


Abb. 3.8: Die Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT in SorLA-überexprimierenden Zellen

A) Schema des Versuchs. Volllänge(VL)-SorLA beinhaltet die Schnittstellen für die α - und die γ -Sekretase. Durch Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT verbleibt das C-terminale Fragment (CTF) in der Membran. Zusätzlich sind die Bindestellen der verwendeten Antikörper dargestellt. **B)** Akkumulation der CTFs von SorLA und APP. Stabil mit SorLA-Volllänge und APP transfizierte HEK293-Zellen wurden 16 h mit 1 μ M DAPT in DMSO (+) oder mit DMSO allein (-) behandelt und Gesamtproteinpräparationen in Gradientengelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Vor der Immundetektion wurde die PVDF-Membran bei ca. 100 und 25 kD zerteilt. Der Membranabschnitt mit den großen Proteinen wurde mit α -SorLA F3 (α F3), der mit den mittleren mit α - β Aktin (Ladekontrolle) und der mit den kleinen Proteinen mit α -SorLA cp (α cp) untersucht. Die Membranteile mit großen und kleinen Proteinen wurden anschließend von den Antikörpern befreit und mit α -APP cp detektiert.

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe erhöhte eine DAPT-Behandlung die Mengen an Volllänge-SorLA in SorLA-überexprimierenden Zellen (Bohm et al., 2006). Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abb. 3.8).

Auch NT2-Zellen mit endogenem SorLA wurden mit DAPT behandelt. Da in NT2-Zellen nur wenig SorLA vorhanden ist, war es nötig, eine Trennung von Zytoplasma und Membranen durchzuführen (2.8.1.2), um das membranständige CTF anzureichern (Abb. 3.9). Die aufgetragenen Proteinmengen wurden durch eine β Aktin-Ladekontrolle überprüft, welches auch in geringeren Mengen in den Membran-

fraktionen vorkommt. In immunologischen Proteinnachweisen mit α -SorLA cp konnte ein ca. 13 kD großes CTF in den DAPT-behandelten Zellen gefunden werden. Eine zusätzliche Bande in einem höheren Molekulargewichtsbereich war in auch in der Kontrolle vorhanden und kann als unspezifisch angesehen werden. Ein Anstieg der Menge an Volllänge-SorLA nach DAPT-Behandlung konnte mittels Nachweis mit α -SorLA cp auch hier nicht gefunden werden. Das PVDF-Membranstück mit den Proteinen über 75 kD wurde anschließend von den Antikörpern befreit und mit α -SorLA-F3 behandelt. Dieser Antikörper erkennt neben der membranständigen auch die lösliche Form (sSorLA = Ektodomäne). Der Größenunterschied zwischen löslichem und Volllänge-SorLA ist mit errechneten 10 kD jedoch gering und die Banden, die nach Detektion mit α -SorLA F3 zusätzlich zur Volllänge-Bande gefunden wurden, haben nicht die erwartete Größe von löslichem SorLA. Daher sind diese Banden vermutlich unspezifisch. Alle mit α -SorLA F3 gefundenen Banden waren in der DAPT-behandelten Probe stärker. Da der Nachweis von β -Aktin jedoch in etwa gleiche Mengen an aufgetragenem Protein bestätigte, ist zu vermuten, dass dieser Effekt durch die zweimalige Antikörperbehandlung entstanden ist. In einem weiteren Versuch, in dem die Reihenfolge der eingesetzten Antikörper zum Nachweis der Volllänge vertauscht war, konnte dieser Effekt nicht festgestellt werden (nicht gezeigt). Nur wenn sowohl durch α -SorLA cp als auch durch α -SorLA F3 ein Anstieg der Menge an SorLA-Volllänge nach DAPT-Behandlung festgestellt worden wäre, könnte von einem Rückkopplungsmechanismus ausgegangen werden.

Der deutlichste Unterschied von der DAPT-behandelten zur Kontroll-Probe in Abbildung 3.9 war in der Bande von etwa 200 kD zu erkennen. Sollte es sich bei dieser Bande tatsächlich um die lösliche Form von SorLA (sSorLA) handeln, so deutet dieser Unterschied auf eine (teilweise) Akkumulation des sSorLA an den Membranen hin. Lösliches SorLA sollte eigentlich von den Zellen abdiffundieren und im Medium zu finden sein. Eine Anhäufung in den Membranen nach DAPT Behandlung kann auf zwei Arten interpretiert werden: die Behandlung mit DAPT führt dazu, dass sSorLA nicht von den Membranen abdiffundieren kann oder die Prozessierung durch die α -Sekretase, die sSorLA freisetzt, findet nach DAPT-Behandlung vermehrt innerhalb der Zellkompartimente statt und sSorLA gelangt so bei der Präparation in die Membranfraktion.

Im zusätzlich analysierten Zytoplasma aus NT2-Zellen kann auch in der Kontrolle kein freies SorICD nachgewiesen werden. Die Banden knapp unterhalb der Höhe der Volllänge sind unspezifisch und bereits in früheren Experimenten beobachtet worden (Hampe et al., 2000).

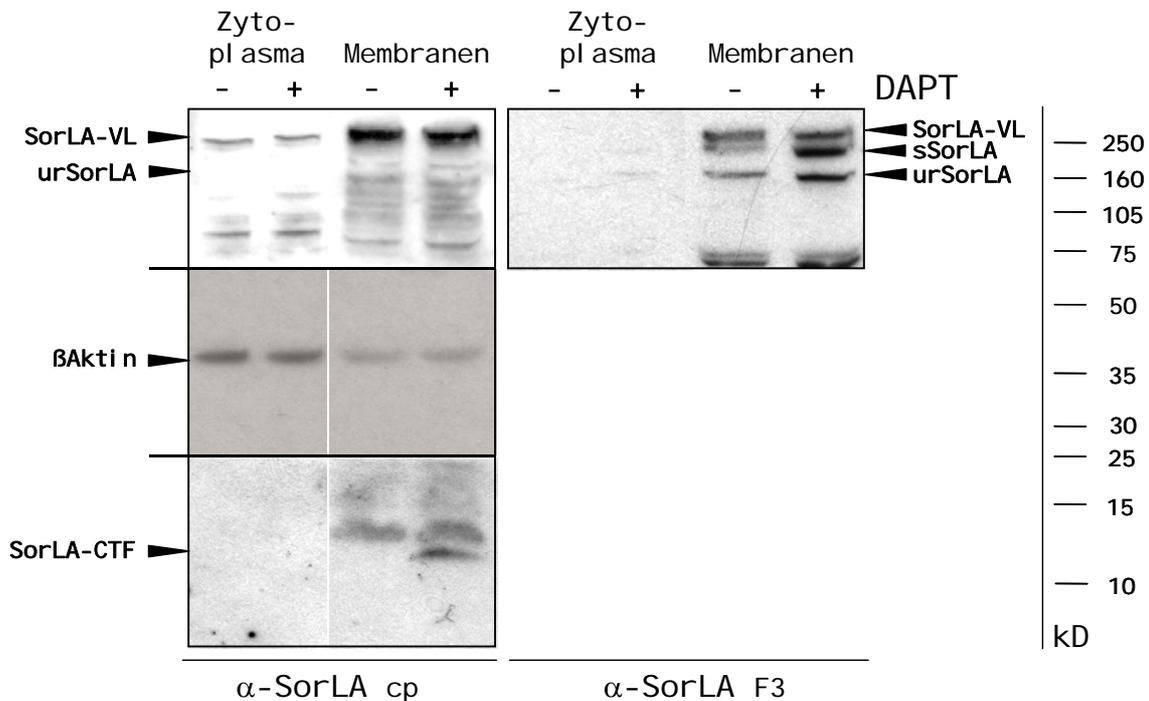


Abb. 3.9: Die Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT in endogen SorLA-exprimierenden Zellen

NT2-Zellen wurden 16 h mit 1 μ M DAPT in DMSO (+) oder mit DMSO allein (-) behandelt. Nach einer Membranpräparation wurden sowohl das Zytoplasma als auch die Membranproteine in 4-12%igen Gradientengelen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese bei ca. 75 und 25 kD zerteilt. Der Membranabschnitt mit den großen und der mit den kleinen Proteinen wurde mit α -SorLA cp, der mit den mittleren mit α - β Aktin untersucht. Der Membranteil mit großen Proteinen wurde anschließend von den Antikörpern befreit und mit α -SorLA F3 untersucht.

CTF = C-terminales Fragment; s = löslich (soluble); urSorLA = unreifes SorLA; VL = Volllänge

Da DAPT sowohl bei überexprimiertem als auch bei endogenem SorLA einen weiteren Abbau des CTFs verhindert, kann geschlossen werden, dass SorLA wirklich ein Substrat für die γ -Sekretase ist. Dies bestätigt frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Bohm et al., 2006).

3.3.1.2. *In vitro*-Generation von SorICD

Wie bereits erwähnt, werden die ICDs der Gamma-Sekretase-Substrate sehr schnell abgebaut und sind mittels immunologischen Proteinnachweisen nicht detektierbar. McLendon et al. (2000) und Sastre et al. (2001) haben eine *in vitro*-Methode zur Anreicherung der Intrazellulärdomäne von APP (AICD) entwickelt. Diese Methode wurde auch zur Anreicherung von SorICD aus SorLA-CTF*- bzw. SorLA-Volllänge-überexprimierenden HEK293-Zellen verwendet (2.8.1.4).

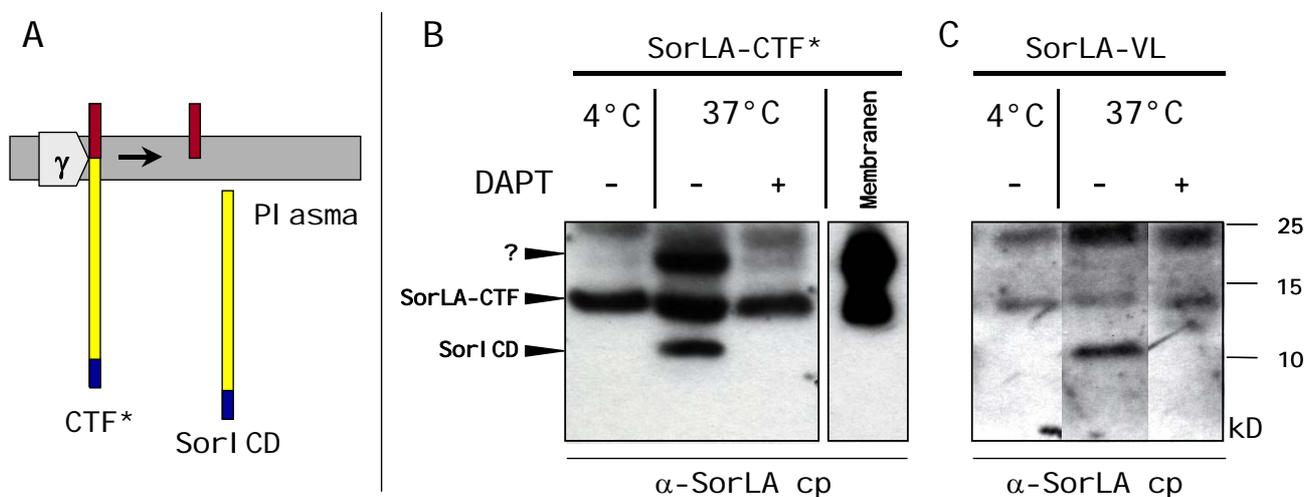


Abb. 3.10: *In vitro*-Generation von SorICD durch die Gamma-Sekretase

A) Schema des Versuchs mit SorLA-CTF*. SorLA-CTF* simuliert die durch die α -Sekretase prozessierte Form und beinhaltet die Schnittstelle für die γ -Sekretase. Durch Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT verbleibt das C-terminale Fragment (CTF*) in der Membran, bei aktiver γ -Sekretase wird die Intrazellulärdomäne (SorICD) ins Plasma freigesetzt. Der c-Myc-Anhang ist blau dargestellt. **B)** *In vitro*-Generation von SorICD aus SorLA-CTF*-überexprimierenden HEK293-Zellen. Membranen wurden bei den angegebenen Temperaturen mit und ohne 5 μ M DAPT inkubiert. Freigesetztes SorICD wurde per Ultrazentrifugation von den Membranen separiert. Dargestellt ist ein immunologischer Proteinnachweis mit α -SorLAcp nach Auftrennung des Überstandes in einem 4-12%igen Gradientengel. Ein kleiner Anteil des Sedimentes der Ultrazentrifugation wurde als Kontrolle mit aufgetrennt (Membranen). **C)** *In vitro*-Generation von SorICD aus Volllänge (VL)-überexprimierenden HEK293-Zellen. Zum Vorgehen siehe B).

Das verwendete SorLA-CTF*, das neben dem cytoplasmatischen Teil und der Transmembrandomäne nur noch die 30 C-terminalsten Aminosäurereste der luminalen Proteinsequenz enthält, sollte die für die Funktion der γ -Sekretase notwendige Prozessierung der Ektodomäne simulieren (Abb. 3.10 A). Dieses künstliche SorLA-Fragment trug am C-Terminus zusätzlich eine c-Myc-Markierung.

In Abbildung 3.10 B ist gezeigt, dass durch den *in vitro*-Generationsansatz SorICD aus SorLA-CTF* angehäuft und mittels immunologischem Proteinnachweis sichtbar gemacht werden kann. Als Negativ-Kontrollen dienten die Inhibierung der γ -Sekretase durch 5 μ M DAPT sowie die Inkubation der Proben bei 4°C. Nur in Proben, die ohne Inhibitor 2 h bei 37°C inkubiert wurden, kann eine SorICD-Bande beobachtet werden. Eine Inkubation mit dem DAPT-Lösungsmittel DMSO zeigte keine Inhibition der SorICD-Generation und spricht so für den spezifischen Effekt von DAPT (nicht gezeigt). Zusätzlich wurden Proteine aufgetragen, die nach der zweistündigen Inkubation in den Membranen verblieben waren (Membranen in Abb. 3.10). Darunter sind noch viele Moleküle des überexprimierten SorLA-CTF* zu finden. In hier nicht gezeigten Experimenten konnte das SorICD auch mit einem gegen den Myc-Anhang am C-Terminus des überexprimierten CTF*s gerichteten Antikörper spezifisch nachgewiesen werden. Die Bande oberhalb von SorLA-CTF* muss unspezifisch sein, da sie in dem Nachweis mit α -c-Myc nicht zu sehen ist (nicht gezeigt).

In Abbildung 3.10 C ist das Ergebnis eines Experimentes dargestellt, bei dem anstelle des SorLA-CTF*s das SorLA-Volllängeprotein in den verwendeten Zellen überexprimiert war. Da auch hier SorICD entsteht, hat in der zweistündigen Inkubationsphase bei 37°C genügend einleitende α -Sekretase-Prozessierung stattgefunden. Die verwendeten Zellen überexprimieren zusätzlich Volllänge-APP und auch AICD kann mit dieser Methode aus dem Volllängeprotein prozessiert werden (nicht gezeigt). Dies ist der erste Nachweis, dass auch aus der Volllänge von SorLA SorICD freigesetzt wird.

3.3.2 Translokation von SorICD in den Zellkern

Für die Intrazellulärdomäne (ICD) von Notch konnte wie bereits erwähnt eine Translokation in den Zellkern mit anschließender Aktivierung von Zielgenen beobachtet werden (Selkoe and Kopan, 2003). Da nun auch für SorLA eine Freisetzung der ICD ins Zytoplasma gezeigt wurde, sollte eine mögliche Kernlokalisierung des SorICDs überprüft werden. Mit Hilfe von Internet-Datenbanken (z.B. PSortII (Horton and Nakai, 1997) konnte ein potentiell Kernlokalisierungssignal (NLS) identifiziert werden (siehe auch SorLA-Sequenz im Anhang). Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen widmeten sich dem Nachweis von SorICD im Zellkern von kultivierten tierischen Zellen.

3.3.2.1 Subzelluläre Verteilung von endogenem oder überexprimiertem SorICD

Zunächst wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Antikörper gegen die Intrazellulärdomäne SorLAs in SorLA-überexprimierenden HEK293 oder endogen SorLA-enthaltenden NT2-Zellen durchgeführt (Abb. 3.11). Da der Antikörper gegen die Intrazellulärdomäne auch die Volllänge-Form von SorLA detektiert, wurde ein Vergleich mit α -SorLA F3-gefärbten Zellen angestellt. α -SorLA F3 erkennt sowohl die membrangebundene Volllänge, als auch die lösliche Form, jedoch nicht die freigesetzte SorICD. Der Vergleich zwischen α -SorLA cp- und α -SorLA F3-gefärbten Zellen sollte eine spezifische Fluoreszenz von SorICD zeigen (2.7.5). Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Kernregion gelegt, in der keine Signale nach der Färbung mit α -SorLA F3 erwartet wurden.

In SorLA überexprimierenden HEK293-Zellen war der Quotient der Fluoreszenzintensität im Zellkern durch die im Plasma für α -SorLA cp- ($0,45 \pm 0,14$) und α -SorLA F3-gefärbte Zellen ($0,32 \pm 0,1$) nicht signifikant unterschiedlich ($n=16$). Gleiches gilt für den Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten der Kernregionen ($25\ 803 \pm 36\%$ für cp und $26\ 332 \pm 34\%$ für F3). Diese Auswertung entsprach dem visuellen Eindruck, bei dem kaum Unterschiede zwischen den Präparaten zu erkennen waren. Auch in endogen SorLA-exprimierenden NT2-Zellen, ist das Verhältnis von Kern- zu Plasmafluoreszenzintensität bei Färbung mit α -SorLA cp ($0,49 \pm 0,33$ bei $n=21$)

ähnlich dem in den HEK293-Zellen. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten im Kern liegen bei NT2-Zellen bei $16\,657 \pm 48\%$. Andererseits zeigt ein Vergleich mit den SorLA-überexprimierenden Zellen für die NT2-Zellen eine homogenere Verteilung von SorLA, bei der auch die Kerne nicht so deutlich ausgespart sind. Es ist daher schwierig, mit diesem Versuchsansatz Aussagen über eine mögliche Kernlokalisierung von SorICD zu machen.

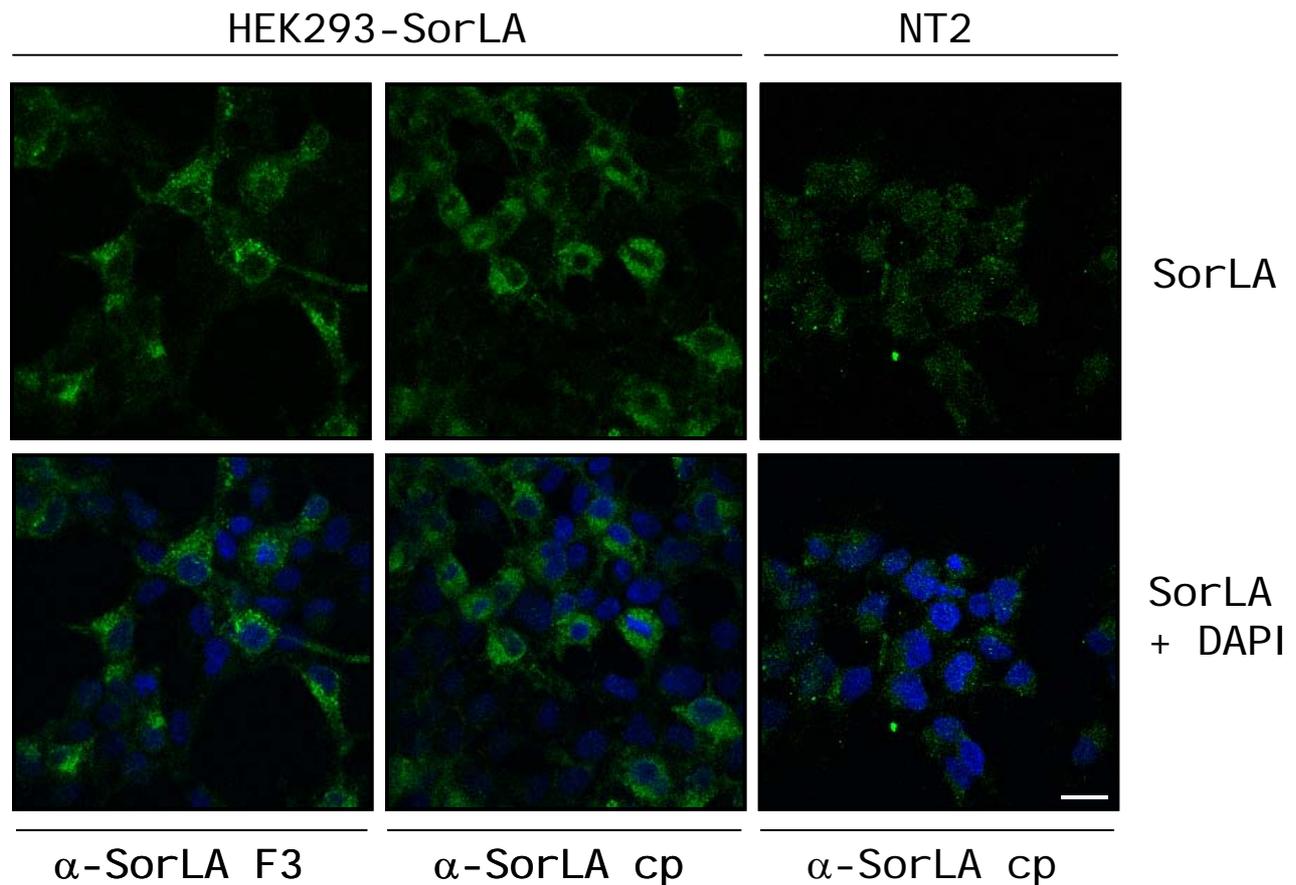


Abb. 3.11: Immunfluoreszenz von SorLA in überexprimierenden HEK293- und endogen-exprimierenden NT2-Zellen

SorLA-Volllänge-überexprimierende HEK293- (HEK293-SorLA) sowie NT2-Zellen wurden mit Antikörpern gegen SorLAs C-Terminus (α -SorLA cp) bzw. F3-Domäne (α -SorLA F3) und einem Alexa488-gekoppelten sekundären Antikörper markiert. Gleichzeitig erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI. Aus den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden die indirekten Fluoreszenzintensitäten von SorLA im Kern und im Zytoplasma ermittelt. Die Größenangabe entspricht 20 μ m.

Mutmaßlich wird nur ein kleiner Anteil aller SorLA-Proteine zu SorICD prozessiert und in den Kern gelangen können, und ein starkes Signal der Volllänge könnte die Detektion von schwachen Signalen im Kern erschweren. Die Stimulation der ein-

leitenden α -Sekretase-Prozessierung durch Phorbolester sowie die Verwendung von SorLA-CTF*-überexprimierenden Zellen führte zum gleichen Ergebnis (nicht gezeigt).

Dass in dieser Immunfluoreszenzfärbung keine SorICD-spezifische Kernfluoreszenz gefunden wurde, könnte am schnellen Abbau von SorICD liegen. Dies wäre in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den immunologischen Proteinnachweisen, in denen SorICD ebenfalls nicht nachzuweisen war (Abb. 3.8 und 3.9).

Weil das durch die γ -Sekretrase freigesetzte SorICD nicht direkt nachgewiesen werden konnte, sollte dieses überexprimiert werden. Die kodierende Region für die 56 Aminosäurereste der zytoplasmatischen Domäne SorLAs wurde mit einer Kozak-Sequenz (Kozak, 1995) und einem Start-Methionincodon, gefolgt von einem Valinocodon versehen und das Konstrukt (pMetSorICD) in BON-Zellen transfiziert. Nach der Transfektion waren in einer Immunfluoreszenzfärbung keine Zellen zu erkennen, die deutliche Mengen MetSorICD überexprimieren, wodurch auf einen schnellen Abbau des künstlichen SorICDs geschlossen wurde. Ein Ausbleiben oder Probleme bei der Translation des MetSorICDs konnten allerdings zunächst nicht ausgeschlossen werden. Eine Kotransfektion mit einem EGFP-Plasmid (Enhanced Green Fluorescent Protein) zeigte jedoch den Erfolg der Transfektion und diente der Identifizierung von transfizierten Zellen. Die konfokalen Aufnahmen nach Färbung mit α -SorLA cp sind in Abbildung 3.12 gezeigt.

Zunächst einmal ist in den untransfizierten BON-Zellen der Abbildung 3.12 analog zu den NT2-Zellen (Abb. 3.11) eine homogene, eher vesikuläre Verteilung von SorLA ohne Aussparung des Kerns zu erkennen. Daneben erkennt man EGFP-transfizierte Zellen, deren verstärktes SorLA-Signal vermuten lässt, dass die Zelle MetSorICD produziert (Pfeil). Die gekennzeichnete Zelle zeigt eine gleichmäßige Verteilung des SorLA-Signals zwischen Plasma und Kern, wohingegen EGFP leicht vermehrt im Kern zu finden ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass SorICD in den Zellkern gelangen kann. In Abbildung 3.12 sind weitere EGFP-transfizierte Zellen zu erkennen, die jedoch kein verstärktes SorICD-Signal zeigen. Insgesamt wurden überwiegend Zellen wie diese gefunden, was eine definitive Aussage über die Kernlokalisierung von SorICD

weiterhin erschwert. Es wurde daher eine weitere Methode angewandt, die im nächsten Kapitel beschrieben wird.

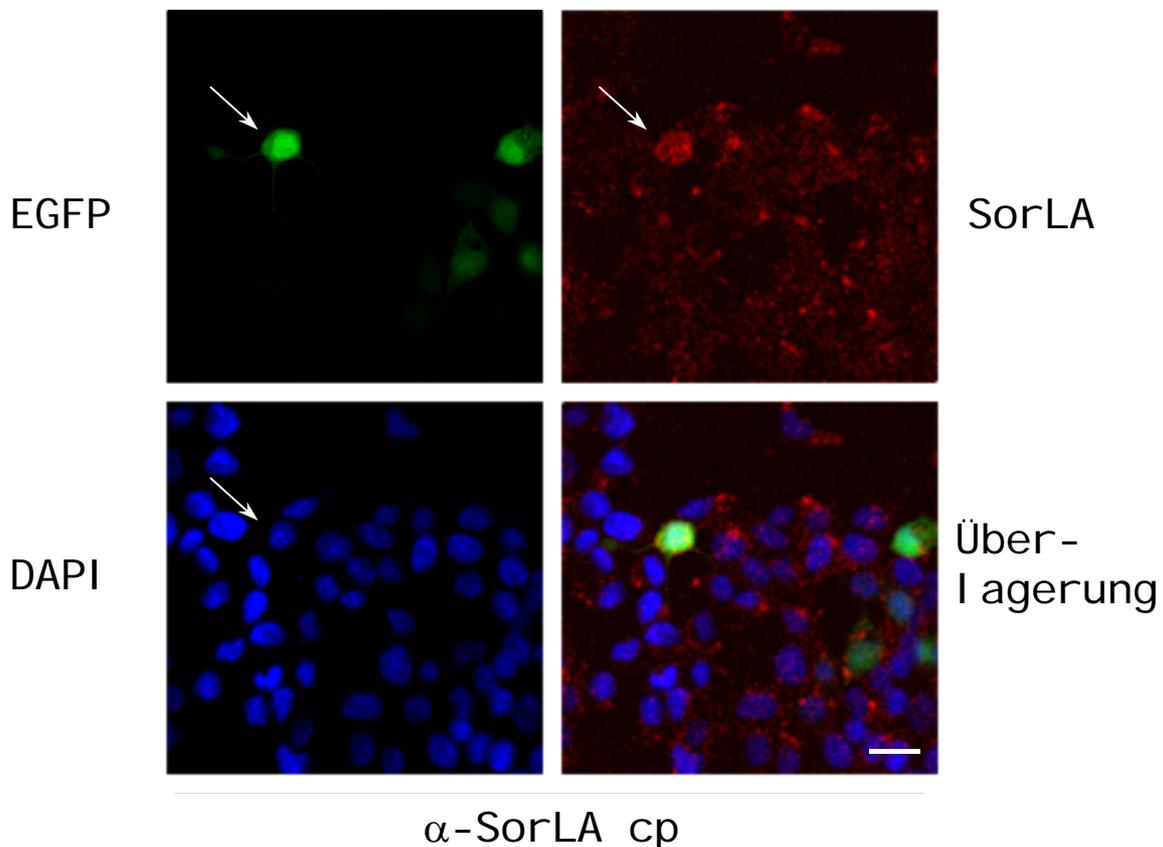


Abb. 3.12: Kotransfektion von MetSorICD mit EGFP in BON-Zellen

BON-Zellen wurden mit pMetSorICD und pEGFP-N1 im Verhältnis 4:1 transfiziert, nach 24 h fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit α -SorLA cp und einem Alexa546-gekoppelten sekundären Antikörper unterzogen. Gleichzeitig erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI. In konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden solche Zellen untersucht, die mit EGFP transfiziert waren. Die Pfeile zeigen eine EGFP-transfizierte Zelle mit stärkerer SorLA-Fluoreszenz. Die Größenangabe entspricht 20 μ m.

3.3.2.2 SorICD mit N-terminalem EGFP ist stabil und akkumuliert im Zellkern

In vielen Studien zur Klärung von subzellulären Lokalisationen werden EGFP-Fusionsproteine genutzt (z.B. Minopoli et al., 2001). Wie in Bohm et al. (2006) beschrieben, wurden Konstrukte kloniert, die für Fusionsproteine aus N-terminalem EGFP und der zytoplasmatischen Domäne von SorLA mit intaktem bzw. mutiertem potentiellern Kernlokalisierungssignal (KHRR bzw. KHAA) kodieren (EGFP-

(Mut)SorICD, Abb. 3.13 A). Das Limit für eine unspezifische Diffusion von Proteinen in den Kern liegt etwa um 50 kD (Macara, 2001). EGFP hat ein Molekulargewicht von 27 kD und die Fusionsproteine von ca. 35,2 kD. Die Molekulargewichte wurden durch Einfügen einer zweiten EGFP-Sequenz auf 54 bzw. 62 kD erhöht, um einen unspezifischen Transport der Proteine in den Zellkern zu unterbinden. Ein unbeabsichtigter Einbau von Kernlokalisierungssignalen in den Übergangsregionen wurde mit Sequenzanalysen (PSortII, <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) theoretisch ausgeschlossen.

Die Konstrukte wurden in Cos7-Zellen elektroporiert und die Integrität der Fusionsproteine sichergestellt (Abb. 3.13 B). Dazu wurde eigens eine Methode entwickelt, mit der die EGFP-Fusionsproteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgearbeitet und in Standard-SDS-Gelen aufgetrennt werden. Die Fusionsproteine behalten dabei ihre fluoreszierenden Eigenschaften und können anhand dieser detektiert werden (InGEL-Fluoreszenz, 2.8.3.1.2). Der Vorteil dieser Methode gegenüber denaturierenden Auftrennungsverfahren liegt darin, dass die Signale, die mit dieser Methode nachgewiesen werden, die gleichen sind, die auch in der Immunfluoreszenz detektiert werden.

Mit einem immunologischen Proteinnachweis nach reduzierender SDS-PAGE wurde die Integrität der Fusionsproteine bestätigt (nicht gezeigt). In konfokalen Aufnahmen (Abb. 3.13 C) wurden die Quotienten aus EGFP-Fluoreszenzintensität im Kern durch diese im Zytoplasma für EGFP und die EGFP-Fusionsproteine ermittelt (Abb. 3.13 D).

Nächste Seite:

Abb. 3.13: Lokalisationsstudie mit EGFP-gekoppelter SorICD

A) Übersicht über die Expressionsprodukte der verwendeten Konstrukte. Das potentielle Kernlokalisierungssignal (KHRR) wurde teilweise zu KHAA mutiert. **B)** InGEL-Fluoreszenz der Fusionsproteine. Transfizierte Cos7-Zellen wurden nach 24 h lysiert und die EGFP-Fluoreszenzen nach nicht-reduzierender SDS-PAGE im Thyphoon-Fluoreszenzleser visualisiert. **C)** Konfokale Aufnahmen exemplarischer Zellen. Die Größenangabe entspricht 20 μm . **D)** Auswertung der Intensitätsverhältnisse der EGFP-Fluoreszenzen im Kern zur denen im Plasma. Dargestellt sind die Quotienten einzelner Zellen, die grauen Balken stellen die Mittelwerte dar ($n = 13 - 24$). Die Statistik wurde mittels Students-t-Test erstellt.

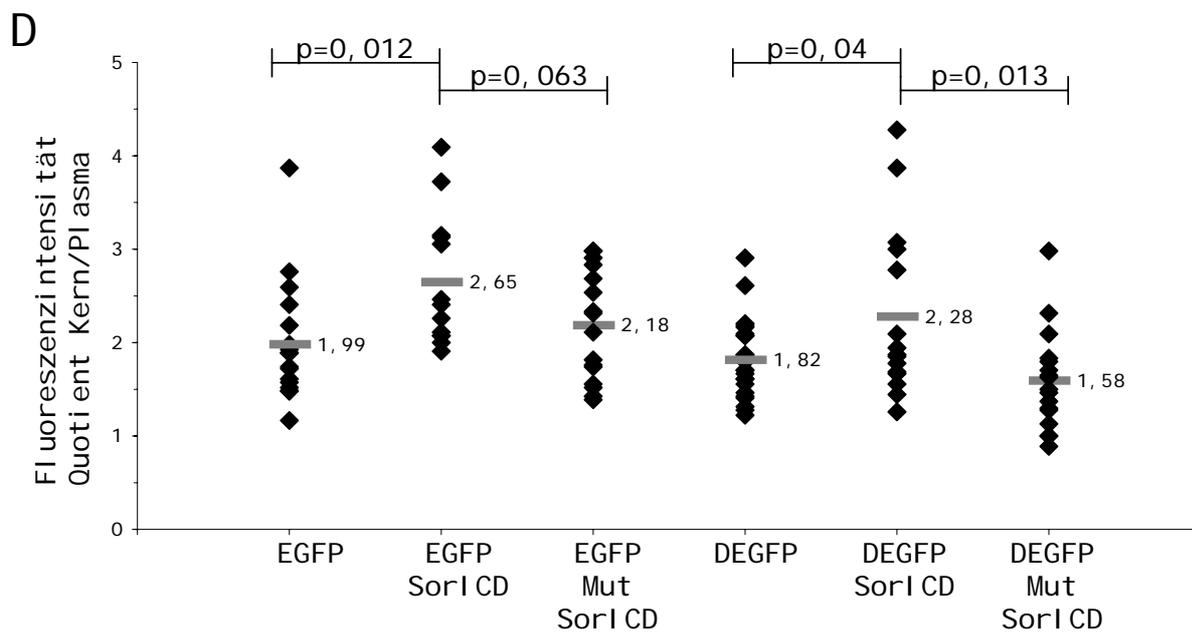
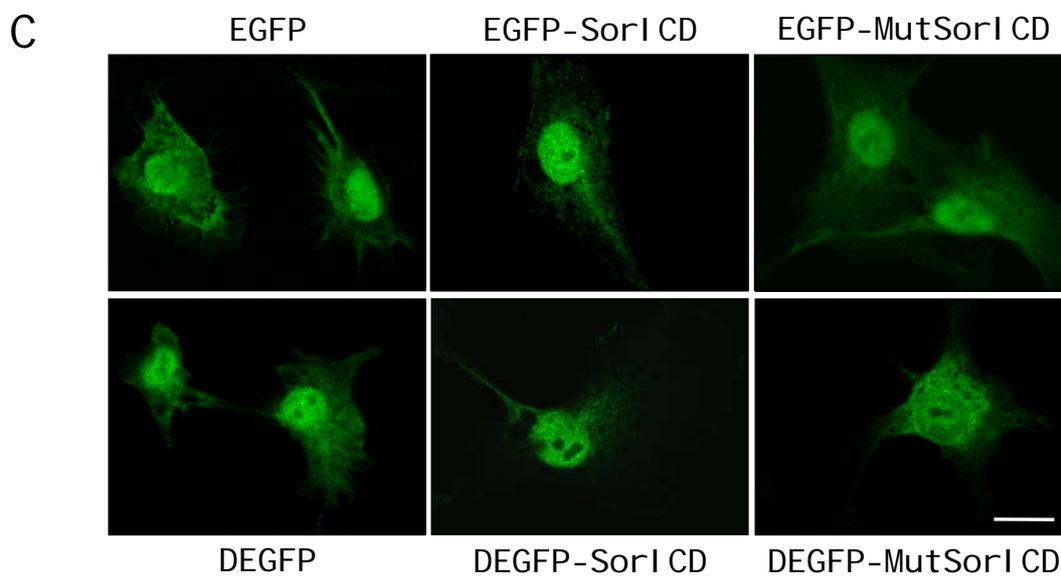
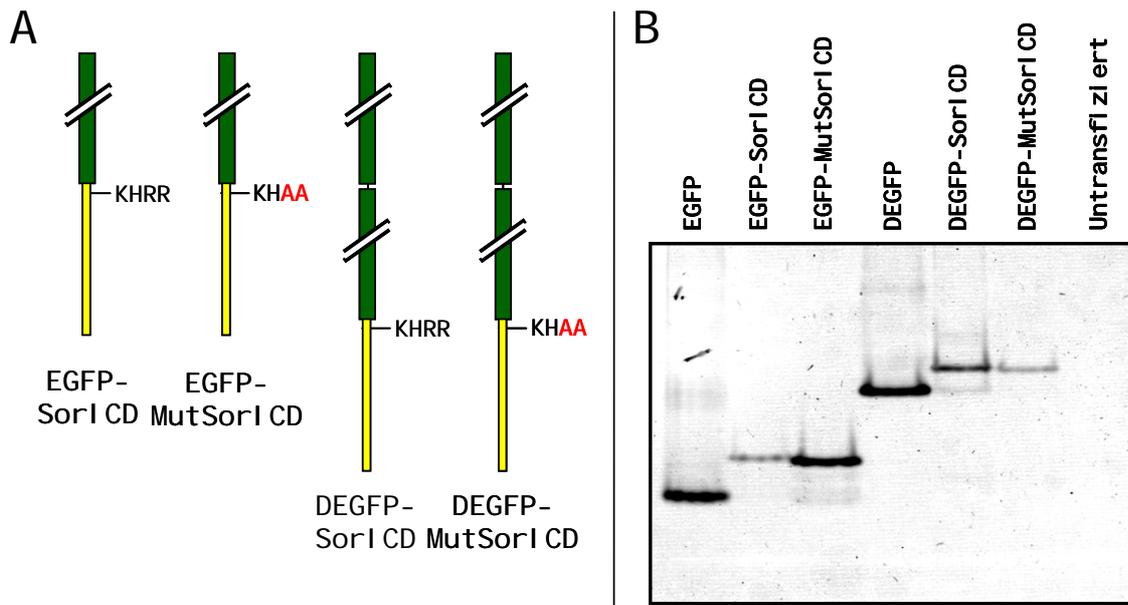


Abbildung 3.13 C zeigt, dass die Expression aller Konstrukte zu einer Akkumulation der Fluoreszenzintensität im Kern im Gegensatz zum Zytoplasma führt. Dies gilt auch für die Expression der dimeren EGFP-Fusionsproteine, die aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes theoretisch nicht passiv in den Kern diffundieren sollten.

Wie bereits schon der visuelle Eindruck zeigte, spiegeln auch die gemessenen Verhältnisse zwischen Kern- und Plasmafluoreszenzintensität eine signifikante Verstärkung der Kernlokalisierung von EGFP durch die C-terminale Addition der SorICD-Sequenz ohne mutiertes potentiell NLS wieder (Abb. 3.13 D). Dabei ist nicht entscheidend, ob SorICD an ein oder an zwei EGFP-Einheiten fusioniert ist. Daneben zeigen die Einzelwerte der (D)EGFP-SorICD-exprimierenden Zellen eine größere Streuung und mehr Zellen mit höheren Kern/Plasma-Verhältnissen. Vielleicht sind für die Translokation in den Nukleus weitere, z.B. Zellzyklus-Phasen-abhängige Faktoren notwendig, die nicht in allen transfizierten Zellen vorhanden sind. Durch die Mutation der potentiellen Kernlokalisationssequenz wird das Verhältnis von (D)EGFP ohne Anhang wieder hergestellt, was ein gutes Zeichen dafür ist, dass die Sequenz KHRR tatsächlich einen Einfluss auf die Lokalisation der SorICD im Kern hat (siehe auch Bohm et al., 2006).

3.3.2.3 Multimeres EGFP akkumuliert im Zellkern

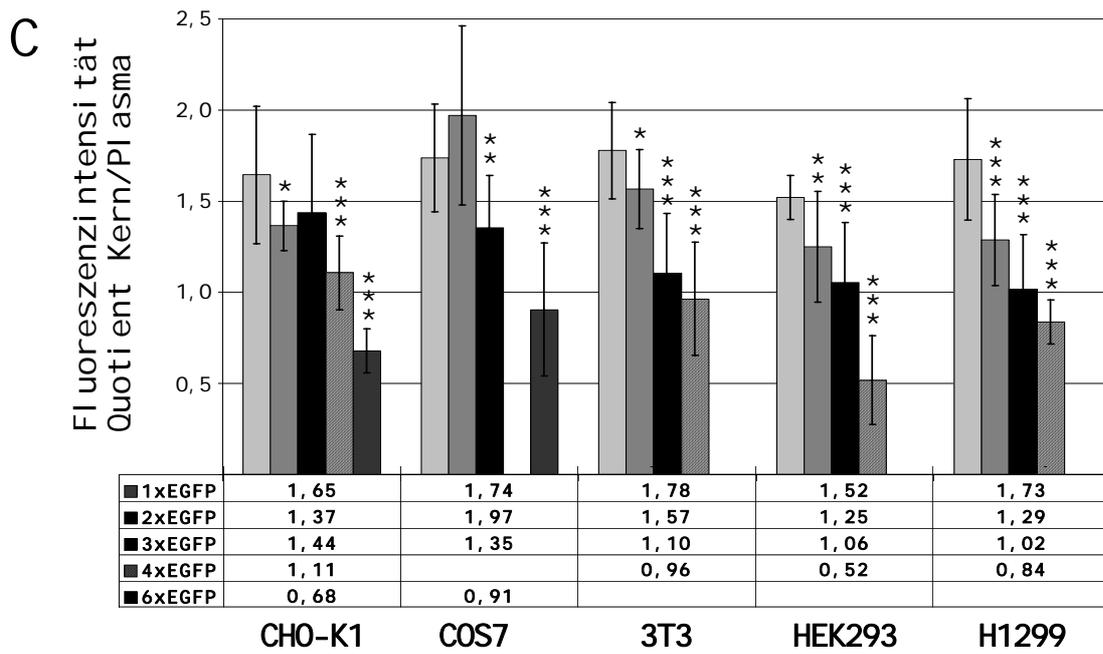
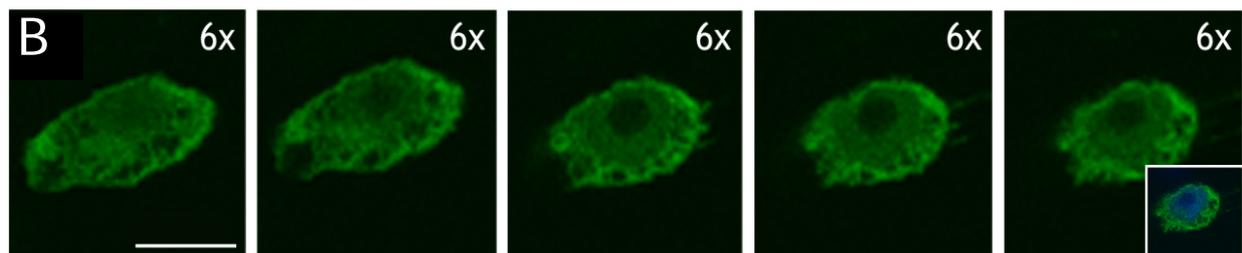
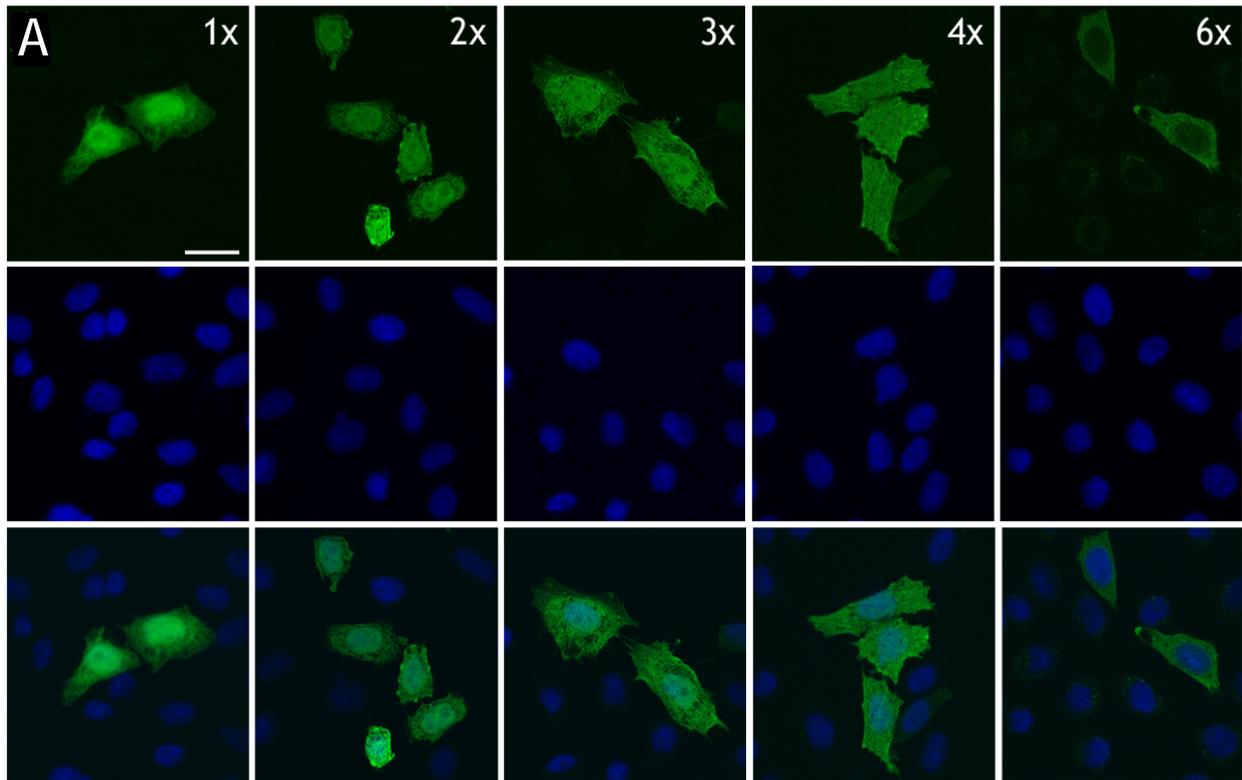
In oben genannten Versuchen war eine deutliche Kernlokalisierung des EGFP alleine und auch bei dem daraufhin klonierten EGFP-Dimer feststellbar. In Kooperation mit Dr. M. Nalaskowski wurden verschiedene Säuger-Zelllinien mit EGFP-Monomeren, -Dimeren, -Trimeren, -Tetrameren und -Hexameren transfiziert, um zu prüfen, ob die Kernlokalisierung vom Molekulargewicht der EGFP-Proteine abhängt. Die Integrität der Multimere wurde wiederum anhand von deren InGEL-Fluoreszenz bestätigt (nicht gezeigt). Die Abbildungen 3.14 A und B zeigen am Beispiel von CHO-K1-Zellen, dass auch größere EGFP-Multimere noch in den Zellkern gelangen können. Bei näherer Betrachtung konnte zudem in den meisten Zellen eine Aussparung des Nukleolus festgestellt werden (Abb. 3.14 B). Diese Daten konnten in allen verwendeten Zelllinien, namentlich Cos7-, 3T3-, HEK293- und H1299-Zellen, bestätigt werden (Abb. 3.14 C). Erst tetrameres EGFP zeigt weniger Fluoreszenz im Kern denn

im Plasma (0,52 für CHO-K1- bis 1,11 für HEK293-Zellen) und eignet sich daher besser als mono- oder dimeres EGFP als Fusionspartner für Proteine in Untersuchungen von Kernlokalisationen. Für das Hexamer wird der Quotient aus Kern- zu Plasmafluoreszenzintensität noch kleiner, es eignet sich aber dennoch nicht für solche Studien, da es nur sehr schwach exprimiert wird und eine schwache Fluoreszenz zeigt.

Nächste Seite:

Abb. 3.14: GFP-Multimere diffundieren in den Zellkern

Die angegebenen Zelllinien wurden mit p2xEGFP, p3xEGFP, p4xEGFP bzw. p6xEGFP transfiziert, 24 h später fixiert, die Kerne mit DAPI gefärbt und die EGFP-Fluoreszenzintensitäten in Kern und Zytoplasma am konfokalen Aufnahmen quantifiziert. Die Größenangaben entsprechen 20 μm . **A)** 1x – 6xEGFP in CHO-K1-Zellen. Die obere Reihe zeigt die EGFP-Fluoreszenz, die mittlere die Kernfärbung der Zellen mit DAPI und die untere die Überlagerung der Bilder. **B)** Z-Stapel einer 6xEGFP-exprimierenden CHO-K1-Zelle. Mehrere Schnitte mit 1 μm Schichtdicke im Abstand von 0,5 μm zeigen die homogene Verteilung des EGFP-Hexamers im Kern. Das eingeschobene Bild zeigt exemplarisch durch das zusätzliche DAPI-Signal die Lage des Kerns. **C)** Statistische Auswertung der EGFP-Verteilung. Für die 5 Zelllinien wurden für alle angegebenen Multimere die Fluoreszenzintensitätssignale mit der Software ImageJ bestimmt und diese des Kerns durch die des Plasmas geteilt ($n = 7 - 19$). Die fehlenden Werte für 6xEGFP konnten aufgrund seiner schlechten Expression nicht ermittelt werden. Statistik im Vergleich zu 1xEGFP: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ermittelt im Students-t-Test.



3.3.2.4 Subzelluläre Verteilung von SorICD mit C-terminalem EGFP

Wie in Abbildung 3.13 gezeigt, wird SorICD mit EGFP-geschütztem N-Terminus weniger schnell abgebaut als freies SorICD und kann in nicht-reduzierender Gelelektrophorese und in fixierten Zellen aufgrund der Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, ob SorICD mit freiem N- aber EGFP-geschütztem C-Terminus ebenfalls langsamer degradiert wird, wurde ein für solch ein Fusionsprotein (SorICD-EGFP) kodierendes Plasmid konstruiert. Da die genaue Schnittstelle der γ -Sekretase für SorLA nicht bekannt war, wurde ein Konstrukt kloniert, das für ein Fusionsprotein aus dem bestätigten γ -Sekretase-Substrat CTF* mit C-terminalem EGFP kodiert (pCTF*-EGFP). Erst durch die γ -Sekretase-Prozessierung des CTF*-EGFP kann die EGFP-markierte Intrazellulärdomäne ins Zytoplasma entlassen werden, wobei diese Freisetzung durch Inhibition mit DAPT unterbunden werden kann (Abb. 3.15 A). Durch die Detektion des SorICD-EGFP im immunologischen Proteinnachweis und durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in DAPT-behandelten und –unbehandelten Zellen sollten Rückschlüsse auf den Abbau der SorICD sowie bei vermindertem Abbau auf dessen subzelluläre Lokalisation gezogen werden.

Zunächst wurden BON- und CHO-K1-Zellen stabil mit pCTF*-EGFP transfiziert. Anhand der grünen Fluoreszenz im Mikroskop und mittels immunologischem Proteinnachweises wurde eine, wenn auch schwache, Expression des CTF*-EGFPs festgestellt. Fraglich blieb dessen Eignung als γ -Sekretase-Substrat, da weder in Gesamtzellysaten, noch nach *in vitro*-Generation freigesetztes SorICD-EGFP nachgewiesen werden konnte. Auch konnte kein SorICD-freies EGFP in diesen Immunologischen Proteinnachweisen gefunden werden (nicht gezeigt), was gegen einen partiellen Abbau des SorICDs bis hin zur EGFP-Sequenz spricht.

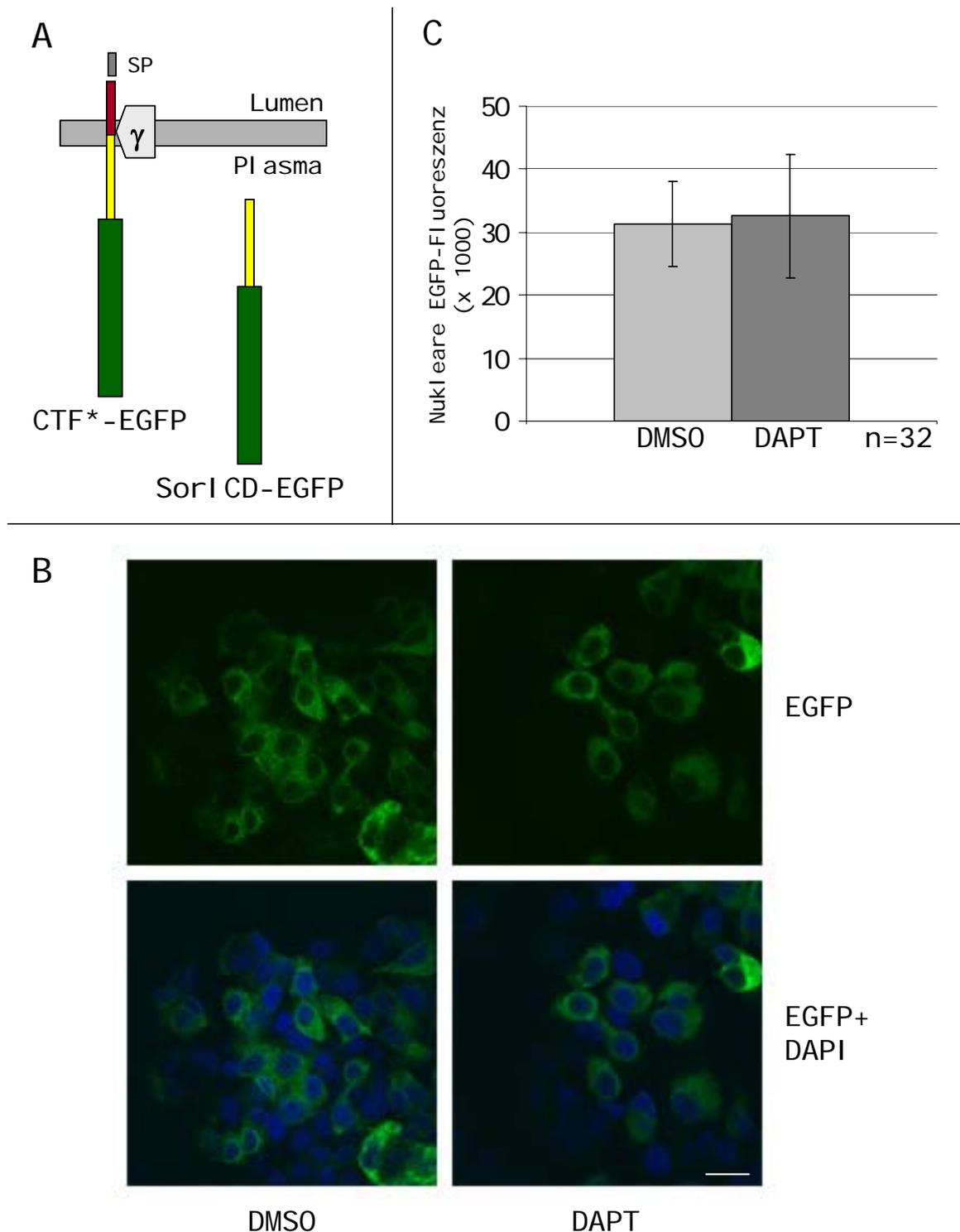


Abb. 3.15: SorICD mit C-terminalem EGFP

Um einen natürlichen N-Terminus des freigesetzten SorICD-EGFPs zu erhalten, wurde zunächst ein Fusionsprotein aus membranständigem CTF mit Signalpeptid (SP) und C-terminalem EGFP (CTF*-EGFP) überexprimiert, aus dem durch die γ -Sekretase das SorICD-EGFP freigesetzt werden soll. BON-Zellen wurden stabil mit pCTF*-EGFP transfiziert und durch eine 16-stündige Behandlung mit 1 μ M DAPT in DMSO eine Freisetzung des SorICD-EGFPs ins Plasma unterbunden. Als Kontrolle erfolgte eine DMSO-Behandlung über den gleichen Zeitraum. **A)** Schema des Versuchs. **B)** Konfokale Aufnahmen der DMSO-/DAPT-behandelten Zellen. Nach Kernfärbung mit DAPI wurde die EGFP-Fluoreszenzintensität in Bildern mit 1 μ m Schichtdicke gemessen. Die Größenangabe entspricht 20 μ m. **C)** Auswertung der in B) gemachten Aufnahmen anhand der nukleären EGFP-Fluoreszenzintensität (n= 32).

Obwohl in den Kernen von unbehandelten, stabil mit pCTF*-EGFP transfizierten BON-Zellen eine Fluoreszenz festgestellt werden kann ($31\,259 \pm 21,72\%$), zeigt der Vergleich mit DAPT-behandelten Kontrollzellen ($32\,629 \pm 30,02\%$), dass diese vermutlich nicht durch die Freisetzung und Translokation von SorICD-EGFP in den Kern zustande kommt (Abb. 3.15).

Entweder wird das SorICD-EGFP nicht durch die γ -Sekretase freigesetzt, oder es wird – begünstigt durch den nach dem Schnitt freigesetzten N-Terminus – im Zytoplasma rasch abgebaut. Das Ausgangsfragment für die Klonierung, SorLA-CTF* war als γ -Sekretase-Substrat geeignet, was gegen ein Ausbleiben der Prozessierung sprach. Die geringe Expression des CTF*-EGFP und eine mutmaßliche Prozessierung nur eines Anteils dieser Fusionsproteine durch die γ -Sekretase und die rasche Degradation der Fragmente erschwerten vermutlich eher den Nachweis von SorICD-EGFP. Aufgrund der relativ geringen Expression ist es auch in endogen SorLA-exprimierenden Zellenlinien wie NT2 bisher nicht gelungen, die endogene, proteolytisch freigesetzte intrazelluläre Domäne nachzuweisen.

3.3.3 Rasche Degradation des SorICD durch Proteasen

Der rasche Abbau des SorICDs in der Zelle macht es, wie in den vorangegangenen Kapiteln gesehen, schwierig, dieses *in vitro* nachzuweisen. Physiologisch hat er jedoch den Vorteil, dass eine mögliche Signalkaskade schnell wieder abgeschaltet werden kann. Daher beschäftigt sich dieser Abschnitt der Arbeit mit der Identifizierung der abbauenden Aktivität.

3.3.3.1 Degradierende Aktivität in endogen SorLA-exprimierenden Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob das Zytoplasma von endogen SorLA-exprimierenden Zellen eine Protease enthält, die SorICD als Substrat erkennt. Dazu wurde SorICD *in vitro* aus SorLA-CTF*-überexprimierenden Zellen generiert (siehe auch Abb. 3.10) und aliquotiert. Nach zweistündiger Inkubation mit frisch isoliertem Zytoplasma aus BON- bzw. NT2-Zellen (2.8.1.5) wurde in einem immunologischen Proteinnachweis der Verbleib des SorICDs analysiert (Abb. 3.16).

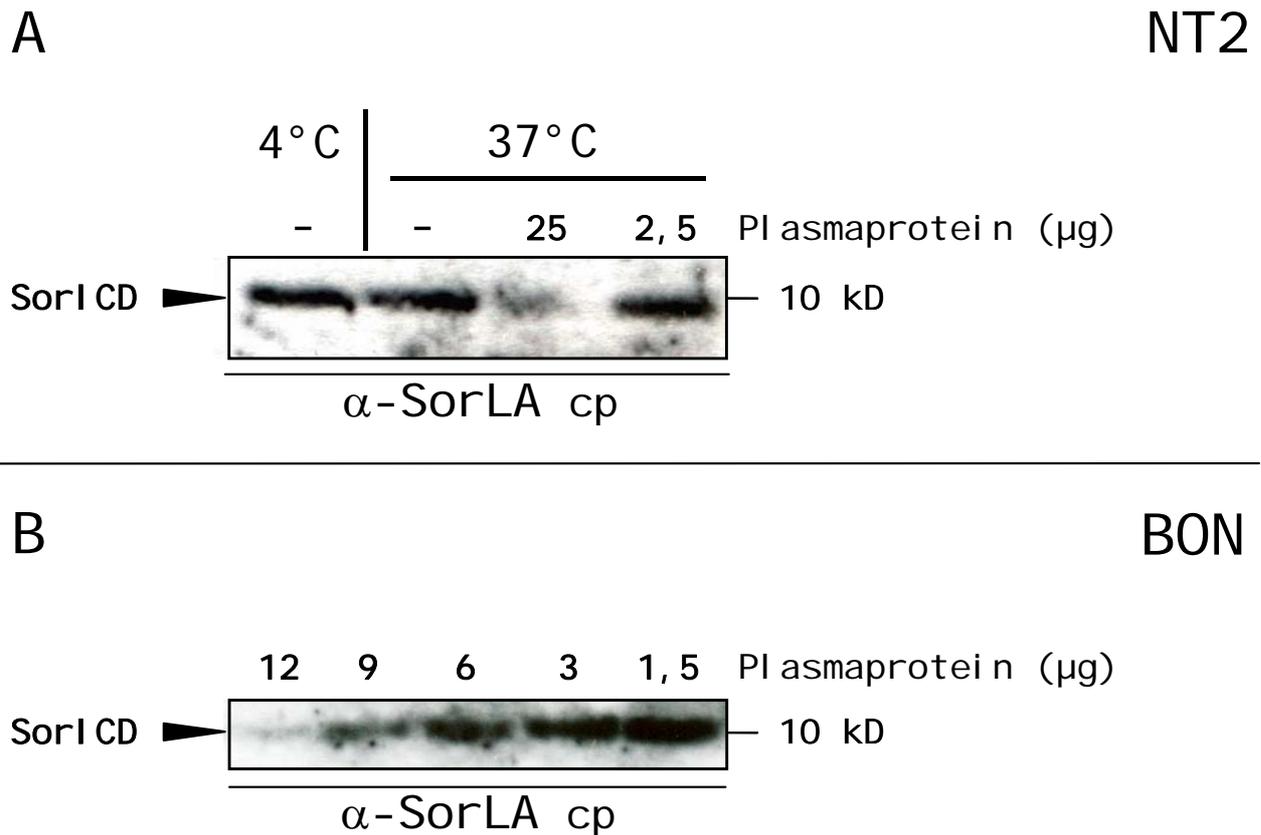


Abb. 3.16: Abbau der SorICD durch NT2- und BON-Zytoplasmaproteine

Aus SorLA-CTF*-überexprimierenden HEK293-Zellen wurden größere Mengen SorICD *in vitro* hergestellt. Gleiche Mengen SorICD wurden 2 h bei 37°C mit frisch hergestelltem Zytoplasma aus NT2- bzw. BON-Zellen inkubiert. Nach der Auftrennung in einem 4-12%igen Gradientengel erfolgte der Nachweis von SorICD mit α-SorLA cp. **A)** NT2-Zytoplasma. Gleiche Mengen SorICD wurden mit den angegebenen Mengen Zytoplasmaprotein inkubiert. Als Kontrollen dienten ein Aliquot SorICD, das ohne Plasma und eines, das bei 4°C inkubiert wurde. **C)** BON-Zytoplasma. Entsprechend B wurden die angegebenen Mengen BON-Zytoplasmaprotein eingesetzt.

Aus Abbildung 3.16 A wird zunächst deutlich, dass ohne Zugabe von Zytoplasma nur sehr wenig Abbau stattfindet, wie der Vergleich der SorICDs nach Inkubation bei 4° und 37°C zeigt. Erst durch die Zugabe größerer Mengen NT2-Plasmas findet ein Abbau der Intrazellulärdomäne statt, der konzentrationsabhängig ist. Diese Aussage wird durch die in Abbildung 3.16 B gezeigte Inkubation von SorICD mit BON-Plasma in verschiedenen Konzentrationen unterstützt. Auch hier kann eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des Abbaus beobachtet werden.

3.3.3.2 SorICD wird durch das Insulin-degradierende Enzym abgebaut

Im Gegensatz zur Notch-ICD (Oberg et al., 2001) werden die Intrazellulärdomäne von APP (AICD, Edbauer et al., 2002) und SorICD (Bohm et al., 2006) nicht im Proteasom degradiert. Im Fall von AICD ist als abbauende Aktivität das Insulin-degradierende Enzym (IDE) identifiziert worden. Einen Einfluss des IDEs auf den Abbau von SorICD wurde mit Plasma aus IDE-überexprimierenden HEK293-Zellen überprüft. Diese Zellen exprimierten entweder die Wildtyp-IDE oder eine dominant negative Mutante, in der das katalytisch aktive Glutamat 111 gegen einen Glutaminrest ausgetauscht wurde (Edbauer et al., 2002).

Wie im vorangegangenen Abschnitt wurde SorICD generiert und mit definierten Mengen Plasmaprotein aus Wildtyp- bzw. dominant-negativem IDE-überexprimierenden Zellen sowie zum Vergleich mit Plasmaprotein aus untransfizierten HEK293-Zellen versetzt. Zur Überprüfung der Spezifität diente die kompetitive Hemmung des IDEs durch dessen Substrat Insulin. Da die zur Generation von SorICD verwendeten Zellen gleichzeitig APP exprimieren, konnte der Abbau von AICD als interne Kontrolle untersucht werden (Abb. 3.17).

Im indirekten Vergleich von SorICD nach Inkubation mit Zytoplasma aus Wildtyp- bzw. dominant-negativem IDE-überexprimierenden Zellen wird deutlich, dass bei gleichen Plasmaproteinkonzentrationen nur durch Wildtyp-IDE ein Abbau von SorICD stattfindet (Abb. 3.17 links). Auch für AICD gilt, in Analogie zur Literatur, dass diese stark durch die Wildtyp-IDE und nur schlecht durch die Mutante abgebaut wird. Hier kann auch die hemmende Wirkung von Insulin auf die Proteolyseaktivität erkannt werden. Im Vergleich mit der AICD könnte der Eindruck entstehen, dass SorICD schlechter durch IDE abgebaut wird. Da aber nicht bestimmt werden konnte, wie viel SorICD bzw. AICD eingesetzt wurde, und da wegen der unterschiedlichen Antikörper auch anhand der Bandenstärken keine Rückschlüsse auf die Mengen von SorICD im Vergleich zu AICD gezogen werden können, kann keine Aussage zur Affinität vom IDE aufgestellt werden.

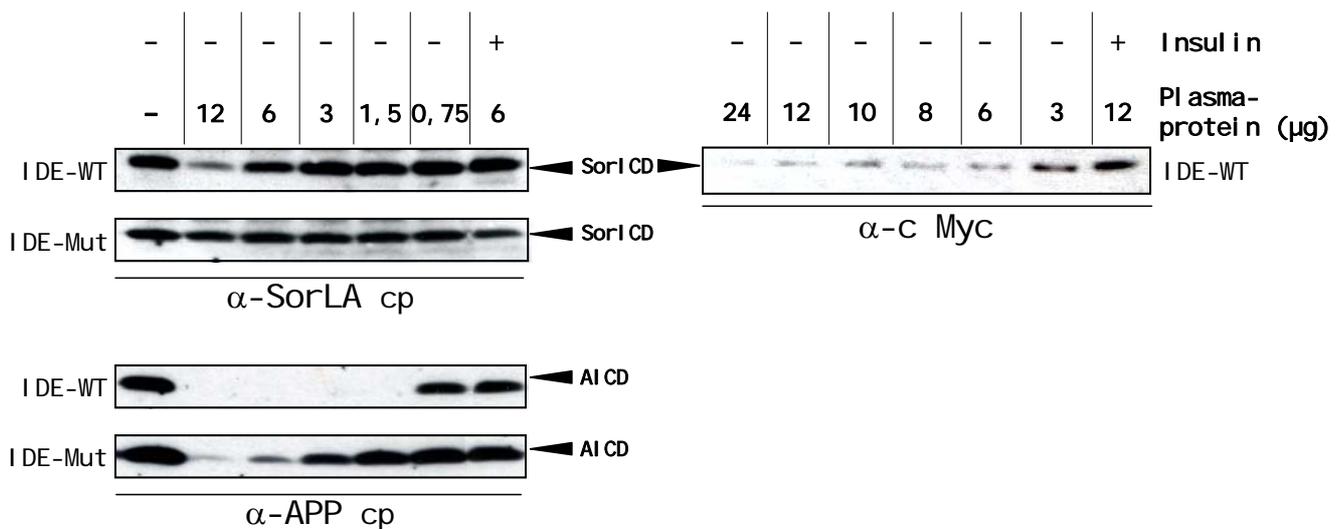


Abb. 3.17: SorICD-Abbau durch das Insulin-degradierende Enzym (IDE)

Aus SorLA-CTF* überexprimierenden HEK293-Zellen wurden größere Mengen SorICD mit Myc-Anhang *in vitro* generiert. Gleiche Mengen SorICD wurden mit den angegebenen Mengen Plasmaprotein aus stabil mit Wildtyp-IDE (IDE-WT) bzw. mit der dominant-negativen IDE-Mutante (IDE-Mut) transfizierten HEK293-Zellen versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Aliquot, welches mit Plasmaproteinen und 200 µg/ml des IDE-Inhibitors Insulin inkubiert wurde. Nach der Auftrennung in einem 4-12%igen Gradientengel erfolgte der Nachweis von SorICD mit α -SorLA cp bzw. α -c-Myc. AICD wurde nach Entfernung der SorLA-Antikörper von der Membran mit α -APP cp nachgewiesen. Der rechts dargestellte Versuch resultierte aus einer unabhängigen Präparation.

Im gleichen Experimentalansatz mit engeren Abstufungen der eingesetzten Wildtyp-IDE-Konzentrationen konnte ein konzentrationsabhängiger Abbau von SorICD durch IDE sowie die hemmende Wirkung von Insulin auf diesen Abbau erkannt werden. Im Vergleich der mit 12, 6 und 3 µg Plasmaprotein inkubierten Proben im linken und rechten Teil der Abbildung 3.17 fällt auf, dass die Banden, die in den einzelnen immunologischen Proteinnachweisen detektierbar sind, zwar nicht direkt vergleichbar sind, aber dennoch die gleiche Tendenz zeigen.

Um zu zeigen, dass die abbauende Aktivität durch das IDE-Wildtyp-Protein und nicht durch Faktoren, die aus der Überexpression vom Wildtyp oder der dominant-negativen IDE resultierten, vermittelt wird, diente ein direkter Vergleich mit Plasma aus untransfizierten HEK293-Zellen. Um eine zuverlässige Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden alle Proben in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit α -SorLA cp analysiert (Abb. 3.18).

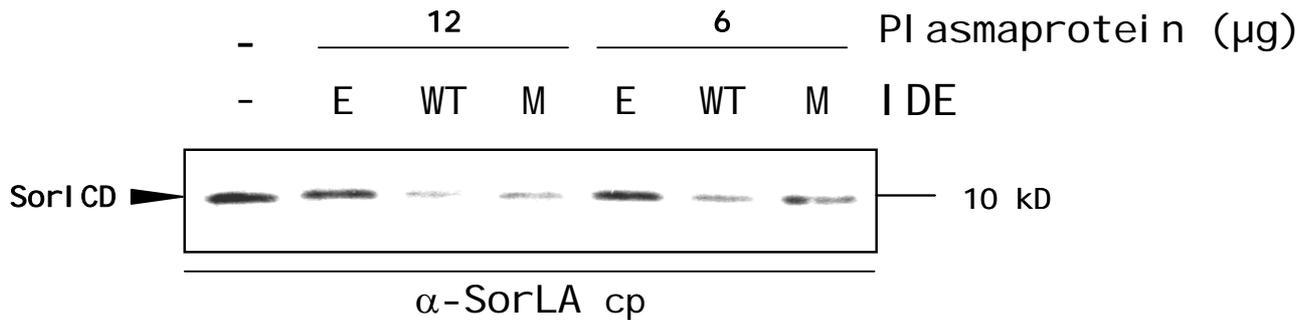


Abb. 3.18: Vergleich der degradierenden Aktivitäten in Plasma aus HEK293-, IDE-WT- und IDE-Mut-Zellen

Zum Vorgehen siehe Abb. 3.17. Gleiche Mengen SorICD wurden mit 12 bzw. 6 µg Plasma aus untransfizierten (E = endogen), Wildtyp-IDE- (WT) bzw. dominant-negativem IDE-(M) überexprimierenden HEK293-Zellen versetzt.

Anhand von Abbildung 3.18 erkennt man, dass im Plasma aus Wildtyp-IDE-überexprimierenden Zellen eine proteolytische Aktivität vorhanden ist, die einen konzentrationsabhängigen Abbau vermittelt (vergleiche Spuren mit 12 und 6 µg). In den Proben, die mit Plasma aus dominant-negativem IDE-überexprimierenden Zellen inkubiert wurden, findet ein geringerer, aber erkennbarer Abbau der SorICD statt. Wie schon in der Abbildung 3.18 an AICD gesehen, scheinen die Zellen, die das dominant-negative IDE überexprimieren, in ihrem Plasma dennoch eine IDE-Restaktivität zu besitzen. SorICD, die mit Plasma aus untransfizierten HEK293 in Kontakt war, wird im Vergleich zur Kontrolle ohne Plasma fast gar nicht abgebaut, wobei auch die eingesetzte Plasmamenge keine Rolle spielt. Allerdings haben auch die HEK293-Zellen eine endogene SorICD-abbauende Aktivität, die in höheren Konzentrationen messbar ist (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Bestätigung des IDEs als SorICD-abbauendes Enzym wurden verschiedene Inhibitoren zu Ansätzen aus SorICD mit 24 µg Plasmaproteinen aus IDE-Wildtyp-überexprimierenden Zellen gegeben (Abb. 3.19). EGTA hemmt Proteasen, die zweiwertige Ionen als Ko-Faktoren benötigen, zu denen auch die Zink-Metalloprotease IDE gehört (Edbauer et al., 2002; Shen et al., 2006). Lactacystin hemmt spezifisch den Abbau durch das Proteasom (Fenteany and Schreiber, 1998) und Insulin wurde als spezifischer Inhibitor für das IDE bereits erwähnt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Insulin noch auf weitere Enzyme inhibitorisch wirkt.

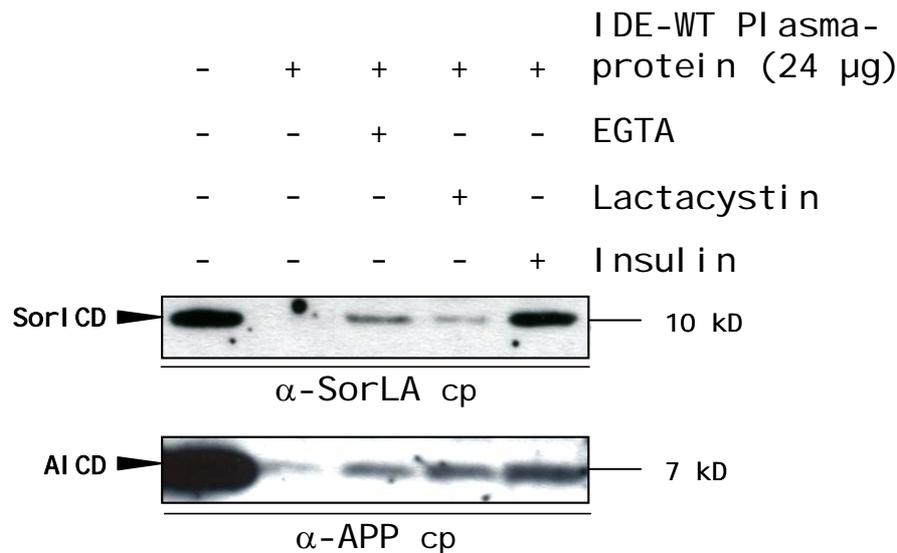


Abb. 3.19: Inhibition der SorICD-abbauenden Aktivität

Aus SorLA-CTF*-überexprimierenden HEK293-Zellen wurde SorICD *in vitro* generiert. Gleiche Mengen SorICD wurden mit 24 µg frisch hergestelltem Zytoplasma aus IDE-WT-überexprimierenden Zellen und den folgenden Inhibitoren versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert: 10 mM EGTA, 10 µM Lactacystin und 200 µg/ml Insulin. Als Positivkontrolle wurde ein Aliquot SorICD ohne Plasma für 2 h inkubiert. Nach der Auftrennung in einem 4-12%igen Gradientengel erfolgte der Nachweis von SorICD mit α -SorLA cp und anschließend von AICD mit α -APP cp.

Es zeigen sich ähnliche Bilder für SorICD und AICD: ohne Plasma werden die ICDs nicht und mit größeren Mengen Plasmaprotein (24 µg) aus IDE-Wildtyp-Zellen gut abgebaut. Eine leichte Stabilisierung der ICDs durch EGTA (und EDTA, nicht gezeigt) kann wie erwartet beobachtet werden, ebenso eine stärkere Stabilisierung durch Insulin. Überraschenderweise kommt es auch nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors Lactacystin zu einer, wenn auch leichten, Stabilisierung von SorICD und AICD. Im Falle von AICD zeigen alle eingesetzten Inhibitoren allerdings eine schwache Wirkung, wenn man die resultierenden Banden mit der Kontrolle ohne Plasma vergleicht. Selbst die eingesetzte Menge Insulin scheint nicht ausreichend zu sein, um den Abbau von AICD vollständig zu kompetitieren.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass SorICD durch das Insulin-degradierende Enzym *in vitro* abgebaut werden kann. Überexprimiertes Wildtyp-IDE beschleunigt den Abbau von SorICD im Vergleich zu dominant-negativem und endogenem IDE.

3.3.3.3 Überexpression von SorLA in Zellen mit dominant-negativem Insulin-degradierendem Enzym

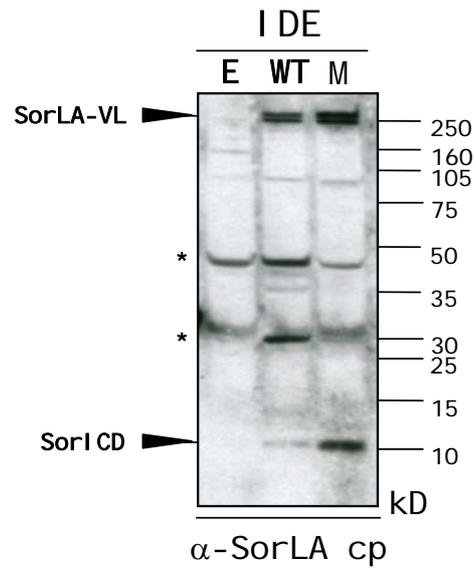
Nach der Identifizierung der abbauenden Enzymaktivität der SorICD wurde nun versucht, SorICD in Zellen mit dominant-negativem IDE nachzuweisen und ggf. dessen Lokalisation in der Zelle zu bestimmen.

HEK293- sowie IDE-WT- und IDE-Mut-überexprimierende Zellen wurden mit pcDNA3.1/Hygro-SorLA stabil transfiziert und daraus sowohl Gesamtzelllysate als auch *in vitro*-generierte SorICD präpariert (2.8.1.1 und 2.8.1.4). Immunologische Proteinnachweise mit α -SorLA cp zeigten auch bei hoher Beladung der Gele und langer Expositionszeit in keiner Probe SorICD im Gesamtzelllysate, auch wenn große Mengen SorLA-Volllänge zu finden waren (nicht gezeigt). Die nur mit SorLA transfizierten HEK293-Zellen zeigten zwar SorLA-spezifische Fluoreszenz, durch immunologische Proteinnachweise waren aber nur sehr geringe Mengen Volllänge detektierbar. Nach einer *in vitro*-Generation kann in Zellen mit dominant-negativem IDE mehr SorICD gefunden werden als in denen mit überexprimierter Wildtyp-IDE, allerdings waren auch größere Mengen Volllänge vorhanden (Abb. 3.20 A). Vergleiche zwischen überexprimierenden Zelllinien sind mit größter Vorsicht zu bewerten, da die Expressionsstärke unterschiedlich sein kann. Interne Kontrollen oder eine Normierung auf das überexprimierte Protein sind daher notwendig. Solche Normierungen waren für SorLA nicht möglich, daher wurde als interne Kontrolle das Verhältnis aus Volllänge und SorICD in einer Gelspur gebildet. Dieses Verhältnis war in den Proben aus Zellen mit dominant-negativem IDE dreimal größer als in denen mit Wildtyp IDE. Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Versuchen reproduziert.

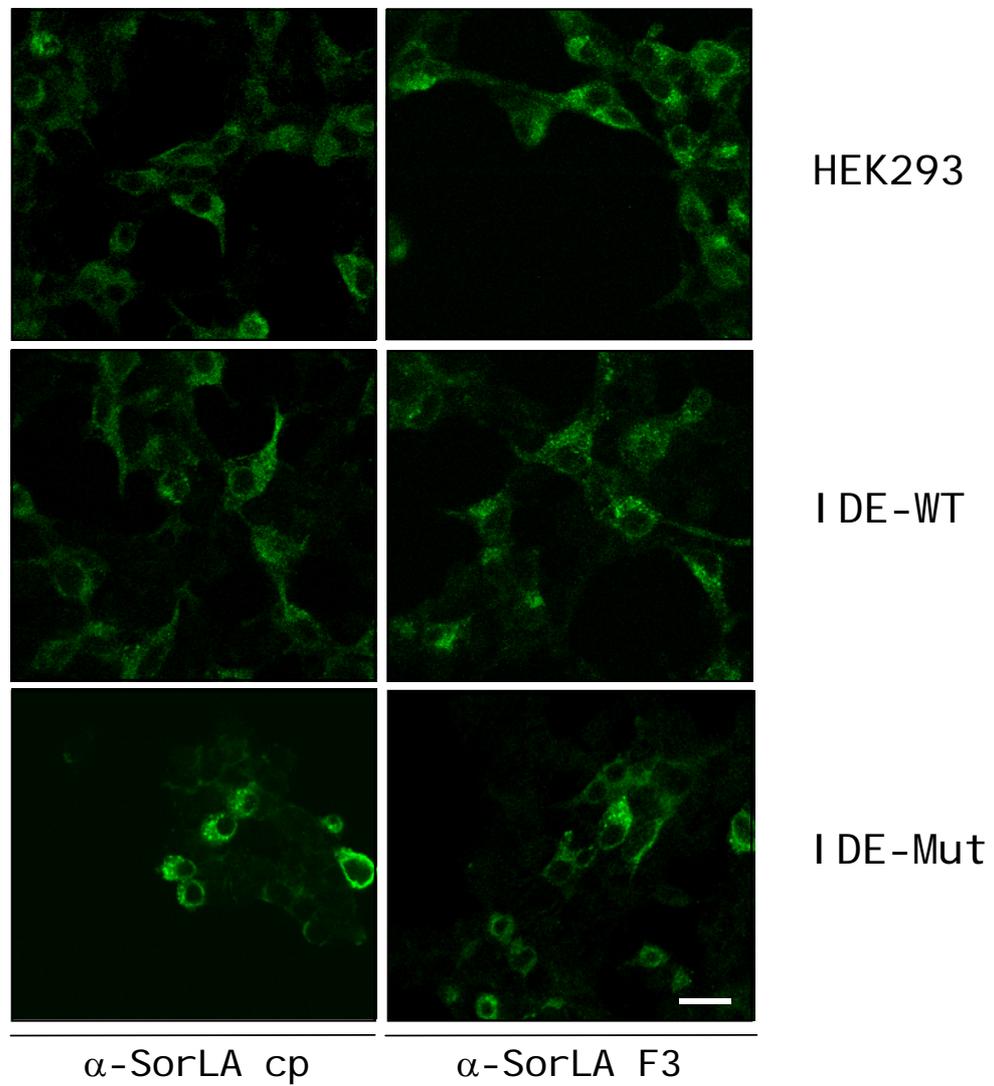
Das IDE befindet sich nicht nur im Zytoplasma der Zellen, es konnte auch an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Seta and Roth, 1997). Das membrangebundene IDE kann daher auch im *in vitro*-Generationsansatz, der nur Reste von Plasma enthält, einen Einfluss auf die Menge an gebildetem SorICD haben.

Ziel dieser Experimente war es wieder, Hinweise auf die Lokalisation der SorICD zu erhalten. Die Abbildung 3.20 B zeigt typische Verteilungen von SorLA in den überexprimierenden Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung (siehe auch Abb. 3.11).

A



B



Vorherige Seite:

Abb. 3.20: Expression von SorLA-Volllänge in IDE-Zellen

HEK293-Zellen mit endogenem (-), bzw. mit überexprimiertem Wildtyp- (WT) oder dominant-negativem (M, Mut) IDE wurden mit pcDNA3.1/Hygro-SorLA stabil transfiziert. **A)** *In vitro*-Generationsexperiment. SorICD wurde *in vitro* aus den transfizierten Zellen hergestellt und in einem 4-12%igen Gradientengel aufgetrennt. Mit α -SorLA cp erfolgte der Nachweis von SorLA-Volllänge (SorLA-VL) und SorICD. **B)** Konfokale Aufnahmen der SorLA-VL-überexprimierenden Zellen. Nach Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen SorLA cp und -F3 und einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die Fluoreszenzintensität in Bildern mit 1 μ m Schichtdicke gemessen. Die Größenangabe entspricht 20 μ m.

* unspezifische Banden

Als Kontrolle, um luminales von zytoplasmatischem und möglicherweise nukleärem SorLA zu unterscheiden, diente wieder der Antikörper gegen SorLAs Ektodomäne. Sowohl optisch, als auch nach der digitalen Auswertung (nicht gezeigt) konnten keine gravierenden Unterschiede zwischen den Kernfluoreszenzintensitäten von α -SorLA cp- bzw. F3-gefärbten Zellen festgestellt werden, weder in Zellen mit endogenem noch in solchen mit überexprimiertem Wildtyp- oder dominant-negativem IDE.

In Analogie zu 3.3.1.1 wurde untersucht, ob in den Wildtyp- bzw. dominant-negatives IDE-überexprimierenden Zellen eine Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT zu einer Akkumulation von SorLA-Volllänge führt.

Durch die Behandlung mit DAPT wird weniger SorICD ins Zytoplasma entlassen. In unbehandelten Zellen mit dominant-negativem IDE sollten hingegen aufgrund des verminderten Abbaus größere Mengen der SorICD im Zytoplasma vorhanden sein. Wenn also – wie postuliert wurde - wenig SorICD nach DAPT-Behandlung in größeren SorLA-Volllänge-Mengen resultiert, sollte mehr SorICD durch verminderten Abbau in geringeren SorLA-Volllänge-Mengen resultieren. SorLA-überexprimierende IDE-WT- und IDE-Mut-Zellen wurden über Nacht mit bzw. ohne DAPT inkubiert und nach der Isolation des Gesamtzelllysates wurden gleiche Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.21).

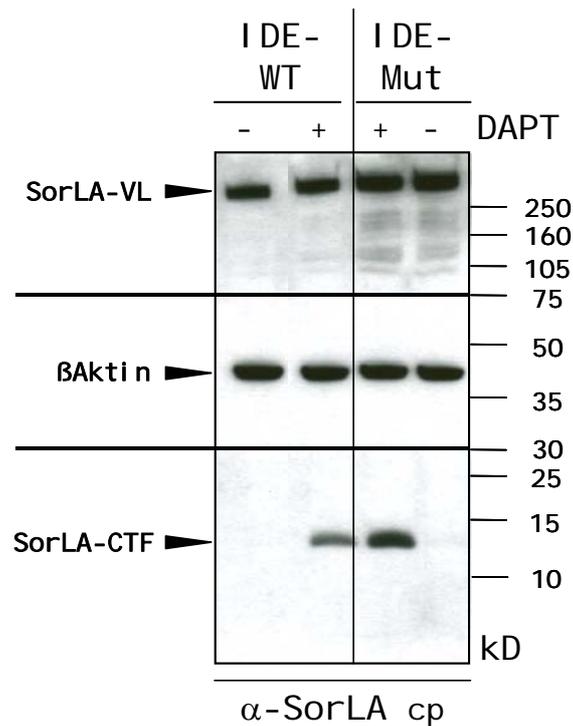


Abb. 3.21: Auswirkung der Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT in SorLA-überexprimierenden Zellen mit und ohne aktives IDE

Stabil mit SorLA-Volllänge transfizierte HEK293-Zellen mit endogenem bzw. mit überexprimiertem Wildtyp- (WT) oder dominant-negativem (Mut) IDE wurden 16 h mit 1 μ M DAPT (+) oder mit dessen Lösungsmittel DMSO (-) behandelt und nach einer Gesamtproteinpräparation in 4-12%igen Gradientengelen aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese in der Höhe der Markerbanden für 75 und 30 kD zerteilt. Die Membranabschnitte mit den großen und den kleinen Proteinen wurden mit α -SorLA cp, der mit den mittleren mit α - β Aktin untersucht.

In beiden IDE-überexprimierenden Zelllinien sind die CTFs nach DAPT-Behandlung akkumuliert. Die Proben aus einer Linie weisen in etwa gleiche Mengen an SorLA-Volllänge auf, unabhängig davon, ob sie aus DAPT-behandelten oder –unbehandelten Zellen stammten, wie es auch schon in Abbildung 3.9 zu sehen war. Von einer Wirkung der ICD auf die Volllänge-Konzentration kann nach diesen Ergebnissen nicht ausgegangen werden. In dieser Abbildung erkennt man auch, dass selbst Zellen mit defektem IDE nicht genügend SorICD akkumulieren, um dieses in Gesamtprotein-Präparationen nachzuweisen.

DISKUSSION

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Signaltransduktion durch den Typ-I-Transmembranrezeptor SorLA, um somit Aufschlüsse über dessen neuronale Funktion zu erhalten.

Diese Fragestellung teilte sich in unterschiedliche Ansätze: Was stellt die zelluläre Antwort auf eine Stimulation mit dem Liganden Kopfaktivator dar? Kann SorLA durch Ligandenbindung eine Signalkaskade über Adaptermoleküle einleiten, wie es für Verwandte aus beiden Familien, zu denen SorLA gehört, beschrieben wurde? Und/oder ist ein proteolytisches Fragment des Rezeptors, das nach regulierter Intra-membran-Proteolyse entsteht, fähig, in den Kern zu gelangen, um dort eine Expression von Zielgenen einzuleiten oder zu unterdrücken?

4.1 Die zelluläre Antwort auf SorLA-vermittelte Signalkaskaden

Ein guter Ansatzpunkt für die Untersuchung von Signalwegen ist gegeben, wenn die zelluläre Antwort auf eine Stimulation bekannt ist. Inhibitoren oder Aktivatoren der Signalübertragung würden zu messbaren Veränderungen in dieser Reaktion führen und Rückschlüsse über die beteiligten Komponenten zulassen.

Es konnte gezeigt werden, dass SorLA das Neuropeptid Kopfaktivator (KA) bindet (Lintzel et al., 2002). Für Zellen neuronalen Ursprungs wurde ein erhöhter Anteil an Zellen in Mitose und damit einhergehend eine stärkere Proliferation nach der Behandlung mit KA beschrieben (Hampe et al., 2000; Lintzel et al., 2002). Die Zelllinien BON und NT2, die KA als autokrinen Wachstumsfaktor produzieren, exprimieren SorLA (Hampe et al., 2000), das einzige humane Ortholog des KA-Rezeptors HAB (Head-activator Binding Protein) aus dem Süßwasserpolypen (Hampe et al., 1999). Die mitogene Wirkung von KA auf diese Zellen konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit dem SorLA-Propeptid, das als kompetitiver Inhibitor der Bindung von KA an SorLA fungiert, gehemmt werden (Lintzel et al., 2002). Dies deutet auf eine Beteiligung von SorLA an der Übertragung der Mitose-stimulierenden Wirkung von KA hin. Anhand der Verminderung der Anzahl von BON-Zellen in

Mitose durch die Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren wurde weiterhin auf eine Beteiligung eines Kalzium-aktivierten Kaliumkanals an der Weiterleitung des Mitose-Signals geschlossen (Kayser et al., 1998).

Der mitogene Effekt von KA auf NT2-Zellen scheint schwer reproduzierbar zu sein: Die Auszählung am Mikroskop nach DNA-Markierung mit Hoechst 33258 zeigte eine Erhöhung im Anteil mitotischer Zellen von 2% auf 7% nach 1,5-stündiger KA-Behandlung (Hampe et al., 2000). Die Auszählung von Zellen mit markiertem phosphorylierten Histon H3 ergab jedoch nur eine Zunahme im Anteil mitotischer Zellen von 2,9% auf 4,6% (Lintzel et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit der nach einer Doppelbestimmung von DNA-Gehalt und phosphoryliertem Histon H3 der Anteil mitotischer Zellen in einer Population gemessen werden kann. Mit einer Analyse am Durchflusszytometer wurden dabei 20 000 Zellen pro Ansatz untersucht. Die Bestimmung der mitotischen Zellfraktion (Abb. 3.2-3.4) gelang mit dieser Methode in Analogie zur Literatur (van Vugt et al., 2004; Xu et al., 2001). Etwa 2% der KA-unbehandelten NT2-Zellen befinden sich in Mitose (Abb. 3.4), was mit den Ergebnissen von Hampe et al. (2000) übereinstimmt. Ein mitogener Effekt von KA auf NT2-Zellen konnte jedoch auch nach unterschiedlichen Variationen der Inkubationsparameter mit dieser Methode nicht erfasst werden, das gleiche gilt für BON-Zellen (nicht gezeigt). Die Abweichungen in den einzelnen Experimenten waren dabei - in Relation zum Prozentsatz an Zellen in Mitose - relativ hoch. Dies erschwert eine Aussage über eine möglicherweise geringe Zunahme des Anteils an Zellen in Mitose, könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass der Effekt von KA besonders auf Zellen in bestimmten Zyklusphasen wirkt, deren Anteil innerhalb der einzelnen Versuche nicht konstant war. Um dies zu prüfen und um ggf. den Effekt von KA durch Synchronisation der behandelten Zellen zu erhöhen, wurden NT2-Zellen durch Thymidin reversibel in der G1-Phase arretiert. Ein mitogener Effekt von KA auf diese Zellen wurde nicht ermittelt, die Arretierung in anderen Zellzyklusphasen wurde nicht überprüft.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Mitose-stimulierenden Wirkung von KA bestand in der Untersuchung der Proliferation von Zellen unter Einfluss von KA (Kayser et al., 1998). Durch den Farbstoff alamarBlue wurde dabei indirekt die

Zellzahl vor und nach der Inkubation mit KA ermittelt (Abb. 3.5). Auch diese Methode führte – ebenfalls nach Variation der Versuchsparameter – zum gleichen Ergebnis wie die durchflusszytometrische Analyse. Augenscheinlich hat Kopfaktivator unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen keinen positiven Einfluss auf die Einleitung der Mitose.

Der Unterschied zu früheren Versuchen zur Bestimmung der KA-Aktivität auf NT2- und BON-Zellen wird zum einen auf die Bestimmungsmethoden und die Spezifität der Markierung zurückgeführt, zum anderen auf unterschiedliche Bedingungen in der Zellkultur. Beispielsweise könnte der Konfluenzgrad der Zellen zum Zeitpunkt des Versuches eine Rolle spielen.

Die Bestimmung der Einleitung der Mitose als zelluläre Antwort der Zellen auf eine KA-Behandlung sollte als Kontrolle für spätere Versuche zur Aufklärung der Signalübertragung durch SorLA dienen. Ungünstigerweise erwies sich dieses Kontrollsystem aufgrund der oben genannten Ergebnisse als nicht anwendbar. Auf Versuche zur Klärung der Signalübertragung mit Hilfe von Inhibitoren bekannter Signalwege und Kompetitoren der Bindung von KA an SorLA wurde daher verzichtet. Auch der Einfluss der Prozessierung von SorLA als Auslöser einer Signalkaskade konnte nicht in einem physiologischen Zusammenhang gemessen werden, worauf später nochmals eingegangen wird.

4.2 Überprüfung von Phosphorylierungskaskaden nach KA-Stimulation

Für eine Signalübertragung durch KA sprachen noch weitere Faktoren: Die Bindung von Kopfaktivator an SorLA-exprimierende BON- bzw. NT2-Zellen führt laut Literatur nicht nur zu einer Erhöhung der Anzahl der mitotischen Zellen, sondern auch zu einer Translokation von intrazellulärem SorLA an die Zelloberfläche und zur Synthese von SorLA (Hampe et al., 2000). Hinweise auf bisher nicht beschriebene Signalkaskaden bzw. darauf, wie die Signale, die zur Translokation und Expression von SorLA führen, vermittelt werden, sollten mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese erhalten werden. Mit dem neu entwickelten Fluoreszenzfarbstoff

Pro-Q Diamond, der spezifisch phosphorylierte Proteine markiert, sollten Unterschiede im Phosphoproteom von NT2-Zellen vor und nach der Behandlung mit KA ermittelt werden. Das Protokoll zur Färbung der Gele war vom Hersteller nicht vollständig optimiert und wurde zwischenzeitlich sogar vom Hersteller geändert.

Zu Beginn der Versuche konnte nur stellenweise eine auswertbare Färbung der Phosphoproteine im Gel erreicht werden (Abb. 3.6), obwohl die Gesamtprotein-färbung mit dem Farbstoff SYPRO Ruby zeigte, dass die Trennung der Proteine reproduzierbar gut war. Es bestand daher das Bestreben, die Färbemethode zu optimieren, was leider nicht zufriedenstellend gelang. Unterschiede im Phosphoproteom von KA-behandelten und unbehandelten Zellen konnten nicht reproduzierbar erkannt werden. Der Beantwortung der Frage, ob eine durch KA aktivierte Signalkaskade mit dieser Methode identifiziert werden kann, wurde aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Phosphoprotein-Färbung nicht weiter nachgegangen.

Seit der Markteinführung dieses Produktes 2003 sind nicht viele Veröffentlichungen zu Pro-Q Diamond erschienen. Dies könnte auf die allgemeinen Schwierigkeiten bei der Durchführung der Färbung zurückgeführt werden. Über vergleichende Analysen wurde bisher sehr wenig veröffentlicht, als Beispiel sei hier Nakamura et al. (2006) genannt. Die anderen Veröffentlichungen beschäftigen sich mit stationären Phosphoproteomen.

Ein ähnlicher Ansatz wurde anschließend mit der DIGE-Färbemethode angewandt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass bis zu drei Proben in einem zweidimensionalen Gel gleichzeitig analysiert werden können. Die Idee, dass eventuell eine durch die Einfügung einer negativ geladenen Phosphatgruppe induzierte Verschiebung des isoelektrischen Punktes eines Proteins in 2D-Gelen nach der Auftrennung in engen pH-Bereichen sichtbar gemacht werden kann, sollte hier überprüft werden. In der Literatur wurde über eine solche Methode auf DIGE-Basis noch nicht berichtet. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte zunächst im Bereich der pH-Werte 4-7, anschließend im Bereich pH 5,3-6,5. Diese erste Dimension wurde über eine Breite von 24 cm getrennt, was für eine Trennung im pH-Bereich 5,3-6,5 heißt, dass sich ein modifiziertes Protein pro Änderung seines isoelektrischen Punktes um 0,1 Einheiten 2 cm vom unveränderten Protein entfernt. Die Veränderung des isoelek-

trischen Punktes durch Phosphorylierung des Proteins hängt von der Anzahl der Ladungen des Proteins und der angehängten Phosphatgruppen ab und kann nicht allgemein vorhergesagt werden.

Nach längeren Inkubationszeiten mit KA wäre es mit dieser Methode auch möglich, Änderungen im Expressionsmuster der Zellen zu finden. Trotz guter Reproduzierbarkeit der Gele (Abb. 3.7) wurden in den Proteinmustern keine Veränderungen auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene nach KA-Behandlung der Zellen gefunden.

Dass vermutlich nicht der gesamte zelluläre Vorrat eines Proteins in einer Signalübertragung phosphoryliert wird, könnte zu Problemen beim Nachweis von Phosphorylierungskaskaden in beiden Methoden führen. Eine Anreicherung von phosphorylierten Proteinen könnte dieses Problem reduzieren und würde bei zukünftigen Versuchen vielleicht zum Erfolg führen.

Mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierte Form eines Signalkaskadenproteins kann mittels Immundetektion die Aktivierung bzw. Deaktivierung dieses Proteins geprüft werden. Allerdings sollten dafür erste Hinweise auf einen möglichen Weg der Übertragung vorhanden sein. Nach Kopfaktivator-Stimulation wurde ein Kalziumeinstrom in BON-Zellen beobachtet (Kayser et al., 1998), was oftmals zu einer Aktivierung des MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase)-Signalübertragungsweges führt. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Effekt auf die Phosphorylierung der Untereinheiten der MAPK nach Kopfaktivator-Behandlung festgestellt werden (3.2.1).

Ob SorLA selbst nach KA-Stimulation phosphoryliert wird, konnte nach einer Immunpräzipitation von SorLA durch immunologischen Proteinnachweis mit Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäurereste nicht bestimmt werden (nicht gezeigt). Gliemann et al. (2004) konnten ebenfalls keine Phosphorylierung von SorLA nach Stimulation mit dem Liganden PDGF-BB (Platelet-derived Growth Factor-BB) feststellen.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass ein direkter Effekt von KA auf NT2- und BON-Zellen in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte.

4.3 Signalübertragung durch sequentielle Proteolyse von SorLA

Eine alternative Möglichkeit zur Übertragung des Kopffaktor- (oder eines anderen) Signals in die Zelle stellt die regulierte Prozessierung des Rezeptors SorLA dar. Der Mechanismus der regulierten Intramembran-Proteolyse (RIP), bei der ein Transmembranprotein innerhalb der Membrandoppelschicht geschnitten und dadurch ein biologisch aktives Proteinfreisetzungsfreigesetzt wird, wurde schon für andere Typ-I-Transmembranrezeptoren beschrieben (Ehrmann and Clausen, 2004; Wolfe and Kopan, 2004; Landman and Kim, 2004). Ein Beispiel ist der in der Einleitung beschriebene Notch-Rezeptor. Die in diese RIP involvierte Intramembran-Protease ist die Presenilin-abhängige γ -Sekretase.

4.3.1 SorLA ist ein Substrat der γ -Sekretase

Voraussetzung für eine Intramembran-Proteolyse durch den γ -Sekretase-Komplex ist eine Abspaltung der Ektodomäne. Bei SorLA wird diese Abspaltung durch die α -Sekretase TACE (Tumour Necrosis Factor α Convertase) katalysiert (Guo et al., 2002) und findet in geringem Umfang konstitutiv statt, kann aber durch Kopffaktor (Hampe et al., 2000) und PDGF-BB, nicht jedoch durch das SorLA-Propeptid oder RAP (Receptor Associated Protein) (Hermey et al., 2006) verstärkt werden. Weiterhin kann dieses sogenannte „Shedding“ auch durch Phorbolster stimuliert werden (Hampe et al., 2000; Hermey et al., 2006). In der Arbeitsgruppe wurde SorLA als Substrat für die γ -Sekretase identifiziert (Bohm et al., 2006), was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die Behandlung mit DAPT, einem spezifischen Inhibitor der γ -Sekretase, führt zu einer Akkumulation der C-terminalen Fragmente (CTF). Dies konnte sowohl bei überexprimiertem und endogenem Volllänge-SorLA als auch bei künstlichen Fragmenten, die SorLA nach dem einleitenden α -Sekretase Schnitt imitieren (SorLA-CTF*), beobachtet werden (Abb. 3.8, 3.9 und 3.10). Auch andere Arbeitsgruppen (Nyborg et al., 2006; Hermey et al., 2006) bestätigen diese Ergebnisse. Die durch den γ -Sekretaseschnitt ins Zytoplasma freigesetzte Intrazellulär-domäne (SorICD) ist im Gegensatz zur Ektodomäne sehr instabil. Sie konnte, wie

auch für andere γ -Sekretase-Substrate beschrieben (z.B. Sastre et al., 2001), erst durch einen speziellen *in vitro*-Generationsansatz nachgewiesen werden und entsteht nur, wenn die Inkubationsansätze keine Inhibitoren der γ -Sekretase enthalten. In dieser Arbeit erfolgte erstmals der Nachweis, dass SorICD nicht nur aus dem künstlichen SorLA-CTF*, sondern auch aus der Volllänge freigesetzt werden kann (Abb. 3.10). Aufgrund der schlechten Nachweisbarkeit von SorICD konnte eine Liganden-induzierte Freisetzung, z.B. durch KA, nicht direkt bestimmt werden. Da KA oder PDGF-BB jedoch die einleitende α -Prozessierung stimulieren, wird hier von einer Liganden-abhängigen Intramembran-Proteolyse ausgegangen (siehe auch Abb. 4.2). Ein physiologischer Nachweis einer Signalübertragung durch SorICD hätte durch eine Aufhebung des - postulierten - mitogenen Effektes von KA nach Inhibition der Freisetzung von SorICD durch DAPT erbracht werden können. Da jedoch keine mitogene Wirkung von KA feststellbar war, fehlte ein System zum physiologischen Nachweis der Signalübertragung durch die Intrazellulärdomäne.

SorICD konnte mittels Immunpräzipitation nicht in genügenden Mengen angereichert werden, um die Schnittstelle der γ -Sekretase zu bestimmen (nicht gezeigt). Dennoch sollen hier die γ -Sekretase-Schnittstellen in ausgewählten Substraten der SorLA-Sequenz gegenübergestellt werden (Abb. 4.1). Die γ -Sekretase katalysiert einen bis mehrere Schnitte innerhalb der Transmembrandomäne, die zudem keine Sequenzspezifität erkennen lassen (Struhl and Adachi, 2006). In APP wurden mindestens 3 verschiedene Schnittstellen der γ -Sekretase (Haass, 2004), in Notch1 zwei (Okochi et al., 2002) und in p75^{NTR} (Neurotrophin Receptor p75) (Jung et al., 2003) nur eine beschrieben. Derzeit kann daher über Position und Anzahl der γ -Sekretase-Schnittstellen in SorLA nur spekuliert werden. Die genaue Schnittstelle von TACE in SorLA ist ebenfalls noch nicht bekannt.

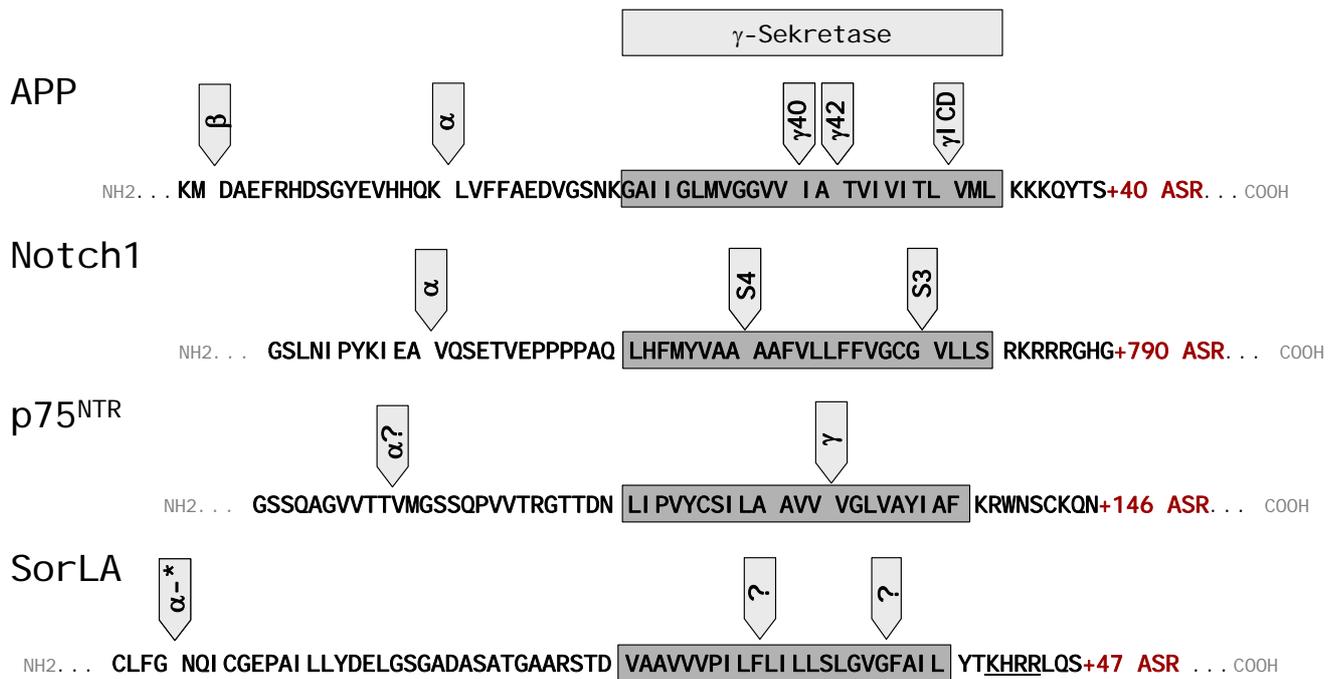


Abb. 4.1: Schnittstellen der Sekretasen in verschiedenen Typ-I-Transmembranproteinen
Die Schnittstellen von α-, β- und γ-Sekretase – sofern bekannt - in APP, Notch1 und p75^{NTR} sowie die Länge der jeweiligen Intrazellulärdomänen (rot dargestellt) sind angegeben. In Notch1 werden die Schnittstellen der γ-Sekretase als S3 und S4 bezeichnet. Die Schnittstellen im SorLA-Molekül sind nicht bekannt. α-* markiert den N-Terminus nach Abspaltung des Signalpeptides im künstlich hergestellten SorLA-CTF*. Diese wurde willkürlich festgelegt. Die Transmembran-domänen sind grau hinterlegt und das Kernlokalisierungssignal in SorLA ist unterstrichen, das Kernlokalisierungssignal von Notch1 lautet KKFR und liegt C-Terminal der hier gezeigten Sequenz (Kopan et al., 1994). Schnittstellen von Notch1 aus Mumm et al. (2000) und Okochi et al. (2002), von APP nach Haass (2004) und von p75^{NTR} nach Jung et al. (2003).

4.3.2 SorICD hat keinen Einfluss auf die Menge an Volllänge-SorLA

In früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe erhöhten eine Inhibition der γ-Sekretase und die damit verbundene Minderung an freiem SorICD die Mengen an überexprimiertem und endogenem Volllänge-SorLA im immunologischen Proteinnachweis (Bohm et al., 2006). Dies konnte in dieser Arbeit weder in SorLA-überexprimierenden (Abb. 3.8 und 3.21), noch in SorLA-endogen exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 3.9). Die vermeintliche Stabilisierung von SorICD in Zellen mit einer überexprimierten dominant-negativen Mutante des Insulin-degradierenden Enzyms, das am Abbau der SorICD beteiligt ist, sollte sich daher negativ auf die Volllänge auswirken. Auch in diesen Zellen kann kein Unterschied in der Stärke der SorLA-Volllänge-Bande vor und nach der Behandlung mit DAPT gefunden werden

(Abb. 3.21). Die Veröffentlichungen von Nyborg et al. (2006) und Hermeijer et al. (2006) lassen ebenfalls nicht auf einen solchen Rückkopplungsmechanismus schließen.

Die Daten aus einer quantitativen RT-PCR zeigen in Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit keinen Effekt von DAPT auf den SorLA-mRNA-Gehalt in überexprimierenden Zellen, in denen die SorLA-Expression der Kontrolle eines viralen Promotors unterliegt. Allerdings wurde ein 3,2-facher Anstieg der SorLA-mRNA in NT2-Zellen nach DAPT-Behandlung festgestellt (Bohm et al., 2006). Vorausgesetzt, dass die Wirkung von DAPT auf die Menge an SorLA-mRNA über SorLA vermittelt wird, würde ein solcher Rückkopplungsmechanismus bedeuten, dass die Menge an freigesetztem SorICD einen negativen Einfluss auf die Expression von endogenem SorLA hat. Da DAPT jedoch auch die Prozessierung von vielen anderen Proteinen unterdrückt, muss dieser Anstieg an SorLA-mRNA nicht zwangsläufig durch SorLA vermittelt sein. Weiterhin konnte dieser Effekt – wie schon erwähnt – in dieser Arbeit auf Proteinebene nicht beobachtet werden (Abb. 3.9). In früheren Arbeiten wurde bereits nach 30- bzw. 60-minütiger Inkubation von NT2- und BON-Zellen mit Kopffaktor eine Erhöhung des SorLA-Signals in der Immunfluoreszenz festgestellt (Hampe et al., 2000). Wenn man eine Signalübertragung durch Kopffaktor über eine sequentielle Proteolyse von SorLA annimmt, so wird durch KA SorICD freigesetzt. Eine Erhöhung der SorLA-Proteinmenge nach KA-Behandlung wäre somit konträr zum oben genannten Rückkopplungsmechanismus, bei dem SorICD einen negativen Einfluss auf die SorLA-Expression hat. Allerdings ist zu bedenken, dass die Regulation der Proteinmenge auch über die Translationsrate vermittelt werden kann.

4.3.3 Kernlokalisierung von SorICD

Die Prozessierung durch die γ -Sekretase allein stellt noch keinen Beweis für eine Signalübertragung durch ein prozessiertes Proteinfragment dar. Bisher konnte für viele γ -Sekretase-Substrate eine Beteiligung an einer Art Signalvermittlung nachgewiesen und für keines wirklich ausgeschlossen werden (Landman and Kim, 2004;

Wolfe and Kopan, 2004). Eindeutig an einer Signalübertragung beteiligt sind beispielsweise die Intrazellulärdomänen (ICD) von Notch (Selkoe and Kopan, 2003) und CD44, dessen ICD u.a. die Transkription seines eigenen Gens einleitet (Nagano and Saya, 2004). Anhand der Länge der Intrazellulärdomäne kann kein Hinweis auf eine mögliche Signalaktivität gefunden werden, sind diese doch sehr unterschiedlich (Tabelle 4.1).

ÜBERSICHT INTRAZELLULÄRDOMÄNEN			
Name	Länge (ASR)	ICD -Signalaktivität	Referenz
Notch1	802	Nachgewiesen	Okochi et al., 2002 Selkoe and Kopan, 2003
APP	50	Vermutet	Haass, 2004
CD44	74	Nachgewiesen	Lammich et al., 2002
P75^{NTR}	164	Vermutet	Jung et al., 2003
SorLA	> 56*	Vermutet	Bohm et al., 2006

Tabelle 4.1: Länge der Intrazellulärdomänen verschiedener Typ-I-Transmembranproteine
ASR = Aminosäurereste; * Die genaue Schnittstelle der γ -Sekretase und somit der N-Terminus der SorICD sind nicht bekannt. Nach einem Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne von SorLA werden einige Aminosäurereste der Transmembrandomäne und die C-terminalen 56 Aminosäurereste die SorICD bilden.

Die Signalübertragung nach einer Prozessierung durch die γ -Sekretase kann auf unterschiedliche Weise stattfinden: Einerseits per Regulation der Genexpression durch die Intrazellulärdomäne des Rezeptors, wie beispielsweise für Notch und CD44 gezeigt (siehe oben). Eine Alternative wurde für den Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Rezeptor E-Cadherin beschrieben. Durch die Presenilin-vermittelte Prozessierung von E-Cadherin wird ein Komplex aus dessen Intrazellulärdomäne und dem intrazellulären Interaktionspartner β -Catenin, einem Regulator des Wnt-Signalweges, ins Zytoplasma entlassen. Von dort kann β -Catenin je nach den Bedürfnissen der Zelle in den Kern gelangen und die Expression von Zielgenen einleiten (Marambaud et al., 2002). Einzig für DCC (Deleted In Colorectal Cancer) wurde ein negativer Effekt der γ -Sekretase-Prozessierung auf die Signalübertragung postuliert. Die Proteolyse des C-terminalen Fragmentes von DCC vermindert demnach nachgeschaltete Signalkas-

kaden, wie den cAMP/PKA (Cyclic AMP/Protein Kinase A)-Signalweg, einer essenziellen Komponente der synaptischen Transmission (Parent et al., 2005).

APP (Haass, 2004) und die SorLA-Verwandten LRP1 (May et al., 2002) und Sortilin (Nyborg et al., 2006) unterliegen ebenfalls einer sequentiellen und regulierten Proteolyse, eine genaue Funktion von ihren Intrazellulärdomänen wurde jedoch bisher nicht überzeugend beschrieben. Für einen Komplex der Intrazellulärdomäne von APP (AICD) mit Fe65 und Tip60, einer Histon-Acetyltransferase, konnte zwar eine Aktivierung von NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)-regulierten Genen gezeigt werden, der Mechanismus dieser Transaktivierung bleibt jedoch umstritten (Kimberly et al., 2001; Cao and Sudhof, 2001; Cao and Sudhof, 2004; Landman and Kim, 2004).

Einige Wissenschaftler gehen aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Substraten der γ -Sekretase davon aus, dass diese einen generellen Mechanismus zum Abbau von Typ-I-Transmembranproteinen bzw. der nach der Abspaltung der Ektodomäne verbliebenen C-terminalen Fragmente aus der Membran vermittelt (Landman and Kim, 2004; Wolfe and Kopan, 2004). Manche Ektodomänen zeigen Funktionen als kompetitive Inhibitoren der Ligandenbindung, so z. B. die von CD44 (Nagano and Saya, 2004). Von der Ektodomäne des SorLA-Orthologs HAB (Head-activator Binding Protein) wird angenommen, dass sie die lokale Wirkung der Liganden beeinflusst (Hampe et al., 1999). Auch die Ektodomäne von SorLA selbst wurde als Stimulator der Migration von glatten Muskelzellen in der Gegenwart von PDGF-BB beschrieben (Zhu et al., 2004).

Es könnte demnach sein, dass nach der Abspaltung der Ektodomäne die Prozessierung von SorLA durch die γ -Sekretase einzig der Entfernung des C-terminalen Fragmentes aus der Membran dient. Erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von SorLAs Intrazellulärdomäne an Genregulationsprozessen lagen jedoch aus Transaktivierungsexperimenten vor, in denen die an eine Gal4-DNA-Bindedomäne fusionierte SorICD eine - wenn auch nur geringe - Aktivierung eines Luziferase-Reportergens auslöst (Bohm et al., 2006).

Teilweise sind zytoplasmatische Interaktionspartner für eine Stabilisierung der Intrazellulärdomänen und/oder eine Transkriptionsaktivierung durch diese wichtig, wie oben für APP beschrieben. Ein weiteres Beispiel stellt die Intrazellulärdomäne

von ErbB4, einem Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, dar. Erst nach Bindung an YAP (Yes Associated Protein), einem Ko-Transaktivator für viele Transkriptionsfaktoren, kann die Intrazellulärdomäne von ErbB4 eine starke Transkription von Reportergenen vermitteln (Komuro et al., 2003; Landman and Kim, 2004). Ob es Proteine gibt, die mit der ICD von SorLA interagieren und diese stabilisieren, ist bisher nicht bekannt. In der Arbeitsgruppe wurden über ein Hefe-2-Hybridsystem zwei mögliche Kandidaten identifiziert: THG-1a (Transforming Growth Factor β -stimulated Clone-22 Homologue-1a) und ART-27 (Androgen-receptor Trapped Clone-27) (Munck, 2004). THG-1a ist eine gehirnspezifische Spleißvariante von THG-1, einem Transkriptionsfaktor mit repressorischen Eigenschaften (Kester et al., 1999), bei ART-27 handelt es sich um einen Aktivator der Androgen-Rezeptor-vermittelten Transkription (Markus et al., 2002). Die Ko-Expression dieser potentiellen Interaktionspartner im oben genannten Transaktivierungsexperiment führte zu keiner Erhöhung der Reportergenexpression (Böhm, 2005).

Da in diesem Transaktivierungsexperiment das Zielgen auf einem Plasmid lokalisiert ist, kann aufgrund einer leichten Erhöhung der Expression durch SorICD noch keine Aussage über eine mögliche Kernlokalisierung des SorICDs gemacht werden. Daher war es Teil dieser Arbeit, herauszufinden, ob SorICD in den Nukleus gelangen kann. Durch bioinformatische Sequenzanalysen konnte ein potentielles Kernlokalisierungssignal im zytoplasmatischen Schwanz von SorLA identifiziert werden. Wie schon die Schwierigkeiten beim Nachweis von SorICD im immunologischen Proteinnachweis vermuten ließen (Abb. 3.8), war es nicht möglich, in der Immunfluoreszenz freies SorICD von Volllänge-SorLA (bzw. den C-terminalen Fragmenten) zu unterscheiden. In den Kernregionen der Zellen konnte kein spezifisches Signal beobachtet werden, das auf freies SorICD zurückzuführen wäre (Abb. 3.11). Eine Überexpression von einem künstlichen SorICD direkt im Zytoplasma von BON-Zellen lieferte ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse (Abb. 3.12). Mögliche Interaktionspartner, die die Intrazellulärdomäne stabilisieren und beim Transport in den Kern begleiten könnten, sollten in den endogen SorLA-exprimierenden BON-Zellen vorhanden sein. Vermutlich wird auch dieses künstliche Fragment in den meisten Zellen sehr schnell degradiert.

Durch Fusion an den C-Terminus von EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) konnte SorICD erfolgreich stabilisiert werden. Nachdem die Integrität der Fusionsproteine in einem eigens entwickelten Experiment anhand der direkten EGFP-Fluoreszenz in einem SDS-Gel bestätigt werden konnte, wurde in konfokalen Aufnahmen das Verhältnis der EGFP-Fluoreszenz im Kern zu der im Zytoplasma bestimmt (Abb. 3.13). Nur die Fusionsproteine mit SorICD mit intaktem potentiellern Kernlokalisierungssignal zeigten in COS7-Zellen eine signifikant stärkere Kernfluoreszenz als die Kontrolle EGFP. Die Verwendung von dimerem EGFP als Fusionspartner führte zum gleichen Ergebnis. Das Verhältnis aus Kern- zu Plasmafluoreszenz ist dabei nicht in allen Zellen gleich, vielmehr zeigen einzelne Zellen eine stärkere Erhöhung der Kernfluoreszenz. Auch in den mit freiem SorICD transfizierten BON-Zellen konnten vereinzelt Zellen mit stärkerem SorLA-Signal identifiziert werden (Abb.3.12), was durch eine mögliche Zellzyklus-Phasen-spezifische Funktion der SorICD bzw. Expression von stabilisierenden Interaktionspartnern erklärbar wäre. Der Grad an kernlokalisiertem SorICD ist zwar nicht sehr hoch, aber signifikant. Allerdings sollten auch bereits wenige Moleküle eines Proteins im Kern ausreichend sein, damit dieses eine Genexpression einleiten kann.

4.3.4 Tetrameres EGFP ist stärker im Zytoplasma als im Kern lokalisiert

Monomeres EGFP zeigt vermutlich aufgrund seiner Größe die Tendenz, im Kern zu akkumulieren (z.B. Sheng et al., 2004). Diese Tatsache erschwert genaue Aussagen in Untersuchungen zur Kernlokalisierung von Proteinen mit weniger stark ausgeprägter Kernlokalisierung. Um die EGFP-Kernlokalisierung aufgrund von Diffusion zu vermindern, wurde in dieser Arbeit ein für dimeres EGFP kodierendes Konstrukt entworfen. In COS7-Zellen überexprimiertes dimeres EGFP wurde jedoch nicht – wie aufgrund der Überschreitung des Diffusionslimits von etwa 50 kD (Macara, 2001) erwartet – aus dem Kern ausgeschlossen. Um die Tendenz von EGFP, sich im Kern anzureichern, zu untersuchen, wurden in anschließenden Versuchen COS7- und vier weitere oft für Kernlokalisations-Experimente verwendete Zelllinien mit multimerem EGFP transfiziert. Erst Fusionsproteine aus mindestens 4 EGFP-Monomeren zeigten demnach weniger Fluoreszenz im Kern als im Zytoplasma (Abb. 3.14). Das

geringste Kern-/Plasma-Verhältnis der verwendeten Multimere zeigte das Hexamer. Allerdings wurde dieses nur schlecht exprimiert und konnte in manchen Zelllinien gar nicht nachgewiesen werden. Anhand der Daten aus dieser Arbeit kann erstmals tetrameres EGFP anstelle von mono- oder dimerem EGFP als Fusionspartner für subzelluläre Lokalisationsstudien empfohlen werden.

In der Kristallstruktur von GFP wurden Ausmaße von etwa 3 x 4 nm bestimmt (Yang et al., 1996) und Proteine mit einem Durchmesser von < 5 nm sollen die Kernporen passiv passieren könnten (Feldherr and Akin, 1997). Durch die Annahme, dass die Anordnung der EGFP-Einheiten im Fusionsprotein an „Perlen an einer Schnur“ erinnert, ließe sich erklären, dass sich auch die Multimere im Kern anreichern. Die Einheiten des Multimers würden somit nacheinander durch die Kernporen diffundieren. Je mehr EGFP-Einheiten das Fusionsprotein besitzt, desto mehr Zeit würde ein Kerneintritt in Anspruch nehmen und desto stärker könnten intramolekulare Wechselwirkungen diesen Eintritt erschweren. Alternativ könnten die EGFP-Multimere auch nach der postmitotischen Wiederherstellung der Kernmembran im Kern festgehalten werden. Dies würde jedoch nicht die Anreicherung von mono- und dimerem EGFP im Kern erklären.

Zukünftige Studien mit Fusionsproteinen aus tetramerem EGFP und SorICD mit intaktem bzw. mutiertem Kernlokalisierungssignal könnten die beobachtete Kernlokalisierung von SorICD verifizieren. Natürlich wäre eine Beschreibung von physiologischen Zielgenen, die SorLA-vermittelt reguliert werden, der beste Beweis für eine Kernlokalisierung und für eine Signalübertragung durch SorLA.

4.3.4 Ein freier N-Terminus von SorICD könnte dessen schnelle Degradation vermitteln

SorICD mit einem EGFP-geschützten N-Terminus ist stabil, ein Fusionsprodukt mit C-terminalem EGFP konnte nicht nachgewiesen werden und wird vermutlich sehr schnell degradiert (Abb. 3.15). Die Freisetzung des SorICD-EGFP-Fusionsproteins mit einem natürlichen SorICD-N-Terminus sollte dabei aus dem künstlichen γ -Se-

kretase-Substrat CTF*-EGFP erfolgen. Vermutlich aufgrund der schwachen Expression des CTF*-EGFP und der Prozessierung nur eines Teils der Proteine konnte freigesetztes SorICD-EGFP nicht direkt nachgewiesen werden.

Kanning et al., (2003) haben Volllänge-p75^{NTR} mit C-terminalem GFP genutzt, um die Kernlokalisierung der p75^{NTR}-Intrazellulärdomäne nachzuweisen. Sie sehen nur eine schwache Fluoreszenz im Kern, konnten aber auch durch subzelluläre Fraktionierungen die Intrazellulärdomäne per Immundetektion im Kern nachweisen. Die Entwicklung einer solchen Methode unter Verwendung von großen Mengen Zellmaterial und Inhibitoren des Abbaus der SorICD (z.B. Insulin) im Ansatz könnte in zukünftigen Versuchen zur Beantwortung der Frage nach der Kernlokalisierung von SorICD beitragen.

In einem interessanten Ansatz zur Klärung der Lokalisation der γ -Sekretase-Aktivität bei der Prozessierung von APP haben Kaether et al. (2006) ein Fusionsprotein aus dem C-terminalen Fragment von APP mit C-terminalem EGFP (APP-CTF-EGFP) verwendet. Durch Blockierung des intrazellulären Proteintransportes konnten sie zeigen, dass die Prozessierung von APP-CTF-EGFP an der Plasmamembran und/oder in frühen Endosomen stattfindet. Bei ungehinderter γ -Sekretase-Aktivität konnten sie ebenfalls nur geringe Mengen der freigesetzten Intrazellulärdomäne im Kern finden. Eine Optimierung der Expression des in dieser Arbeit verwendeten SorLA-CTF*-EGFP könnte eine solche Bestimmung der subzellulären Lokalisation der Prozessierung von SorLA ebenfalls möglich machen.

Da sowohl durch den γ -Sekretaseschnitt freigesetztes als auch überexprimiertes, künstliches SorICD und SorICD mit C-terminalem EGFP weder per immunologischem Proteinnachweis noch in der Immunfluoreszenz direkt nachweisbar waren, SorICD mit einem EGFP-geschützten N-Terminus jedoch stabil zu sein scheint, kann von einem Signal für eine schnelle Proteindegradation im freien N-Terminus der SorCID ausgegangen werden. Es bedarf weiterer Versuche, diese Aussage zu bestätigen.

4.3.5 SorICD wird durch das Insulin-degradierende Enzym abgebaut

Ein biologisch aktives Protein wird in der Regel sehr schnell abgebaut, was der Regulierung des Signals dient, das ausgelöst wird. Eine konstitutive Signalübertragung muss von der Zelle verhindert werden.

Auch die durch eine Presenilin-abhängige Regulierte Intramembranproteolyse freigesetzten Intrazellulärdomänen von anderen Typ-I-Transmembranproteinen werden sehr schnell abgebaut und sind meist nicht ohne spezielle Anreicherungsmethoden zu identifizieren, was auch für SorICD gilt (Abb. 3.8-3.10). Das zelluläre System, das diesen Abbau übernimmt, ist nicht für alle γ -Sekretase-Substrate gleich: Die Intrazellulärdomänen von Notch (Oberg et al., 2001; Gupta-Rossi et al., 2001) und p75^{NTR} (Kanning et al., 2003; Jung et al., 2003) und - indirekt nachgewiesen - auch von LRP1 (May et al., 2002) werden durch das Proteasom abgebaut. SorICD wird wie AICD (Edbauer et al., 2002; Farris et al., 2003) durch das Insulin-degradierende Enzym (IDE) abgebaut (Abb. 3.17-3.19). IDE, auch Insulysin genannt, dessen kristalline Struktur erst kürzlich aufgeklärt wurde, ist eine hochkonservierte Zink-Metalloprotease, deren Substrate diverse Sequenz- und Strukturmerkmale zeigen und durch IDE mehrfach geschnitten werden (Shen et al., 2006). Insulin wird *in vitro* und *in vivo* durch IDE abgebaut und IDE-defiziente Mäuse zeigen eine Hyperinsulinämie und Glukose-Intoleranz, beides klassische Merkmale des Typ-II-Diabetes (Farris et al., 2003). Als weiteres Substrat für das IDE wurde das A β -Peptid identifiziert, wodurch IDE auch einen Einfluss auf die Entstehung der Alzheimer Krankheit haben könnte, da ein verminderter Abbau genau wie eine verstärkte Produktion der A β -Peptide eine A β -Akkumulation begünstigt (Sun and Alkon, 2006; Farris et al., 2004). Subzellulär wurde IDE in Endo- und Peroxisomen sowie im Zytoplasma und membrangebunden an der Zelloberfläche gefunden, ebenso existiert eine sekretierte Form (Seta and Roth, 1997; Farris et al., 2003). Der Abbau von SorICD wird hauptsächlich durch eine zytoplasmatische Aktivität katalysiert, da SorICD in zytoplasmafreien *in vitro*-Generationsansätzen angereichert werden kann (Abb. 3.10) und erst durch Zugabe von NT2- oder BON-Plasma abgebaut wird (Abb. 3.16). Ob NT2- und BON-Zellen IDE enthalten, konnte allerdings noch nicht geprüft werden, der Abbau von SorICD wird allerdings durch gleichzeitige Inkubation mit

dem kompetitiven Inhibitor Insulin unterdrückt (nicht gezeigt). Weiterhin wurde IDE in humanen Neuronen nachgewiesen (Bernstein et al., 1999) und kommt daher vermutlich auch in Zellkulturlinien neuronalen Ursprungs vor. Untersuchungen mit Zytoplasma aus Zellen, die IDE in Wildtyp- oder dominant-negativer (IDE^{E111Q}) Form überexprimieren bzw. endogen IDE enthalten, zeigten, dass SorICD ähnlich wie AICD durch IDE abgebaut werden kann (Abb. 3.17 – 3.18). Die Verwendung von verschiedenen Inhibitoren bestätigte dies (Abb. 3.19). Der negative Effekt der E111Q-Mutation auf den Abbau von SorICD ist allerdings schwächer als erwartet, die abbauende Aktivität wird nicht vollständig aufgehoben. Wäre eine andere Aktivität zusätzlich zu IDE am Abbau von SorICD beteiligt, so müsste diese jedoch auch im Plasma der Zellen ohne überexprimiertes IDE vorhanden sein, welches jedoch wenig Einfluss auf den Abbau von SorICD hat (Abb. 3.18). Es soll hier nochmals darauf hingewiesen werden, dass das Gen für das überexprimierte IDE aus der Ratte stammt und möglicherweise leichte Differenzen in der Substraterkennung und/oder –Proteolyse von humanem IDE zeigen könnte. Eine Bestätigung, dass SorICD nicht durch das Proteasom abgebaut wird, lieferten kürzlich Hermey et al. (2006). Sie stellten keine Stabilisierung von SorICD durch die Proteasominhibitoren Epoxomicin und Lactacystin im Gesamtzelllysat fest.

Die Überexpression von SorLA-Volllänge in den Zellen mit dominant negativem IDE half - vermutlich aufgrund von dessen Restaktivität - nicht, endogenes SorICD in der Immunfluoreszenz nachzuweisen (Abb. 3.20), obwohl die Prozessierung durch die γ -Sekretase in diesen Zellen nicht beeinträchtigt war (Abb. 3.20 und 3.21). Wenngleich auch die Expressionsraten eines Proteins in unterschiedlichen überexprimierenden Zellen nicht vergleichbar sind, konnte eine höhere Expression von SorLA in Zellen mit dominant-negativem IDE beobachtet werden (Abb. 3.20 und 3.21). Ob die Ursache dafür nur in einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz liegt oder aber aufgrund von zellulären Reaktionen auf den – wenn auch nur leicht – veränderten Gehalt an SorCID zurückgeführt werden kann, bleibt offen. Diese Theorie wäre jedoch übereinstimmend mit der Erhöhung der SorLA-Expression nach Kopffaktor-Stimulation (Hampe et al., 2000), vorausgesetzt man nimmt an, dass KA die Prozessierung zu SorICD einleitet. Ein ähnliches Rückkopplungssystem wurde

beispielsweise für CD44 beobachtet, einem Protein, das einen Kontakt zwischen intrazellulärem Aktinskelett und extrazellulärer Matrix herstellt. Die Abspaltung der Ektodomäne ist entscheidend bei der Regulation der Interaktion von CD44 mit der extrazellulären Matrix während der Migration von Zellen. Die darauf folgende γ -Sekretase-vermittelte Freisetzung der Intrazellulärdomäne befähigt diese, in den Zellkern zu wandern und die Genexpression u.a. seines eigenen Gens zu aktivieren, damit der Verlust von CD44-Rezeptoren durch die Prozessierung kompensiert werden kann (Nagano and Saya, 2004).

4.4 Modell der regulierten Intramembranproteolyse von SorLA

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in dieser Arbeit ein weiterer Teil der Signalübertragung durch regulierte Intramembranproteolyse von SorLA aufgeklärt wurde. Abbildung 1.4 der Einleitung wurde anhand der Ergebnisse dieser Arbeit aktualisiert (Abb. 4.2).

Wie schon in der Einleitung beschrieben, kann erst nach der Entfernung des Propeptides durch Furin (1) der Ligand Kopfaktivator an SorLA binden (2), wodurch die α -Sekretase TACE die Ektodomäne (sSorLA) in den Zellüberstand entlässt (3). Diese Prozessierung kann durch Phorbolster verstärkt werden und geschieht zum Teil auch konstitutiv. Weiterhin ist dieses sogenannte „Ektodomänen-Shedding“ zelltypabhängig, so zeigen z.B. BON-Zellen mehr konstitutive Ektodomänenabspaltung als NT2-Zellen (Hampe et al., 2000). Ob nach der Bindung von Kopfaktivator SorLAs Intrazellulärdomäne oder Adapterproteine phosphoryliert werden, konnte in dieser Arbeit nicht bestimmt werden (8). Nach der Entfernung der Ektodomäne stellt der membranständige Rest ein Substrat für die γ -Sekretase dar (4), deren Aktivität die Intrazellulärdomäne von SorLA ins Zytoplasma freisetzt (5). Dies konnte mit einem künstlichen C-Terminalen Fragment von SorLA nachgewiesen werden und bestätigt die Ergebnisse von Böhm et al. (2006). Dass nicht nur dieses künstliche CTF* ein Substrat der γ -Sekretase ist, sondern SorICD auch nach der Prozessierung der physiologischen Volllänge-Form von SorLA freigesetzt wird, wurde

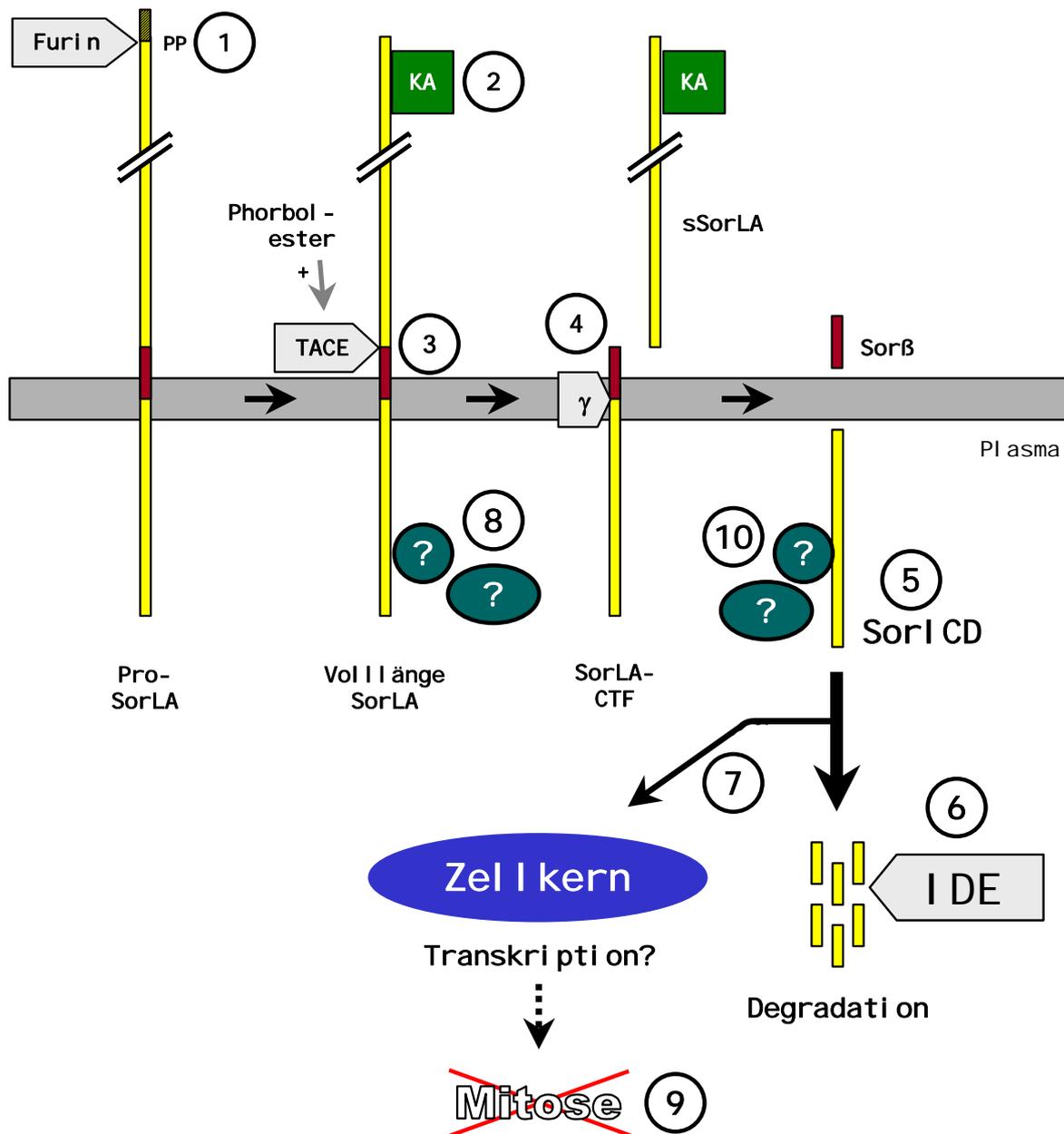


Abb. 4.2: Signaltransduktion durch SorLA

Beschreibung siehe Text, Sorβ = SorLA-Analog zu p3 aus APP

in dieser Arbeit gezeigt. Der größte Teil der freigesetzten SorICD wird schnell durch die zytosolmatische Aktivität des Insulin-degradierenden Enzyms abgebaut (6) und nur ein kleiner Teil kann in den Zellkern gelangen (7). Ob dort eine Genregulation eingeleitet wird, ist nicht bekannt. Der sehr rasche Abbau der SorICD spricht für eine Signalaktivität, denn ein nicht-aktives Fragment könnte, auch ohne zelluläre Schäden auszulösen, langsamer degradiert werden. Es konnte in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine mögliche Einleitung der Mitose gefunden werden (9). Es ist nicht bekannt,

ob Adapterproteine die Intrazellulärdomäne stabilisieren oder ob diese am Transport von SorICD in den Kern und/oder einer möglichen Genregulation beteiligt sind (10).

Mehrere Hinweise sprechen dafür, dass die Signaltransduktion durch SorLA noch komplizierter und eventuell Zelltyp- oder sogar Zellphasen-spezifisch reguliert ist: Die Kernlokalisierung von EGFP-markiertem SorICD ist in einigen Zellen besonders stark (Abb. 3.13 D) und in BON-Zellen konnte nur in wenigen Zellen nach Kotransfektion mit freiem SorICD und EGFP ein stärkeres SorLA-Signal als in den Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 3.12). Unterschiedliche Zelllinien zeigen unterschiedlich starkes konstitutives „Ektodomänenshedding“ (Hampe et al., 2000), sodass die Zellen zwischen konstitutiver und Liganden-induzierter Prozessierung unterscheiden müssen. Weiterhin gibt es Liganden wie ApoE-reiche Lipoproteine und RAP, die internalisiert werden (Taira et al., 2001). Die Zellen müssen also unterscheiden können, ob ein Ligand die Internalisierung oder die Ektodomänenabspaltung einleitet. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass PDGF in SorLA-überexprimierenden CHO-K1-Zellen sowohl durch SorLA internalisiert werden kann (Gliemann et al., 2004), als auch eine Abspaltung der Ektodomäne einleitet (Hermey et al., 2006). Wie genau die Regulation abläuft, kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit wäre eine Regulation der α -Sekretase selbst (Mezyk et al., 2003), eine andere, dass die Ektodomäne erst innerhalb des endozytotischen Weges abgespalten und anschließend wieder an die Plasmamembran gebracht wird. Letzteres ist allerdings unwahrscheinlich, wenn man berücksichtigt, dass in Endozytose-defizienten Zellen die α -Sekretase-Prozessierung von APP nicht vermindert wird (Carey et al., 2005). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der konstitutiven Ektodomänenabspaltung und der schnellen Degradation erst größere Mengen freigesetzter SorICD zu einer Signalübertragung führen.

4.5 Zusammenhang zwischen SorLA und der Alzheimer Krankheit

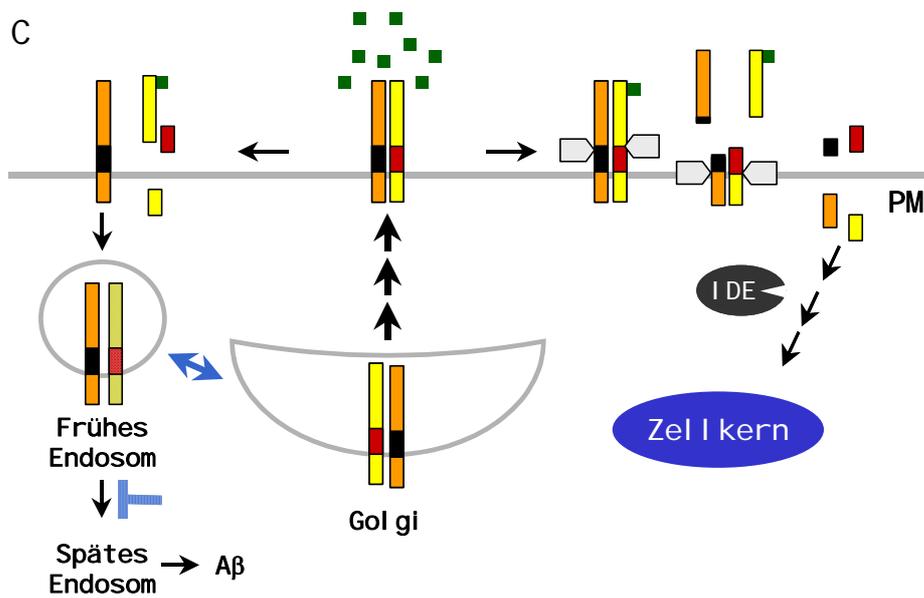
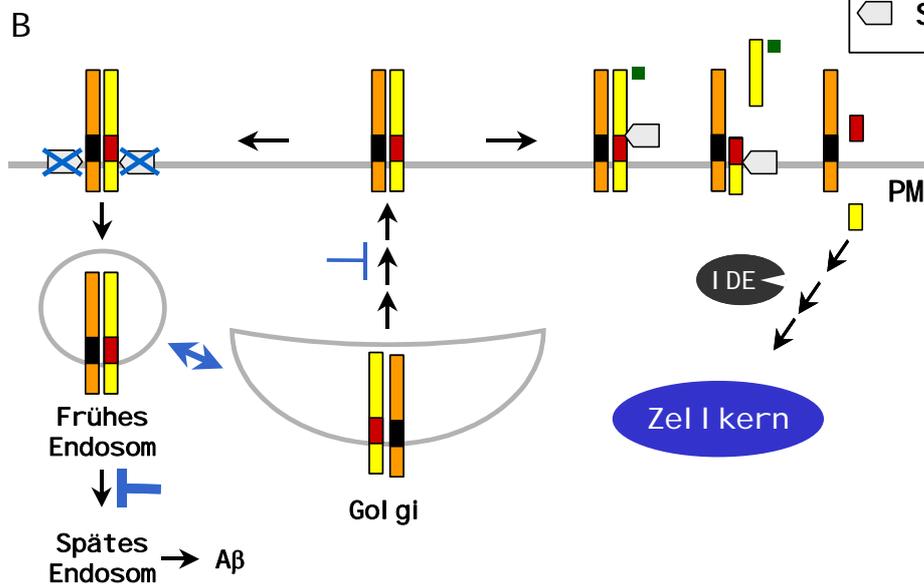
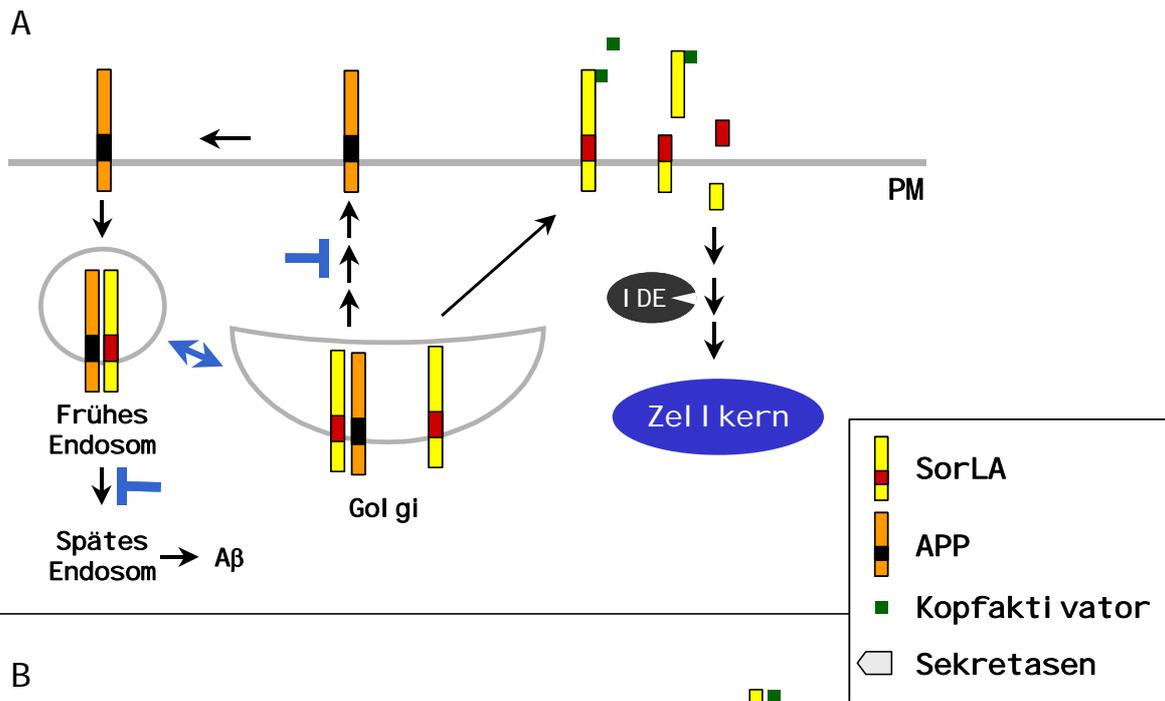
Wie bereits in der Einleitung erklärt, konnte ein Zusammenhang zwischen SorLA, das allerdings nicht als genetischer Risikofaktor beschrieben wurde, und der Alzheimer Krankheit gezeigt werden (Abb. 1.3). SorLA bindet als einziges Mitglied der Rezeptorfamilie mit Vps10-Domäne das Amyloide Vorläuferprotein APP und vermindert dessen Prozessierung zu den A β -Peptiden A β ₄₀ und A β ₄₂ (Andersen et al., 2005; Andersen et al., 2006; Offe et al., 2006). Für LRP1, das die Bildung von A β durch verstärkte Endozytose von APP begünstigt (Cam and Bu, 2006), wurde bisher nur eine indirekte Interaktion mit neuronalem APP₆₉₅ über Fe65 beschrieben (Trommsdorff et al., 1998). Weiterhin ist die SorLA-Expression in von der Krankheit betroffenen Gehirn-Regionen von Patienten, die an der spät-einsetzenden Form der Alzheimer Krankheit litten, vermindert (Offe et al., 2006; Dodson et al., 2006) und SorLA-defiziente Mäuse zeigen erhöhte Mengen A β (Andersen et al., 2005). SorLA wird durch die gleichen Sekretasen prozessiert wie APP und beide Intrazellulär-domänen sind die bisher einzigen, für die eine Proteolyse durch das Insulin-degradierende Enzym und nicht durch das Proteasom beschrieben wurde (diese Arbeit und Edbauer et al., 2002).

Nun stellt sich die Frage, wie die Prozessierung von SorLA in einen möglichen Zusammenhang mit der Sortierungsfunktion für APP gebracht werden kann. Einerseits kolokalisieren nur etwa 23% des zellulären SorLAs mit etwa 33% des zellulären APPs in SorLA-transfizierten HEK293-Zellen (Offe et al., 2006), sodass die restlichen SorLA-Moleküle eine Ligandenbinde- und Signalübertragungsfunktion ausführen könnten, womit die beiden Funktionen unabhängig voneinander wären (Abbildung 4.3 A). Weiterhin bestünde die Möglichkeit, dass beide Wege unabhängig voneinander in verschiedenen Zelltypen stattfinden.

Andererseits könnte die Prozessierung von SorLA auch funktionell bei der intrazellulären Sortierung von APP durch SorLA sein. Sollte SorLA im Komplex mit APP an die Plasmamembran gelangen, so könnte dort eine sequentielle Prozessierung von SorLA und/oder APP die Komplexe trennen (Abb. 4.3 B, rechts). Eine Liganden-Bindung an SorLA, gefolgt von einer Prozessierung, würde damit auch indirekt die

Prozessierung von APP beeinflussen. Außerdem könnte beispielsweise die von Hampe et al. (2000) gezeigte Rekrutierung von SorLA an die Plasmamembran nach Kopfaktivator-Stimulation gleichzeitig auch mehr APP an die Zelloberfläche bringen. Dieses stünde dann für eine weitere Prozessierung durch die α -Sekretase oder für eine Internalisierung, möglicherweise gefolgt von einer Prozessierung durch die β -Sekretase, zur Verfügung (Abb. 4.3 C). Andererseits wäre es jedoch auch möglich, dass SorLA als kompetitiver Inhibitor die Prozessierung von APP vermindert oder dass ein Heterodimer aus SorLA und APP aus stöchiometrischen Gründen vor einer Prozessierung geschützt ist (Abb. 4.3 B, links). Da SorLA nur eine geringe Endozytoserate zeigt (Gliemann et al., 2004), könnte die Prozessierung auch für eine Entfernung von SorLA oder dem C-terminalen Fragment von der Zelloberfläche verantwortlich sein.

Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Freisetzung von SorICD ein bisher nicht bestimmtes Signal in die Zelle vermittelt. Da auch für die Intra-zellulärdomäne von APP eine Signalaktivität postuliert wird (z.B. von Rotz et al., 2004), wird SorLA durch seine Sortierungsfunktion auch einen Einfluss auf die APP-Signalübertragung ausüben. Eine Aufklärung der APP-Funktion und einer zellulären Antwort auf eine Prozessierung von SorLA wird die Zusammenhänge besser verständlich machen. Dieses Verständnis ist eine Grundvoraussetzung für eine mögliche auf SorLA basierende Behandlungsstrategie der Alzheimer Krankheit und wird daher vermutlich in zukünftigen Experimenten genauer geklärt werden.



Vorherige Seite:

Abb. 4.3: Mögliche Zusammenhänge zwischen der Prozessierung und der Transportfunktion von SorLA

SorLA unterliegt einer Liganden-induzierten regulierten Intramembran-Proteolyse an der Plasmamembran. Gleichzeitig übernimmt es eine Sortierungsfunktion für das Amyloide Vorläuferprotein APP (siehe auch Abb.1.3). APP muss zuerst an die Plasmamembran gelangen, wo es einerseits auf dem nicht-amyloidogenen Weg prozessiert werden kann. Andererseits kann es internalisiert werden und in späten Endosomen der amyloidogenen Prozessierung unterliegen. Durch die Retardierung von APP im Golgi-Apparat durch SorLA kann APP nicht in die späten Endosomen gelangen. Ob diese Retardierung über SorLA durch verminderten Transport an die Plasmamembran oder per Rücktransport aus frühen Endosomen in den Golgi-Apparat vermittelt wird, ist bisher nicht klar. In dieser Abbildung soll über mögliche Zusammenhänge zwischen der Sortierungsfunktion und der Prozessierung von SorLA und APP spekuliert werden.

A) Die Sortierung von APP (links) und die Liganden-vermittelte Prozessierung (rechts) von SorLA geschehen unabhängig voneinander. **B)** Ein kleiner Teil der Komplexe aus SorLA und APP gelangt konstitutiv an die Plasmamembran. Eine Prozessierung des Komplexes könnte aus stöchiometrischen Gründen unterdrückt und dieser wieder in die Zelle aufgenommen werden. Von den frühen Endosomen würde dann ein Rücktransport in den Golgi-Apparat stattfinden (links). Andererseits könnte eine Liganden-vermittelte Prozessierung von SorLA die Komplexe trennen und eine Signalübertragung durch die Intrazellulärdomäne von SorLA in den Kern auslösen (rechts). APP wäre somit frei für eine nicht-amyloidogene Prozessierung als auch für eine Internalisierung. **C)** Die durch Liganden ausgelöste Rekrutierung von SorLA befördert auch mehr komplexiertes APP an die Plasmamembran. Der Komplex wird durch die Liganden-induzierte Prozessierung von SorLA zerstört. Das APP könnte internalisieren und, wenn es in den frühen Endosomen nicht erneut durch SorLA gebunden wird, im amyloiden Weg prozessiert werden (links). Alternativ könnten beide Komplexuntereinheiten abgebaut werden und jeweils ihr Signal weiterleiten, wenn ihre Intrazellulärdomänen nicht durch das Insulin-degradierende Enzym (IDE) abgebaut werden.

PM = Plasmamembran

ZUSAMMENFASSUNG

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Wege der Signaltransduktion durch den humanen Typ-I-Transmembranrezeptor SorLA untersucht. SorLA stellt aufgrund seiner Domänenverteilung ein Bindeglied zwischen der Familie der „Low Density Lipoprotein Rezeptoren“ und der Familie der Rezeptoren mit einer Vps10-Domäne dar. Es spielt eine Rolle beim Transport des Amyloiden Vorläuferproteins und vermindert dessen Prozessierung zu der pathogenen Komponente der Alzheimer Krankheit, dem Amyloid- β -Peptid (A β).

Ebenso wie das Amyloide Vorläuferprotein unterliegt SorLA einer sequentiellen Proteolyse durch eine α - und eine γ -Sekretase, wobei letztere einen Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne katalysiert und die Intrazellulärdomäne (SorICD) ins Zytoplasma entlässt. Die *in vitro*-Freisetzung der SorICD durch eine Aktivität der γ -Sekretase wurde in dieser Arbeit in speziellen Anreicherungsexperimenten nachgewiesen. Weiterhin wurde die Translokation der SorICD in den Zellkern untersucht. Da die freigesetzte SorICD, wie ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesen, rasch durch das Insulin-degradierende Enzym abgebaut wird, war nur an EGFP fusionierte SorICD in der Immunfluoreszenz direkt nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass SorICD als EGFP-Fusionsprotein in der Lage ist, in den Zellkern zu gelangen. In diesem Zusammenhang wurde ein System etabliert, mit dem die Fluoreszenz des EGFP direkt in SDS-Gelen untersucht werden kann.

Die oben beschriebene sequentielle Proteolyse von SorLA kann durch die Bindung des Neuropeptides Kopfaktivator ausgelöst werden. Somit unterliegt SorLA einer regulierten Intramembranproteolyse. Ob die Bindung von Kopfaktivator zusätzlich eine Phosphorylierungskaskade innerhalb von SorLA-exprimierenden Zellen auslöst, wurde mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht, führte aber zu keinem positiven Resultat. Eine bereits postulierte mitogene Wirkung von Kopfaktivator auf diese Zellen konnte per Doppelbestimmung von DNA-Gehalt und mitosespezifisch-phosphoryliertem Histon H3 in der Durchflusszytometrie und mittels eines indirekten Proliferationsversuchs mit alamarBlue nicht bestätigt werden.

In weiteren Versuchen wurden EGFP-Multimere, deren Molekulargewichte über dem Diffusionslimit in den Kern liegen, auf ihre Eignung als Fusionspartner für Kernlokalisationsstudien geprüft. Hintergrund war die Tatsache, dass monomeres EGFP auch ohne Fusionspartner im Kern zu finden ist. Ein tetrameres EGFP zeigte dagegen eine schwächere Kern- als Zytoplasmalokalisation und eignet sich daher besser als monomeres EGFP für zukünftige Kernlokalisationsstudien.

LITERATUR

6. Literatur

1. Allinson TMJ, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of Neuroscience Research* 74: 342-352.
2. Andersen OM, Petersen HH (2003) New light on a long-known protein family. *ChemBiochem: an European journal of chemical biology* 4: 1137-1146.
3. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CAF, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE (2005) Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 13461-13466.
4. Andersen OM, Schmidt V, Spoelgen R, Gliemann J, Behlke J, Galatis D, McKinstry WJ, Parker MW, Masters CL, Hyman BT, Cappai R, Willnow TE (2006) Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry* 45: 2618-2628.
5. Andersen OM, Willnow TE (2006) Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences* 29: 687-694.
6. Anliker B, Müller U (2006) The Functions of Mammalian Amyloid Precursor Protein and Related Amyloid Precursor-Like Proteins. *Neurodegenerative Diseases* 3: 239-246.
7. Beffert U, Stolt PC, Herz J (2004) Functions of lipoprotein receptors in neurons. *Journal of Lipid Research* 45: 403-409.
8. Bernstein HG, Ansorge S, Riederer P, Reiser M, Frolich L, Bogerts B (1999) Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques. *Neuroscience Letters* 263: 161-164.
9. Bianchi S, Dotti MT, Federico A (2006) Physiology and pathology of Notch signalling system. *Journal of Cellular Physiology* 207: 300-308.
10. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368: 387-403.
11. Bodenmüller H, Roberge M (1985) The head activator: Discovery, characterisation, immunoassays and biological properties in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 825: 261-267.
12. Bodenmüller H, Schaller HC (1981) Conserved Amino-Acid-Sequence of A Neuropeptide, the Head Activator, from Coelenterates to Humans. *Nature* 293: 579-580.
13. Bodenmüller H, Schilling E, Zachmann B, Schaller HC (1986) The Neuropeptide Head Activator Loses Its Biological-Activity by Dimerization. *EMBO Journal* 5: 1825-1829.
14. Böhm C (2005) Signaltransduktion des humanen Neuropeptidrezeptors SorLA - Gamma-Secretase-abhängige Freisetzung der Intrazellulärdomäne des Transmembranrezeptors SorLA. *Dissertation*

15. Bohm C, Seibel NM, Henkel B, Steiner H, Haass C, Hampe W (2006) SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 281: 14547-14553.
16. Bottenstein JE, Sato GH (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 514-517.
17. Bradford MM (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
18. Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 678-689.
19. Bu G (2001) The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family. *International review of cytology* 209: 79-116.
20. Bu G, Schwartz AL (1998) RAP, a novel type of ER chaperone. *Trends in Cell Biology* 8: 272-276.
21. Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, Prochiantz A (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131: 2173-2181.
22. Cam J, Bu G (2006) Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. *Molecular Neurodegeneration* 1: 8.
23. Cao X, Sudhof TC (2001) A Transcriptionally [Correction Of Transcriptively] Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115-120.
24. Cao XW, Sudhof TC (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *Journal of Biological Chemistry* 279: 24601-24611.
25. Carey R, Balcz B, Lopez-Coviella I, Slack B (2005) Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biology* 6: 30.
26. Chen W-J, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* 265: 3116-3123.
27. Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987) Electroporation for the Efficient Transfection of Mammalian-Cells with Dna. *Nucleic Acids Research* 15: 1311-1326.
28. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericakvance MA (1993) Gene Dose of Apolipoprotein-e Type-4 Allele and the Risk of Alzheimers-Disease in Late-Onset Families. *Science* 261: 921-923.
29. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398: 518-522.

30. Dicou E, Vincent JP, Mazella J (2004) Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *Journal of Neuroscience Research* 78: 92-99.
31. Dodson SE, Gearing M, Lippa CF, Montine TJ, Levey AI, Lah JJ (2006) LR11/SorLA Expression Is Reduced in Sporadic Alzheimer Disease but not in Familial Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65: 866-872.
32. Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, Saint Andrieu P, Fang LY, Freedman SB, Folmer B, Goldbach E, Holsztynska EJ, Hu KL, Johnson-Wood KL, Kennedy SL, Kholodenko D, Knops JE, Latimer LH, Lee M, Liao Z, Lieberburg IM, Motter RN, Mutter LC, Nietz J, Quinn KP (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *Journal of Neurochemistry* 76: 173-181.
33. Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Journal of Biological Chemistry* 277: 13389-13393.
34. Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nature Cell Biology* 5: 486-488.
35. Ehrmann M, Clausen T (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism *Annual Review of Genetics* 38: 709-724.
36. Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM, Thompson JC (1994) The Human Carcinoid Cell-Line, Bon - A Model System for the Study of Carcinoid-Tumors. *Molecular and Cell Biological Aspects of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Disease* 733: 393-406.
37. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4162-4167.
38. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ (2004) Partial Loss-of-Function Mutations in Insulin-Degrading Enzyme that Induce Diabetes also Impair Degradation of Amyloid {beta}-Protein. *American Journal of Pathology* 164: 1425-1434.
39. Feldherr CM, Akin D (1997) The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *Journal of Cell Science* 110: 3065-3070.
40. Fenteany G, Schreiber SL (1998) Lactacystin, Proteasome Function, and Cell Fate. *Journal of Biological Chemistry* 273: 8545-8548.
41. Genove G, Glick BS, Barth AL (2005) Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins. *Biotechniques* 39: 814.
42. Gliemann J, Hermey G, Nykjaer A, Petersen CM, Jacobsen C, Andreasen PA (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. *Biochemical Journal* 381: 203-212.
43. Gonias SL, Wu LH, Salicioni AM (2004) Low density lipoprotein receptor-related protein: regulation of the plasma membrane proteome. *Thrombosis and Haemostasis* 91: 1056-1064.
 44. Grimm MO, Grimm HS, Patzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschape JA, De Strooper B, Müller U, Shen J, Hartmann T (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nature Cell Biology* 7: 1118-1123.
 45. Guo L, Eisenman JR, Mahimkar RM, Peschon JJ, Paxton RJ, Black RA, Johnson RS (2002) A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases. *Molecular & Cellular Proteomics* 1: 30-36.
 46. Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, Brou C, Logeat F, Six E, Ciechanover A, Israel A (2001) Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 276: 34371-34378.
 47. Haass C (2004) Take five - BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO Journal* 23: 483-488.
 48. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) Beta-Amyloid Peptide and A 3-Kda Fragment Are Derived by Distinct Cellular Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 268: 3021-3024.
 49. Hampe W, Rezgaoui M, Hermans-Borgmeyer I, Schaller HC (2001) The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons. *Human Genetics* 108: 529-536.
 50. Hampe W, Riedel IB, Lintzel J, Bader CO, Franke I, Schaller HC (2000) Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *Journal of Cell Science* 113: 4475-4485.
 51. Hampe W, Urny J, Franke I, Hoffmeister-Ullerich SAH, Herrmann D, Petersen CM, Lohmann J, Schaller HC (1999) A head-activator binding protein is present in hydra in a soluble and a membrane-anchored form. *Development* 126: 4077-4086.
 52. Hanahan D (1985) Techniques for transformation of E. coli. In: DNA Cloning 1: A Practical Approach Core Techniques (D.M.Glover BDH, ed), pp 109-135. IRL Press, Oxford.
 53. Harris-White ME, Frautschy SA (2005) Low Density Lipoprotein Receptor-Related Proteins (LRPs), Alzheimer's and Cognition. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders* 4: 469-480.
 54. Hassan AJ, Zeng JB, Ni XY, Morales CR (2004) The trafficking of prosaposin (SGP-1) and GM(2)AP to the lysosomes of TM4 sertoli cells is mediated by sortilin and monomeric adaptor proteins. *Molecular Reproduction and Development* 68: 476-483.
 55. Hermans-Borgmeyer I, Hampe W, Schinke B, Methner A, Nykjaer A, Susens U, Fenger U, Herbarth B, Schaller HC (1998) Unique expression pattern of a novel mosaic receptor in the developing cerebral cortex. *Mechanisms of Development* 70: 65-76.

56. Hermey G, Sjogaard SS, Petersen CM, Nykjaer A, Gliemann J (2006) Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochemical Journal* 395: 285-293.
57. Herz J (2001) The LDL receptor gene family: (Un)expected signal transducers in the brain. *Neuron* 29: 571-581.
58. Herz J, Strickland DK (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *Journal of Clinical Investigation* 108: 779-784.
59. Horton P, Nakai K (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proceedings of the International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 5: 147-152.
60. Jackman J, O'Connor M (2001) Cell Cycle Analysis - Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. In: *Current Protocols in Cell Biology - Online-Edition* (Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincott-Schwartz J, Yamada KM, eds), John Wiley & Sons, Inc.
61. Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, Petersen CM (2001) Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22788-22796.
62. Jacobsen L, Madsen P, Moestrup SK, Lund AH, Tommerup N, Nykjaer A, Sottrup-Jensen L, Gliemann J, Petersen CM (1996) Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha(2)-macroglobulin receptor-associated protein. *Journal of Biological Chemistry* 271: 31379-31383.
63. Jacobsen L, Madsen P, Nielsen MS, Geraerts WPM, Gliemann J, Smit AB, Petersen CM (2002) The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and-2 and defines minimum requirements for GGA binding. *FEBS Letters* 511: 155-158.
64. Jung KM, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R, Kim PK, Kim DS, Ryu SH, Chao MV, Kim TW (2003) Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278: 42161-42169.
65. Kaether C, Schmitt S, Willem M, Haass C (2006) Amyloid Precursor Protein and Notch Intracellular Domains are Generated after Transport of their Precursors to the Cell Surface. *Traffic* 7: 408-415.
66. Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC (2003) Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *Journal of Neuroscience* 23: 5425-5436.
67. Kayser ST, Ulrich H, Schaller HC (1998) Involvement of a Gardos-type potassium channel in head activator-induced mitosis of BON cells. *European Journal of Cell Biology* 76: 119-124.
68. Kester HA, Blanchetot C, den Hertog J, van der Saag PT, van der Burg B (1999) Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine

- zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *Journal of Biological Chemistry* 274: 27439-27447.
69. Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ (2001) The Intracellular Domain of the beta -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner. *Journal of Biological Chemistry* 276: 40288-40292.
 70. Kinoshita A, Shah T, Tangredi MM, Strickland DK, Hyman BT (2003) The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe65. *Journal of Biological Chemistry* 278: 41182-41188.
 71. Komuro A, Nagai M, Navin NE, Sudol M (2003) WW Domain-containing Protein YAP Associates with ErbB-4 and Acts as a Co-transcriptional Activator for the Carboxyl-terminal Fragment of ErbB-4 That Translocates to the Nucleus. *Journal of Biological Chemistry* 278: 33334-33341.
 72. Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence That Production and Release of Amyloid Beta-Protein Involves the Endocytic Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 269: 17386-17389.
 73. Kopan R, Nye JS, Weintraub H (1994) The Intracellular Domain of Mouse Notch - A Constitutively Activated Repressor of Myogenesis Directed at the Basic Helix-Loop-Helix Region of MyoD. *Development* 120: 2385-2396.
 74. Kozak M (1995) Adherence to the First-Aug Rule When A Second Aug Codon Follows Closely Upon the First. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2662-2666.
 75. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227: 680-685
 76. Lammich S, Okochi M, Takeda M, Kaether C, Capell A, Zimmer AK, Edbauer D, Walter J, Steiner H, Haass C (2002) Presenilin-dependent Intramembrane Proteolysis of CD44 Leads to the Liberation of Its Intracellular Domain and the Secretion of an Abeta -like Peptide. *Journal of Biological Chemistry* 277: 44754-44759.
 77. Landman N, Kim TW (2004) Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15: 337-351.
 78. Lefrancois S, Zeng JB, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO Journal* 22: 6430-6437.
 79. Lewis J (1998) Notch signalling - A short cut to the nucleus. *Nature* 393: 304-305.
 80. Lichtenthaler SF (2006) Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein: cellular control mechanisms and novel modifiers. *Neurodegenerative Diseases* 3: 262-269.
 81. Lintzel J, Riedel IB, Franke I, Schaller HC, Hampe W (2002) Characterization of the VPS10 domain of sorLA/LR11 as binding site for the neuropeptide head activator. *Biological Chemistry* 383: 1727-1733.

82. Lleo A, Waldron E, von Arnim CAF, Herl L, Tangredi MM, Peltan ID, Strickland DK, Koo EH, Hyman BT, Pietrzik CU, Berezovska O (2005) Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase. *Journal of Biological Chemistry* 280: 27303-27309.
83. Macara IG (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 570-594.
84. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao ZP, Wisniewski T, Robakis NK (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO Journal* 21: 1948-1956.
85. Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1 is an element of cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1FAD mutations. *Cell* 114: 635-645.
86. Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E, Emr SD (1994) The Sorting Receptor for Yeast Vacuolar Carboxypeptidase-y Is Encoded by the Vps10 Gene. *Cell* 77: 579-586.
87. Markus SM, Taneja SS, Logan SK, Li W, Ha S, Hittelman AB, Rogatsky I, Garabedian MJ (2002) Identification and Characterization of ART-27, a Novel Coactivator for the Androgen Receptor N Terminus. *Molecular Biology Of The Cell* 13: 670-682.
88. May P, Reddy YK, Herz J (2002) Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *Journal of Biological Chemistry* 277: 18736-18743.
89. McCarthy RA, Argraves WS (2003) Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *Journal of Cell Science* 116: 955-960.
90. McLendon C, Xin T, Ziani-Cherif C, Murphy MP, Findlay KA, Lewis PA, Pinnix I, Sambamurti K, Wang R, Fauq A, Golde TE (2000) Cell-free assays for {gamma}-secretase activity. *FASEB Journal* 14: 2383-2386.
91. Mezyk R, Bzowska M, Bereta J (2003) Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Acta biochimica Polonica* 50: 625-645.
92. Minopoli G, de Candia P, Bonetti A, Faraonio R, Zambrano N, Russo T (2001) The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 6545-6550.
93. Motoi Y, Aizawa T, Haga S, Nakamura S, Namba Y, Ikeda K (1999) Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Research* 833: 209-215.
94. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian XL, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Molecular Cell* 5: 197-206.

95. Munck A (2004) Identifizierung und Charakterisierung intrazellulärer Bindungspartner des Transmembranrezeptors SorLA. *Dissertation*.
96. Nagano O, Saya H (2004) Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Science* 95: 930-935.
97. Nakamura M, Yamada M, Ohsawa T, Morisawa H, Nishine T, Nishimura O, Toda T (2006) Phosphoproteomic profiling of human SH-SY5Y neuroblastoma cells during response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1763: 977-989.
98. Navarro V, Martin S, Sarret P, Nielsen MS, Petersen CM, Vincent JP, Mazella J (2001) Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Letters* 495: 100-105.
99. Ni X, Canuel M, Morales CR (2006) The sorting and trafficking of lysosomal proteins. *Histology and Histopathology* 21: 899-913.
100. Nyborg A, Ladd T, Zwizinski C, Lah J, Golde T (2006) Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Molecular Neurodegeneration* 1: 3.
101. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427: 843-848.
102. Nykjaer A, Willnow TE (2002) The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends in Cell Biology* 12: 273-280.
103. Oberg C, Li JH, Pauley A, Wolf E, Gurney M, Lendahl U (2001) The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian sel-10 homolog. *Journal of Biological Chemistry* 276: 35847-35853.
104. Offe K, Dodson SE, Shoemaker JT, Fritz JJ, Gearing M, Levey AI, Lah JJ (2006) The Lipoprotein Receptor LR11 Regulates Amyloid beta Production and Amyloid Precursor Protein Traffic in Endosomal Compartments. *Journal of Neuroscience* 26: 1596-1603.
105. Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tani H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C (2002) Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO Journal* 21: 5408-5416.
106. Parent AT, Barnes NY, Taniguchi Y, Thinakaran G, Sisodia SS (2005) Presenilin Attenuates Receptor-Mediated Signaling and Synaptic Function. *Journal of Neuroscience* 25: 1540-1549.
107. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Roigaard H, Gliemann J, Madsen P, Moestrup SK (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 272: 3599-3605.
108. Pinnix I, Musunuru U, Tun H, Sridharan A, Golde T, Eckman C, Ziani-Cherif C, Onstead L, Sambamurti K (2001) A Novel gamma -Secretase Assay Based on Detection of the

- Putative C-terminal Fragment-gamma of Amyloid beta Protein Precursor. *Journal of Biological Chemistry* 276: 481-487.
109. Rebeck GW, LaDu M, Estus S, Bu G, Weeber E (2006) The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. *Molecular Neurodegeneration* 1: 15.
 110. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 111. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, Teplow DB, Haass C (2001) Presenilin dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Reports* 2: 835-841.
 112. Schaller HC, Druffelaugustin S, Dubel S (1989a) Head Activator Acts As An Autocrine Growth-Factor for Nh15-Ca2 Cells in the G2/Mitosis Transition. *EMBO Journal* 8: 3311-3318.
 113. Schaller HC, Hoffmeister SAH, Dubel S (1989b) Role of the Neuropeptide Head Activator for Growth and Development in Hydra and Mammals. *Development* 107: 99-107.
 114. Schawaller M, Schenck K, Hoffmeister SAH, Schaller H, Schaller HC (1988) Production and Characterization of Monoclonal-Antibodies Recognizing Head Activator in Precursor Form and Immunocytochemical Localization of Head Activator Precursor and Head Activator Peptide in the Neural Cell-Line Nh15-Ca2 and in Hydra. *Differentiation* 38: 149-160.
 115. Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang GF, Heilman C, Schaller C, Bujo H, Levey AI, Lah JJ (2004) Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 61: 1200-1205.
 116. Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393: 382-386.
 117. Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and presenilin: Regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual Review of Neuroscience* 26: 565-597.
 118. Seta KA, Roth RA (1997) Overexpression of Insulin Degrading Enzyme: Cellular Localization and Effects on Insulin Signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231: 167-171.
 119. Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, Sudhof T, Yu G (2005) Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122: 435-447.
 120. Shen Y, Joachimiak A, Rich Rosner M, Tang WJ (2006) Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature* 443: 870-874.
 121. Sheng Z, Lewis JA, Chirico WJ (2004) Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *Journal of Biological Chemistry* 279:40153-60.
 122. Spoelgen R, von Arnim CAF, Thomas AV, Peltan ID, Koker M, Deng A, Irizarry MC, Andersen OM, Willnow TE, Hyman BT (2006) Interaction of the cytosolic domains of

- sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *Journal of Neuroscience* 26: 418-428.
123. Struhl G, Adachi A (2006) Requirements for Presenilin-Dependent Cleavage of Notch and Other Transmembrane Proteins. *Molecular Cell* 6: 625-636.
 124. Sun MK, Alkon DL (2006) Links between Alzheimer's disease and diabetes. *Drugs Today (Barc)* 42: 481-489.
 125. Taira K, Bujo H, Hirayama S, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Ishii I, Miida T, Schneider WJ, Saito Y (2001) LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21: 1501-1506.
 126. Thilakawardhana S, Everett DM, Murdock PR, Dingwall C, Owen JS (2005) Quantification of apolipoprotein E receptors in human brain-derived cell lines by real-time polymerase chain reaction. *Neurobiology of Aging* 26: 813-823.
 127. Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 496-505.
 128. Tooyama I, Kawamata T, Akiyama H, Kimura H, Moestrup SK, Gliemann J, Matsuo A, McGeer PL (1995) Subcellular-Localization of the Low-Density-Lipoprotein Receptor-Related Protein (Alpha(2)-Macroglobulin Receptor) in Human Brain. *Brain Research* 691: 235-238.
 129. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
 130. Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999) Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97: 689-701.
 131. Trommsdorff R, Borg JP, Margolis B, Herz J (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 273: 33556-33560.
 132. Ulrich H, Tarnok A, Schaller HC (1996) Head-activator induced mitosis of NH15-CA2 cells requires calcium influx and hyperpolarization. *Journal of Physiology-Paris* 90: 85-94.
 133. Van Uden E, Sagara Y, Van Uden J, Orlando R, Mallory M, Rockenstein E, Masliah E (2000) A protective role of the low density lipoprotein receptor-related protein against amyloid beta-protein toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 275: 30525-30530.
 134. Van Vugt MATM, van de Weerd BCM, Vader G, Janssen H, Calafat J, Klomp R, Wolthuis RMF, Medema RH (2004) Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *Journal of Biological Chemistry* 279: 36841-36854.
 135. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller L, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere

- AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741.
136. Vetrivel KS, Thinakaran G (2006) Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 66: S69-S73.
137. Von Arnim CAF, Spoelgen R, Peltan ID, Deng M, Courchesne S, Koker M, Matsui T, Kowa H, Lichtenthaler SF, Irizarry MC, Hyman BT (2006) GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing. *Journal of Neuroscience* 26: 9913-9922.
138. Von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *Journal of Cell Science* 117: 4435-4448.
139. Waldron E, Jaeger S, Pietrzik CU (2006) Functional Role of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein in Alzheimer's Disease. *Neurodegenerative Diseases* 3: 233-238.
140. Weihofen A, Martoglio B (2003) Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends in Cell Biology* 13: 71-78.
141. Westergaard UB, Sorensen ES, Hermeij G, Nielsen MS, Nykjaer A, Kirkegaard K, Jacobsen C, Gliemann J, Madsen P, Petersen CM (2004) Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *Journal of Biological Chemistry* 279: 50221-50229.
142. Wolfe MS (2006) The Gamma-Secretase Complex: Membrane-Embedded Proteolytic Ensemble. *Biochemistry* 45: 7931-7939.
143. Wolfe MS, Kopan R (2004) Intramembrane Proteolysis: Theme and Variations. *Science* 305: 1119-1123.
144. Xu B, Kim ST, Kastan MB (2001) Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Molecular and Cellular Biology* 21: 3445-3450.
145. Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y (1996) Elements of Neural Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor Are Present in a Novel Mammalian Low Density Lipoprotein Receptor Family Member. *Journal of Biological Chemistry* 271: 24761-24768.
146. Yang F, Moss LG, Phillips GN (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 14: 1246-1251.
147. Ye S, Huang Y, Mullendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW (2005) Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid {beta} peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18700-18705.
148. Zhu YJ, Bujo H, Yamazaki H, Ohwaki K, Jiang MZ, Hirayama S, Kanaki T, Shibasaki M, Takahashi K, Schneider WJ, Saito Y (2004) LR11, an LDL receptor gene family member, is a novel regulator of smooth muscle cell migration. *Circulation Research* 94: 752-758.

ANHANG

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abb. 1.1: Schematischer Vergleich der Strukturmerkmale von SorLA und verwandten Typ-I-Transmembranrezeptoren	3
Abb. 1.2: Prozessierung des Amyloiden Vorläuferproteins APP	11
Abb. 1.3: Modell der Sortierung von APP durch SorLA und LRP	13
Abb. 1.4: Prozessierung von SorLA	18

2. Material und Methoden

Abb. 2.1: In dieser Arbeit überexprimierte SorLA-Proteine/-fragmente	29
---	----

3. Ergebnisse

Abb. 3.1: Immunfluoreszenzfärbung von NT2-Zellen zur Prüfung der in der Durchflusszytometrie eingesetzten Markierung mitotischer Zellen	47
Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils der mitotischen Zellen einer Population	48
Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Analyse von synchronisierten NT2-Zellen	49
Abb. 3.4: Der Anteil mitotischer Zellen nach KA-Behandlung von NT2-Zellen	50
Abb. 3.5: Proliferationstest mit alamarBlue nach KA-Behandlung	52
Abb. 3.6: Phosphoproteinfärbung nach 2-dimensionaler Auftrennung von KA-behandelten Proben	55
Abb. 3.7: 2-dimensionale Auftrennung von DIGE-markierten Proben	57
Abb. 3.8: Die Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT in SorLA-überexprimierenden Zellen	60
Abb. 3.9: Die Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT in endogen SorLA-exprimierenden Zellen	62
Abb. 3.10: <i>In vitro</i> -Generation von SorICD durch die Gamma-Sekretase	63
Abb. 3.11: Immunfluoreszenz von SorLA in überexprimierenden HEK293- und endogen-exprimierenden NT2-Zellen	66
Abb. 3.12: Kotransfektion von MetSorICD mit EGFP in BON-Zellen	68
Abb. 3.13: Lokalisationsstudie mit EGFP-gekoppelter SorICD	70
Abb. 3.14: GFP-Multimere diffundieren in den Zellkern	73
Abb. 3.15: SorICD mit C-terminalem EGFP	75
Abb. 3.16: Abbau der SorICD durch NT2- und BON-Zytoplasmaproteine	77
Abb. 3.17: SorICD-Abbau durch das Insulin-degradierende Enzym (IDE)	79
Abb. 3.18: Vergleich der degradierenden Aktivitäten in Plasma aus HEK293-, IDE-WT- und IDE-Mut-Zellen	80
Abb. 3.19: Inhibition der SorICD-abbauenden Aktivität	81
Abb. 3.20: Expression von SorLA-Volllänge in IDE-Zellen	83
Abb. 3.21: Auswirkung der Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT in SorLA-überexprimierenden Zellen mit und ohne aktives IDE	85

4. Diskussion

Abb. 4.1: Schnittstellen der Sekretasen in verschiedenen Typ-I-Transmembranproteinen	94
Abb. 4.2: Signaltransduktion durch SorLA	105
Abb. 4.3: Mögliche Zusammenhänge zwischen der Prozessierung und der Transportfunktion von SorLA	109

Proteinsequenz von humanem SorLA im Ein-Buchstaben-Code

- Laut Genbankeintrag Q92673 -

1 matrssrres rl pfl ftl va ll ppgal cev wtqrl hggsa pl pqdrgfl v vqgdprel rl
61 wargdargas radekpl **rrk r**saal qpepi kvygqvsI nd shnqmvvhwa geksnvi val
121 ardsl al arp kssdvvvsyd ygksfkki sd kl nfgl gnrs eavi aqfyhs padnkryi fa
181 dayaqyl wi t fdfcntl qgf si pfraadll l hskasnl ll gfd rshpnkq l wksddfgqt
241 wi mi qehvks fswgi dpydk pnti yi erhe psgystvfrs tdfqsrnq evi l eevrdf
301 ql rdkymfat kvvhl l gseq qssvql wvsf grkpmraaqf vtrhpi neyy i adasedqv
361 vcvshsnrt nl yi seaegl kfsl sl envl yyspggagsd tl vryfanep fadfhrvegl
421 qgvyi atli n gsmneenmrs vi tfdkggtw efl qapaftg ygeki ncel s qgcsI hl aqr
481 l sql l nl ql r rmpi l skesa pgl i i atgsv gknl asktnv yi sssagarw real pgphy
541 twgdhggi i t ai aqgmetne l kystneget wktfi fsekp vfvygl l tep gekstvf t i f
601 gsnkenvhsw l l l qvnatda l gvpctendy kl wpsdserg necl l ghktv fkr r t phatc
661 fngedfd rpv vvsncsctre dyecdfgfk m sedl sl evcv pdpefsgksy sppvpcpvgs
721 tyrrtrgyrk i sgd tcsggd vearl egel v pcpl aeenef i l yavrksi y rydl asgate
781 ql pl tgl raa val dfdyehn cl ywsd l al d vi qrl cl ngs tgqevi i nsg l etveal afe
841 pl sql l ywvd agfkki evan pdgdfrl ti v nssvl drpra l vl vpqegvm fwtwdgdl kp
901 gi yrsnmdgs aayhl vsedv kwpngi svdd qwi ywtdayl eci eri tfsg qqrsvi l dnl
961 phpyai avfk nei ywddwsq l si fraskys gsqmei l anq l tgl mdmki f ykgkntgsna
1021 cvprpcsl l c l pkannsrsc rcpedvssv l psgdl mc dc pqgyql knnt cvkeentcl r
1081 ngyrcsngnc i nsi wwcdfd ndcgmsder ncptti cdl d tqfrcqesgt ci pl sykcdl
1141 eddcgdn sde shcemhqcrs deyn c ssgm c i r sswvcdgd ndcrdwsdea nctai yhtce
1201 asnfqcrngh ci pqrwacd g dtdcqdg sde dpvncekkcn gfrcpngtci psskhcdgl r
1261 dcsdgsdeqh cepl cthfmd fvcknrqqcl fhsmvcdgi i qcrdgsdeda afagcsqdpe
1321 fhkvcdefgf qcqngvci sl i wkcdgmddc gdysdeance npteapncsr yf qfrcengh
1381 ci pnrwkcd r endcgdwsde kdcgdshi l p fstpgpstcl pnyyrcssgt cvmdtwvcdg
1441 yr d cadgsde eacpl l anvt aastptql gr cdrfefechq pktci pnwkr cdghqdcqd g
1501 rdeancpths tl tcmsrefq cedgeaci vl sercdgfl dc sdesdekacs del tvykvqn
1561 l qwtad fsgd vtl twmrpkk mpsascvynv **yyrvvgesi w** ktl ethsnkt ntv l kv l kpd
1621 **ttyqvkvqvq** cl skahntnd fv t l r tpegl pdaprnl ql s l preaegvi v ghwappi hth
1681 **gl i reyi vey** srs gskmwas qraasnftei knl l vnt l yt vrvaavtsrg i gnwsdsksi
1741 **t ti kgkvi pp** pdi hi dsyge nyl sftl tme sdi kvngyv v nl fwaf dthk qerrtl nfrg
1801 **si l shkvgnl** tahtsy ei sa waktdl gdsp l afehvmtrg vrppapsl ka kai nqtavec
1861 twtgrnvvvy gi fyatsfl d l yrnpsk l tt sl hntkvi vs kdeqyl fl vr vvvpyqgpss
1921 dyvvvkmi pd srl pprhl hv vhtgktsvvi kwespydspd qdl l yai avk dl i rkt drsy
1981 kvksrnstve ytl nkl epgg kyhi i vql gn mskdssi ki t tvsl sapdal ki i tendhvl
2041 l fwksl al ke khfnesrgye i hmfdsamni tayl gnttdn ffki snl kmg hnytftvqar
2101 cl fgnqi cge pai l l ydel g sgadasatqa arstdvaavv vpi l fl i l l s l gvgfai l y t
2161 **khrrl qssft** **afansh** **ysr** l qsal fssgd dl geddedap **mi tqfsddvp** **mvi a**

Dunkelrot: Furin-Erkennungssequenz; **Gelb hinterlegt:** α -SorLa F3 Epitop;

Grau hinterlegt: Transmembransequenz; **Blau hinterlegt:** Kernlokalisierungssignal;

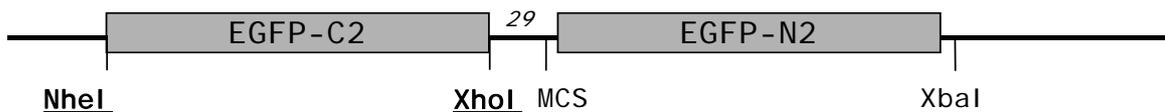
Oliv hinterlegt: Internalisierungssignal; **Grün hinterlegt:** α -SorLa cp Epitop;

Unterstrichen: SorLA-CTF*-Sequenz; *Kursiv:* MetSorICD-Sequenz (statt I und L jedoch M und V am N-Terminus); **Gelbe Buchstaben:** GGA-Bindesequenz

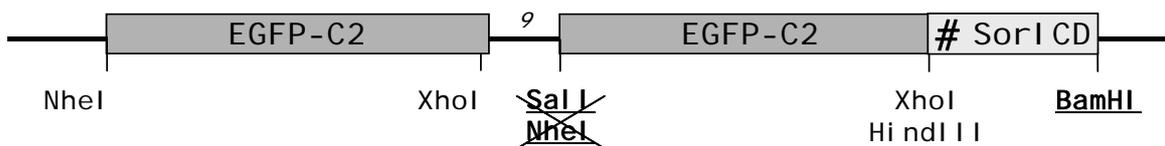
Plasmidkarten

Die folgenden Plasmidkarten sollen eine Übersicht über die zur jeweiligen Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen geben (unterstrichen). Schnittstellen, die durch eine Klenow-Fragment-Auffüllreaktion verloren gegangen sind sowie mutierte Stop-Codons sind durchgestrichen. Die Anzahl der Aminosäurecodons, die die Untereinheiten verbinden, ist jeweils angegeben. Die dargestellten Längenverhältnisse stimmen nicht mit den exakten auf der Zahl der Basen beruhenden Längenverhältnissen überein.

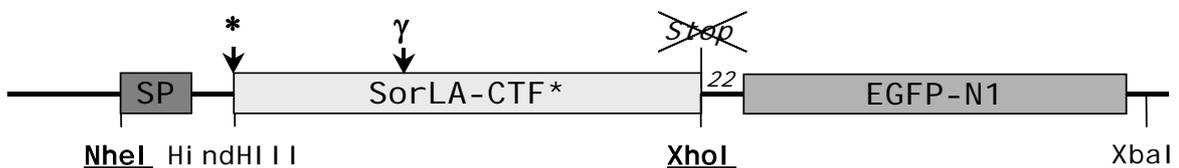
pDEGFP



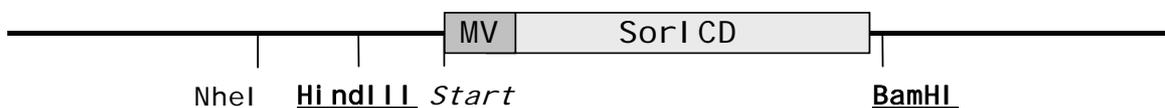
pDEGFP- (Mut) SorI CD



pCTF*EGFP



pMetSorI CD



- # kodiert für das potentielle Kernlokalisierungssignal (in pDEGFP-MutSorICD mutiert)
- * kennzeichnet die Stelle des freien N-Terminus im translatierten Protein nach Abspaltung des SP. Dadurch soll ein Schnitt der α -Sekretase simuliert werden. Die Position wurde anhand von Erfahrungswerten in anderen Proteinen willkürlich festgelegt.
- γ kennzeichnet die Region, in der im Fusionsproteins die Prozessierung durch die γ -Sekretase stattfindet
- MCS Multiple Cloning Site
- Start Kozaksequenz mit Methionin- (M) und Valincodon (V)
- SP Signalpeptidsequenz zur Translokation des Proteins ins ER

Herstellerverzeichnis

Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht KG D-97647 Sondheim http://www.hecht-assistent.de/	Cambrex Corporation One Meadowlands Plaza East Rutherford, New Jersey 07073 USA www.cambrex.com	Fermentas GmbH (MBI Fermentas) Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot http://www.fermentas.de
BD Biosciences 2350 Qume Drive San Jose, CA 95131 USA http://www.bdbiosciences.com/index.shtml	Canon Deutschland GmbH Europark Fichtenhain A10 D-47807 Krefeld www.canon.de	Fluka Vertrieb über Sigma-Aldrich
Beckman Coulter GmbH Europark Fichtenhain B13 D-47807 Krefeld www.beckmancoulter.com	Carl Roth GmbH + Co. KG Schoemperlenstr. 3-5 D-76185 Karlsruhe www.carlroth.de	Fritz Gössner GmbH & Co. KG Medizin- & Labortechnik Sperberhorst 23 D-22459 Hamburg
BINDER GmbH Im Mittleren Ösch 5 D-78532 Tuttlingen http://www.binder-world.com/	Carl Zeiss AG Carl-Zeiss-Str. 22 D-73447 Oberkochen www.zeiss.de	FUJIFILM Europe GmbH Heesenstrasse 31 D-40549 Düsseldorf http://www.fujifilm.de/
Biometra GmbH i. L. Rudolf-Wissell-Straße 30 D-37079 Goettingen www.biometra.com	Clontech Laboratories, Inc. 1290 Terra Bella Avenue Mountain View, CA 94043 USA www.clontech.com/clontech/	GE Healthcare Europe GmbH Munich Commercial Center Oskar-Schlemmer-Str.11 D-80807 München http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/germany_homepage
Biomol GmbH Waidmannstr. 35 D-22769 Hamburg www.biomol.de	Corel Deutschland Edisonstraße 6 D-85716 Unterschleißheim www.corel.com	ICN Biomedicals GmbH Thüringer Strasse 15 D-Eschwege www.icnbiomed.com
Bio-Rad Laboratories GmbH Heidemannstrasse 164 Postfach 45 01 33 D-80901 München www.bio-rad.com	DNASTAR, Inc. 3801 Regent Street Madison, WI 53705 USA www.dnastar.com	IKA® Werke GmbH & Co. KG Janke & Kunkel-Str. 10 D-79219 Staufen http://www.ika.de/ika/home.html
Biozym Diagnostik GmbH Postfach D-31833 Hessisch Oldendorf www.biozym.com	Engelbrecht-Medizin- und Labortechnik GmbH Tiefenbachweg 13 D-34295 Edermünde www.engelbrecht.de	ImageJ Wayne Rasband National Institutes of Health USA http://rsb.info.nih.gov/ij/
Branson 41 Eagle Rd., P.O. Box 1961 Danbury, CT 06813-1961 USA www.bransonultrasonics.com	Eppendorf Barkhausenweg 1 D-22339 Hamburg www.eppendorf.de	Infors HT Rittergasse 27 CH-4103 Bottmingen Schweiz http://www.infors-ht.com/

<p>INTEGRA Biosciences GmbH Ruhberg 4 D-35463 Fernwald www.integra-biosciences.de</p>	<p>Mettler-Toledo GmbH Ockerweg 3 D-35353 Giessen http://de.mt.com/home</p>	<p>Promega GmbH High-Tech-Park Schildkrötstraße 15 D-68199 Mannheim www.promega.com/de</p>
<p>Invitrogen Invitrogen Corporation 1600 Faraday Avenue PO Box 6482 Carlsbad, California 92008 USA http://www.invitrogen.com</p>	<p>Millipore Corporation 290 Concord Road Billerica, MA 01821 USA www.millipore.com</p>	<p>QIAGEN GmbH – Germany QIAGEN Strasse 1 D-40724 Hilden http://www1.qiagen.com/</p>
<p>Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. P.O. Box 9 872 West Baltimore Pike West Grove, PA 19390 USA www.jacksonimmuno.com</p>	<p>NEB New England Biolabs 240 County Road Ipswich, MA 01938-2723 USA www.neb.com</p>	<p>Roche Applied Science Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Straße 116 D-68305 Mannheim www.roche-applied-science.com</p>
<p>JT Baker Mallinckrodt Baker B.V. Teugseweg 20, P.O. Box 1 7400 AA Deventer Niederlande http://www.mallbaker.com/</p>	<p>Nunc GmbH & Co. KG Rheingastr. 32 D-65201 Wiesbaden-Schierstein http://www.nunc.de/</p>	<p>Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2145 Delaware Avenue Santa Cruz, CA. 95060 U.S.A. http://www.scbt.com/</p>
<p>Kodak http://www.kodak.com</p>	<p>Olympus Deutschland GmbH Wendenstr. 14-18 D-20097 Hamburg www.olympus.de</p>	<p>SARSTEDT AG & Co. Rommelsdorfer Straße D-51582 Nümbrecht http://www.sarstedt.com/php/main.php</p>
<p>Liebherr-International Deutschland GmbH Hans-Liebherr-Strasse 45 D-88400 Biberach an der Riss www.liebherr.com</p>	<p>PAA Laboratories GmbH Haidmannweg 9 4061 Pasching Austria www.paa.com</p>	<p>Sartorius AG Weender Landstrasse 94-108 D-37075 Goettingen http://www.sartorius.com</p>
<p>Merck KGaA Frankfurter Str. 250 D-64293 Darmstadt http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1001723/index.html</p>	<p>PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc. 45 William Street Wellesley, MA 02481-4078 USA http://perkinelmer.com/</p>	<p>Schärfe System GmbH Krämerstraße 22 D-72764 Reutlingen http://www.casy-technology.com/</p>
<p>metabion international AG Lena-Christ-Strasse 44/I D-82152 Martinsried www.metabion.de</p>	<p>Pierce Chemical Company P.O. Box 117 Rockford, IL 61105 USA www.piercenet.com</p>	<p>Sequence Laboratories Göttingen GmbH Hannah-Vogt-Str. 1 D-37085 Göttingen</p>

Serotec Germany

Immermannstr. 13
D-40210 Dusseldorf, Germany
www.serotec.com

SERVA Electrophoresis GmbH

Carl-Benz-Str. 7
P.O.B. 10 52 60
D-69115 Heidelberg
www.serva.de/

SIGMA Laborzentrifugen GmbH

An der Unteren Söse 50
D-37520 Osterode am Harz
<http://www.sigma-zentrifugen.de/>

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH

Wunstorferstr. 40
D-30926 Seelze
Zu Sigma-Aldrich Corp., St. Louis,
MO, USA
www.sigmaaldrich.com

Southern Biotechnology Associates

160A Oxmoor Boulevard
Birmingham, Alabama 35209
USA
<http://www.southernbiotech.com/>

Thermo Fisher Scientific, Inc.

81 Wyman Street
Waltham, MA 02454
USA
<http://www.thermo.com>

Wesarg Medizintechnik

GÜNTHER WESARG GmbH
Stresemannstr. 46
D-22769 Hamburg
<http://www.metallinnung-hh.de/wesarg/>

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an:

Herrn PD Dr. Wolfgang Hampe für die Betreuung und die Bereitstellung des Themas, eines Arbeitsplatzes und von Sachmitteln.

Frau Prof. Dr. Beisiegel für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und von Sachmitteln.

Frau Prof. Dr. Elke Pratje für die Erstellung eines Gutachtens.

Antonia Munck, Christopher Böhm, Lars Rellin, Janne Prawitt, Karim Sultan, Susanne Hoppe und Birgit Henkel für die nette Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Markus Nalaskowski für die Zusammenarbeit am EGFP-Projekt.

Frau Prof. Chica Schaller für die Überlassung von Material.

Herrn PD Dr. Harald Steiner für die Überreichung von Zellen, die stabil das Insulin-degradierende Enzym überexprimieren.

Alle meine Freunde, besonders an Tobias Kolster und Svenja Hanson.

Meine Familie.

Und vor allem an Stefan Swiderek.

Publikationen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

Munck A, Böhm C, Seibel NM, Hashemol Hosseini Z, Hampe W. 2005. Hu-K4 is an ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. *FEBS Journal* 272(7):1718-26.

Böhm C, Seibel NM, Henkel B, Steiner H, Haass C, Hampe W. 2006. SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 281(21):14547-53.

Eingereicht

Seibel NM, Eljouni J, Nalaskowski MM, Hampe W. 2006 Nuclear localization of EGFP homomultimers. in *Biotechniques*

Poster:

Seibel N, Munck A, Böhm C and Hampe W.
SIGNAL TRANSDUCTION OF THE NEUROPEPTIDE RECEPTOR SORLA
12th International Conference on Second Messengers and Phosphoproteins,
Montreal; August 2004

Seibel N, Munck A, Hashemol-Hosseini Z and Hampe W.
CYTOPLASMATIC INTERACTION PARTNERS OF THE NEUROPEPTIDE RECEPTOR
SORLA
9th International Congress on Amino Acids and Proteins
Wien; August 2005

Kongresseteilnahmen und Workshops:

XXth International Winter Meeting St Moritz
GROWTH AND DEATH IN THE NERVOUS SYSTEM
St. Moritz; März 2004

Workshop
2D BLUENATIVE-PAGE – SEPARATION OF MEMBRANE PROTEIN COMPLEXES
München; Februar 2005

Nicole Seibel
 Wiesenstrasse 15
 20255 Hamburg
 nicolese(at)yahoo.de

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Nicole Maria Seibel
 Geburtstag: 13. April 1976
 Geburtsort: Trier
 Familienstand: Ledig

Schulbildung

1982-1986 Grundschule in 54349 Trittenheim/Mosel
 1986-1992 Realschule in 54349 Neumagen/Mosel
 1992-1995 Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Trier, Abitur

Ausbildung und berufliche Tätigkeit

WS 1995/96 – WS 1998/99 Grundstudium Biologie an der Rheinisch Westfälischen Hochschule Aachen

SS 1999 – SS 2002 Hauptstudium Biologie an der Universität Hamburg
 Hauptfach Genetik/Molekularbiologie
 Nebenfächer Biochemie und Mikrobiologie
 Diplomarbeit im Bereich Molekulare Genetik in der AG Prof. E. Pratje am Thema:
 „Intramitochondrialer Proteintransport in der Hefe - Charakterisierung des am Cytochrom *c* Peroxidase-Transport beteiligten Ygr101w-Proteins“

Während des Studiums Nebentätigkeiten als:
 - technische Hilfskraft in der Mikrobiologie der TU Hamburg-Harburg
 - Betreuung eines Praktikums an der Universität Hamburg

Januar 03 – Oktober 03 Mitarbeiterin beim „Laboratorium für Toxikologie und Pharmakologie“ in Hamburg in der Betreuung von klinischen Studien

Januar 04 – März 07 Promotion am Universitätsklinikum Eppendorf in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie (Prof. Dr. Beisiegel) am Thema:
 „Signaltransduktion durch den humanen Transmembranrezeptor SorLA“
 Dabei Übernahme der Organisation eines institutsübergreifenden Kolloquiums mit externen Gästen

Hamburg, März 2007