

Aus dem Institut für Entwicklungsneurobiologie
Direktorin: Prof. Chica Schaller
Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
und
Institute of Medical Biochemistry
Direktor: Poul Henning Jensen
University of Aarhus, Denmark

Charakterisierung von drei Splicevarianten des humanen Rezeptors SorCS1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sady J. Keat
aus Phnom Penh/ Kambodscha

Hamburg 2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Zusammenfassung.....	2
2. Einleitung.....	3
3. Ergebnisse.....	11
3.1 Identifizierung von SorCS1c, der dritten humanen SorCS1-Isoform.....	11
3.2 Vergleich der humanen SorCS1c zytoplasmatischen Domäne mit bekannten Proteinsequenzen	14
3.3 SorCS1-Isoformen sind differentiell exprimiert	17
3.4 Die zytoplasmatischen Domänen von SorCS1-Isoformen diktiert die subzelluläre Lokalisation	18
3.5 Die Internalisation Chimärer-Rezeptoren ist abhängig von der intrazellulären SorCS1-Domäne	20
3.6 Kolokalisation von IL2-R/hSorCS1-Chimäre und SorCS1-Wildtyp- Rezeptoren	24
4. Diskussion.....	29
5. Material und Methoden.....	35
5.1 cDNA Synthese und Polymerasekettenreaktionen (PCR).....	35
5.2 Klonierungstechniken	38
5.3 Herstellung von eukaryontischen Expressionskonstrukten	40
5.4 Transfektion von eukaryontischen Zellen und Zellkultur.....	41
5.5 Nachweis und Lokalisation von Proteinen in permeabilisierten Zellen	45
5.6 Internalisierungsexperimente mit nicht iodiertem Antikörper.....	45
5.7 Internalisierungsexperimente mit iodiertem Antikörper.....	46
6. Literaturverzeichnis	47
7. Anhang.....	55
7.1 Abkürzungen.....	56

1. Zusammenfassung

Die Familie der Wirbeltier Typ-I Transmembranrezeptoren, welche eine Vps10p-Domäne besitzen, beinhaltet fünf Mitglieder, Sortilin, SorLA/LR11 und SorCS1-3. Das Hauptmerkmal dieser Proteinfamilie ist die Vps10p-Domäne, welche am N-Terminus der luminalen/extrazellulären Region lokalisiert ist. Die Vps10p-Domäne wurde als erstes in dem gleichnamigen Rezeptor in der Hefe beschrieben. Dieser ist an Transport- und Sortierungsprozessen zwischen dem Trans-Golgi System und Endosomen beteiligt. Ein weiteres Kennzeichen dieser Rezeptorfamilie ist ein kurzer zytoplasmatischer Abschnitt, welcher in der gesamten Familie unterschiedliche Internalisierungs- und Sortierungssignale aufweist.

SorCS1 wird, genau wie die anderen Familienmitglieder, prominent, aber nicht ausschließlich, während der Entwicklung des Zentralen Nervensystems exprimiert und weist als einziges Spleißvarianten auf. Vom humanen SorCS1 Protein waren zu Beginn dieser Arbeit bereits zwei Isoformen bekannt, hSorCS1a und hSorCS1b. Im Rahmen dieser Arbeit wurde, eine dritte humane Spleißvariante, hSorCS1c, kloniert, und gemeinsam mit den zwei zuvor klonierten Isoformen charakterisiert.

Die drei Isoformen sind in ihrer luminalen/extrazellulären Domäne sowie der Transmembranregion identisch, unterscheiden sich aber vollständig in ihren zytoplasmatischen Abschnitten. Diese weisen verschiedene Bindemotive und Sortierungssignale auf. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die drei Spleißvarianten in unterschiedlichen Geweben differentiell exprimiert werden. Mittels stabil transfizierter Zelllinien wurde dann einerseits eine differentielle subzelluläre Verteilung der drei Isoformen nachgewiesen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Spleißvarianten verschiedene Internalisierungsraten aufweisen. Während SorCS1b, für welches die stärkste Zelloberflächenlokalisation gezeigt wurde, gar nicht internalisiert wird, wird SorCS1a, das vor allem intrazellulär nachgewiesen wurde, rasch endozytiert. SorCS1c nimmt eine Zwischenstellung ein, wird aber eindeutig internalisiert. Somit sind zwei der drei Isoformen in der Lage die Internalisierung von Liganden zu vermitteln, während SorCS1b eine andere noch aufzuklärende Funktion besitzt. Somit kann SorCS1 als multifunktionaler Rezeptor betrachtet werden, der nach neueren Daten auch an der Entstehung von Typ 2 Diabetes verantwortlich sein soll.

2. Einleitung

Zelloberflächenrezeptoren binden extrazelluläre Moleküle. Diese können das Interagieren der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors mit intrazellulären Signalmolekülen bedingen und so einen Signaltransduktionsweg regulieren, an dessen Ende ein Zielprotein steht, das das Verhalten der Zelle ändert. Sowohl solche signaltransduzierenden Rezeptoren, als auch spezialisierte endozytische Rezeptoren, können von Zellen internalisiert werden (Marsh und McMahon, 1999; Sorkin und von Zastrow, 2002). Die rezeptorvermittelte Endozytose dient zum einen dazu essentielle Metabolite in die Zelle zu bringen, (z.B. Cholesterin oder Vitamin B₁₂), andererseits dient sie der Aufnahme und somit der Regulation von signaltransduzierenden Liganden-Rezeptor-Komplexen, welche dann gemeinsam abgebaut werden, weiterhin werden so Proteine aufgenommen, die zum Abbau in den Lysosomen bestimmt sind, und schließlich nutzen viele Viren und Toxine die rezeptorvermittelte Endozytose aus, um in Zellen zu gelangen (Birn et al., 1997; Marsh und McMahon, 1999; Willnow et al. 1999). Aufgrund dieser Vielfalt, besitzen Zelloberflächenrezeptoren und ihre Endozytose eine umfassende biologische Bedeutung.

Um ihre Bedeutung besser erfassen zu können, werden Rezeptoren aufgrund gemeinsamer Strukturen und ähnlicher Funktionen, in verschiedene Familien eingeteilt. Eine in jüngerer Zeit entdeckte Proteinfamilie, ist die der Vps10p-Domänen Rezeptoren. Das Vacuolar-Protein-Sorting-Protein, Vps10p, ist an Transport- und Sortierungsprozessen zwischen dem Trans-Golgi System und Endosomen beteiligt, wurde als solches zuerst in der Hefe beschrieben und besitzt zwei Vps10p-Domänen (Marcusson et al., 1994; Jørgensen et al., 1999). Zu den Wirbeltier Typ-I Transmembranrezeptoren der Vps10p-Domänen Rezeptor-Familie gehören neben Sortilin/Neurotensin-Rezeptor 3 (Petersen et al., 1997; Mazella et al., 1998), und SorLA/LR11 (Jacobsen et al., 1996; Yamazaki et al., 1996) auch SorCS1, SorCS2 (Nagase et al., 2000; Rezgaoui et al., 2001) und SorCS3 (Kikuno et al., 1999; Hampe et al., 2001).

Ein Mitglied dieser Familie, SorCS1, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. SorCS ist die Abkürzung für Sorting-Rezeptoren, die für das Zentralnervensystem spezifisch sind (CS, CNS specific). Dies wurde zunächst angenommen, allerdings

zeigte sich später, dass Mitglieder dieser Rezeptorgruppe auch außerhalb des Nervensystems exprimiert werden.

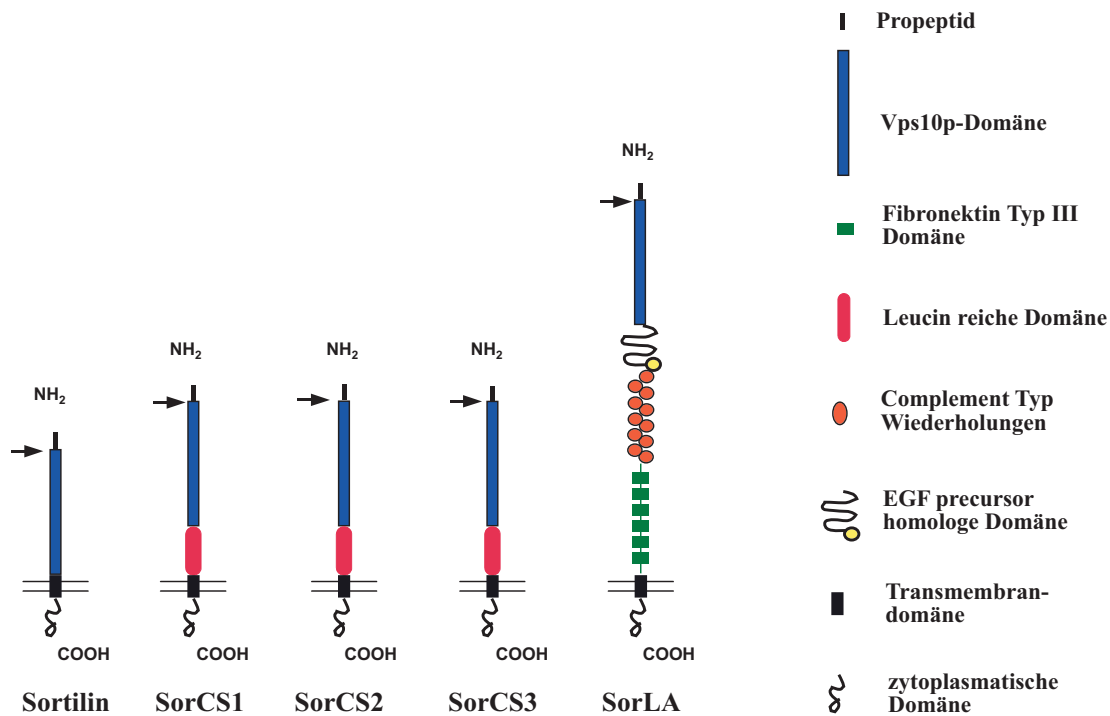


Abb.1 Die Mitglieder der Vps10p-Domänen Rezeptor Familie.

Dargestellt in schematischer Form sind Sortilin, SorCS1-3 und SorLA. Die Transmembrandomäne, trennt die intrazelluläre Domäne von der extrazellulären. Die unterschiedlichen Proteinmodule sind farblich dargestellt. Die schwarzen Pfeile indizieren die Furin Spaltstellen.

Alle Familienmitglieder enthalten in ihrer luminalen/extrazellulären Region eine Vps10p-Domäne (Abb. 1). An die luminal/extrazelluläre Domäne schließt sich ein Transmembransegment an, gefolgt von einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt, der in der gesamten Familie unterschiedliche Internalisierungs- und Sortierungssignale aufweist (Jacobson et al.,1996; Petersen et al.,1997; Hermey und Schaller, 2000; Rezgaoui et al.,2001). In Sortilin besteht der luminal/extrazelluläre Anteil nur aus einer Vps10p-Domäne, während in SorLA diese Domäne für LDL (Low-Density-Lipoprotein)-Rezeptoren ähnliche Elemente (Gliemann, 1998) und

einen Cluster aus Fibronectin Typ-III Domänen (Bork et al., 1996) nach sich zieht. SorCS1-3 sind durch eine identische Domänenabfolge charakterisiert. Bei allen drei Proteinen schließt sich an die N-terminale Vps10p-Domäne ein leucinreiches Modul an, dem die Transmembran- und kurze zytoplasmatische Domäne folgen. Dieses leucinreiche Modul ist einzigartig und zeigt wenig Homologie zu bisher bekannten Proteinmodulen.

In allen bekannten Vps10p-Domänen wurde im N-terminalen Bereich die Konsensus-Sequenz (R-X-R/K-R) identifiziert, die von der Proteinkonvertase Furin erkannt wird (Seidah und Chretien, 1997). Sortilin, SorLA und der SorLA homologe Rezeptor HAB aus Hydra, wurden als N-terminal prozessierte Proteine aufgereinigt (Jacobsen et al., 1996; Petersen et al., 1997; Hampe et al., 1999). Für Sortilin, SorLA und SorCS1 wurde gezeigt, dass von den in CHO-Zellen exprimierten Proproteinen ein N-terminales Propeptid durch Furin abgespalten wird (Petersen et al., 1999; Jacobsen et al., 2001; Hermey et al., 2003). Weiterhin werden Sortilin und SorLA durch diese Prozessierung für die Bindung von Liganden konditioniert, wobei das abgespaltene Propeptid, welches an die Vps10p-Domäne bindet, immer noch mit Liganden um die Bindung an den Rezeptor kompetieren kann (Petersen et al., 1999; Jacobsen et al., 2001). An die luminalen Domänen von Sortilin und SorLA binden - abgesehen von den beiden Propeptiden - sowohl Neuropeptide wie Neurotensin (Mazella et al., 1998; Jacobsen et al., 2001) und Kopfaktivator (Hampe et al., 2000; Jacobsen et al., 2001), als auch Lipoprotein-Lipase (Nielsen et al., 1999; Jacobsen et al., 2001), Apolipoprotein E (Yamazaki, et al., 1996; Jacobsen et al., 2001), und das LDL-Rezeptor assoziierte Protein (RAP) (Jacobsen et al., 1996; Petersen et al., 1997). Vor kurzem wurden noch weitere gemeinsame Liganden nachgewiesen, wie zum Beispiel Urokinase-Typ-Plasminogen Aktivator (UPA) in Komplex mit seinem Typ-I Inhibitor (PAI) (Gliemann et al., 2004). Neuere Daten zeigen, dass SorLA auch das Amyloid Precursor Protein (APP) bindet (Andersen et al., 2005; Spoelgen et al., 2006), und nicht nur wie bisher bekannt Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). Es bindet als einziger aus dieser Rezeptor-Familie den Tissue-Type-Plasminogen Aktivator (TPA) (Gliemann et al., 2004) und den Glia-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Westergaard et al., 2005). Weitere Wachstumsfaktoren, Nerve Growth Factor (NGF) und Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) binden in ihrer Proform spezifisch an Sortilin (Nykjaer et al., 2004; Teng et al. 2005).

Für Sortilin und SorLA wurde bewiesen, dass sie vornehmlich im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert sind, und nur ein geringer Anteil (ungefähr 10%) des jeweiligen Proteins an der Zelloberfläche zu finden ist (Nielsen et al., 1999; Jacobsen et al., 2001). Weitere Studien zeigten, dass die zytoplasmatischen Domänen von Sortilin und SorLA genau wie die der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren mit den GGAs (Golgi-Lokalisierte-Adaptin-Homologe-ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) bindende Proteine) interagieren (Nielsen et al., 2001; Takatsu et al., 2001; Jacobsen et al., 2002). Außerdem ist die zytoplasmatische Domäne von Sortilin in der Lage, sowohl Endozytose als auch den Transport des Rezeptors vom Trans-Golgi-Netzwerk zum Endosomalen-Lysosomalen-System zu vermitteln (Nielsen et al., 2001). Da GGAs Adapterproteine sind, von denen man glaubt, dass sie bei dieser Form des intrazellulären Transports eine Rolle spielen und sie ebenfalls SorLA binden, wird vermutet, dass SorLA auch an ähnlichen Transportprozessen wie Sortilin beteiligt ist. Für Sortilin wurde demonstriert, dass dieser Rezeptor mit dem Neurotrophin Rezeptor p75 in der Zellmembran einen Komplex bildet, durch welchen der proapoptische Effekt von ProNGF und ProBDNF vermittelt wird (Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005). Somit mediiert Sortilin auf zellulärer Ebene sowohl Endozytose, Transport und Apoptose und kann als multifunktionseller Rezeptor betrachtet werden. SorLA scheint ebenfalls eine funktionelle Diversität zu besitzen. Die bisherigen Erkenntnisse aus zellbiologischen Experimenten und die unterschiedlichen Domänen SorLAs untermauern diese Vermutung. In Patienten, welche an der Alzheimerschen Krankheit leiden, wurde eine geringere SorLA-Expression nachgewiesen (Scherzer et al., 2004; Andersen et al., 2005; Offe et al., 2006), des Weiteren zeigen SorLA Knock-Out Mäuse einen erhöhten Level des Amyloid- β Peptids (Andersen et al., 2005). Durch zellbiologische Experimente konnte nachgewiesen werden, dass SorLA und die zytoplasmatische Domäne von SorLA allein, mit APP und dem Amyloid- β Peptid interagieren, und dadurch auf zellulärer Ebene bei Transport und Prozessierung entscheidenden Einfluss haben (Andersen et al., 2005; Spoelgen et al., 2006). SorLA und seine zytoplasmatische Domäne können die BACE (β -site APP-cleaving enzyme) abhängige APP-Spaltung inhibieren (Spoelgen et al., 2006).

Nichts desto trotz muss die physiologische Rolle der Vps10p-Domänen Rezeptoren als noch unverstanden betrachtet werden. Bis dato kann eine Verbindung zu physiologischen und insbesondere patophysiologischen Vorgängen nur angenommen

werden. Für Sortilin wird eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und der Induktion von posttraumatischer neuronaler Apoptose vermutet (Nykjaer et al., 2004; Kaplan und Miller, 2004; Barker, 2004), während SorLA, neben seiner Bedeutung bei der Entstehung der Alzheimerschen Krankheit, auch als möglicher Faktor bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques betrachtet wird (Zhu et al., 2002; Zhu et al., 2004). Dem gegenüber steht die Gruppe der SorCS Proteine, die als bisher wenig charakterisiert angesehen müssen. Nach neusten Erkenntnissen scheint SorCS1 an der Entstehung von Typ 2 Diabetes eine Rolle zu spielen (Clee et al., 2006).

Allen Vps10p-Domänen Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie prominent, aber nicht ausschließlich, während der Entwicklung des Zentralnervensystems und im adulten Gehirn exprimiert werden (Hermans-Borgmeyer et al., 1998, Hermans-Borgmeyer et al., 1999; Motoi et al., 1999; Hermey et al., 2001a; Rezgaoui et al., 2001; Hermey et al., 2004; Sarret et al., 2004). So wird SorLa/LR11 zwar überwiegend im Nervensystem exprimiert, kommt aber auch in Hoden, Eierstöcken, Lymphknoten, distale Nierentubuli und bei atheromatösen Läsionen in der Intima der Aortawand vor (Riedel et al., 2002; Zhu et al., 2004). Auch Sortilintranskripte sind in vielen Geweben nachzuweisen. Besonders im Gehirn, Rückenmark, Hoden und Skelettmuskel (Petersen et al., 1997; Hermans-Borgmeyer et al., 1999). SorCS1 wurde zuerst in der Maus identifiziert (Hermey et al., 1999). Transkripte von SorCS1 und SorCS2 wurden außer im Gehirn auch in Herz, Leber, Niere und im Hoden nachgewiesen, wobei SorCS2 auch in der Lunge exprimiert wird. SorCS3 wird vorwiegend im embryonalen und adulten Gehirn exprimiert (Hermey et al., 2004).

Bisher sind drei Isoformen von SorCS1 in der Maus identifiziert worden, mSorCS1a,-b, und -c (Hermey und Schaller, 2000 und Hermey persönl. Mitteilung). Diese Isoformen weisen identische extrazelluläre und transmembrane Domänen auf, unterscheiden sich jedoch in ihren zytoplasmatischen Abschnitten. Die zytoplasmatischen Abschnitte sind wie bei allen Vps10p-Domänen-Rezeptoren relativ kurz. Bei der ersten murinen Isoform, mSorCS1a, enthält die zytoplasmatische Domäne Di-Leucin Motive, die als Internalisierungssignale dienen könnten, sowie die Konsensus-Sequenzen YXXP und PXXP (X steht für eine beliebige Aminosäure). Erstere kann als Bindemotiv für Src homologe 2 (SH2) Domänen fungieren, während die zweite Konsensus-Sequenz als Bindemotiv für SH3 Domänen dienen kann (Pawson und Scott, 1997). Die zweite Isoform, mSorCS1b, weist in ihrem zytoplasmatischem Abschnitt eine Besonderheit auf, sie enthält keinerlei bekannte

Internalisierungs- oder Sortierungssignale, lediglich multiple Bindemotive für SH3 Domänen. Die dritte murine Isoform, mSorCS1c, besitzt von allen drei Isoformen die längste zytoplasmatische Domäne, die sowohl Di-Leucin Internalisierungssignale, als auch ein tyrosinhaltiges Internalisierungs- und Sortierungssignal beinhaltet, und ebenfalls Bindemotive für SH3 Domänen aufweist. Die Isoformen werden durch alternatives Spleißen im internen/terminalen Exon 25 und der terminalen Exons 26 und 27 erzeugt (Abb. 2A). Fungiert Exon 25 als terminales Exon, so entsteht die mSorCS1a-mRNA und das Stoppkodon in Exon 25 wird verwendet (indiziert in Abb. 2A als a). Die dadurch resultierende mSorCS1a-mRNA weist nach dem Stoppkodon einen untranslatierten Bereich mit einem Poly-A-Rest auf (Abb. 2B). Zur Erzeugung von mSorCS1b wird die Spleißstelle innerhalb des Exons 25 genutzt und Exon 27 wird zum terminalen Exon. Auf ähnliche Weise wird mSorCS1c generiert. Die gleiche Spleißstelle innerhalb des Exons 25 ist aktiv, und dieses Exon wird erneut als internes Exon genutzt, während Exon 26 als terminales Exon dient.

Vom humanen SorCS1 Protein (hSorCS1) waren zu Beginn dieser Arbeit bereits zwei Isoformen bekannt, hSorCS1a und hSorCS1b. Die hSorCS1 cDNA kodiert, genau wie das murine SorCS1 für ein 33 Aminosäure langes Signalpeptid, das einen Typ 1 Transmembranrezeptor nach sich zieht, welcher aus 1135 (hSorCS1b) bzw. 1126 (hSorCS1a) Aminosäuren besteht, und zu 92% identisch mit dem murinen SorCS1 ist (Hermeijer et al., 1999; Hermeijer und Schaller, 2000). hSorCS1 ist auf dem langen Arm von Chromosom 10q23.3 lokalisiert, und die Analyse der genomischen Sequenz brachte die Anwesenheit von 26 Exons zu Tage. Die hSorCS1a Isoform wird, genau wie bei der Maus von einer cDNA kodiert, bei der Exon 25 als terminales Exon fungiert (Abb. 2C). hSorCS1b entsteht durch Spleißen des konservierten Spleißkodons in Exon 25 mit Exon 27 (Abb. 2C). Die mRNA der hSorCS1 Isoformen ist in Abbildung 2D schematisch dargestellt. Interessanterweise sind die murine und die humane b-Isoformen nahezu identisch, während die a-Isoformen keinerlei Übereinstimmung in den zytoplasmatischen Domänen aufweisen. Der für die Isoform-a Variante spezifische Anteil des Exons 25 weist in den Genen beider Spezies keinerlei Übereinstimmung auf. Daraus resultiert, dass die hSorCS1a-mRNA sowohl in ihrem kodierenden als auch in ihrem 3' untranslatiertem Teil länger als die mSorCS1a-mRNA ist.

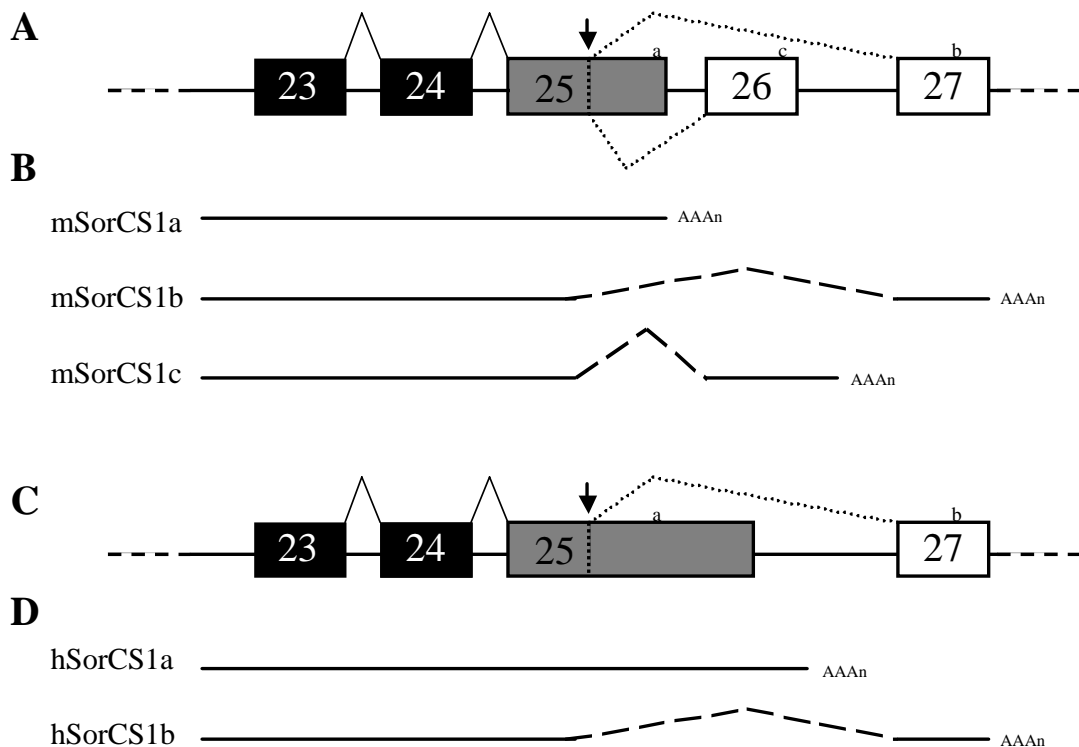


Abb. 2. Das murine und humane SorCS1 Gen.

Schematische Darstellung der Intron-Exonstruktur im 3'-Bereich des (A) murinen und (C) humanen SorCS1 Gens (nicht maßstabsgetreu), sowie der resultierenden mRNAs nach erfolgtem Spleißen (B) und (D). In (A) und (C) sind konform dargestellt: in schwarz die Exons 23 und 24, mit typischen 5' und 3' Spleißstellen. Das Exon 25 (graues Kästchen) kann als internes/terminales Exon fungieren. Der vertikale Pfeil zeigt die potenzielle Spleißstelle für das murine und humane SorCS1 Gen an. Alternativ zum Exon 25 können Exon 26 oder Exon 27 als terminale Exons (weiße Boxen) verwendet werden. Die Positionen der jeweils verwendeten Stoppkodons sind als a, b, und c indiziert.

Da bei dem murinen SorCS1 Gen drei verschiedene Spleißvarianten entdeckt wurden, stellte sich die Frage, ob beim Menschen ebenfalls eine dritte Spleißvariante existiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die dritte humane Spleißvariante von SorCS1 zu identifizieren und zu charakterisieren. Die neue Isoform hSorCS1c wurde identifiziert. Damit war der Grundstein gelegt, um alle drei Isoformen und ihre jeweils für sie charakteristischen spezifischen zytoplasmatischen Domänen miteinander zu vergleichen. Dazu sollte untersucht werden, ob die drei Spleißvarianten unterschiedlich in Geweben verteilt sind. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die Isoformen eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung aufweisen. Dafür sollten stabil transfizierte Zelllinien als Modell herangezogen werden, um eine mögliche differentielle subzelluläre Lokalisation, sowie schließlich die Internalisierungskapazitäten der Isoformen zu untersuchen.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von SorCS1c, der dritten humanen SorCS1-Isoform

Als Grundlage zur Identifizierung der humanen SorCS1c Isoform diente genomische Sequenzinformation vom humanen Chromosom 10. Die verwendeten genomischen Sequenzen wurden vom humanen Genom-Projekt erstellt und über Datenbanken am National Center for Biotechnology Information (NCBI) abgerufen. Insbesondere wurde die genomische Sequenz zwischen Exon 25 (spezifisch für hSorCS1a) und Exon 26, welches für hSorCS1b spezifisch ist, analysiert (Abb.3). Die Nukleotidsequenz wurde in allen drei Leserahmen in Aminosäuresequenzen übersetzt, und diese wurden mit der Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne von mSorCS1c verglichen. Hierbei wurde eine homologe Aminosäuresequenz identifiziert. Die korrespondierende Nukleotidsequenz präsentiert am 5'-Ende eine mögliche Spleißstelle, welche mit Konsensus-Sequenzen von Spleißsignalen übereinstimmen (Norton, 1994; Goldstrohm et al.; 2001). Die Konsensus-Sequenzen am 5'-Ende der Introns beginnt mit GU und endet mit AG. Am 3'-Ende wird die Konsensus-Sequenzen aus einem Abschnitt von zehn Pyrimidinresten (C oder U) gebildet, denen eine beliebige Base und ein C sowie am Ende ein unveränderliches AG folgen (Streuer et al. 1987). Daraufhin wurde ein rückwärts gerichteter Primer im Bereich des putativen Stoppkodons konstruiert (Abb. 4C). Der vorwärts gerichtete Primer wurde von der bekannten cDNA Sequenz im Bereich des Exons 23 abgeleitet, die für einen Teil der leucinreichen Domäne kodiert (Abb. 4C). Es wurde dann eine RT-PCR durchgeführt, bei der als Template zur Erststrang-Synthese totale RNA diente, die aus humanem fetalem Gehirngewebe stammte. Danach wurde eine Zwei-Schritt-PCR durchgeführt. Bei der Auftrennung der PCR Produkte im Agarosegel wurden zwei Banden von ca. 480 Basenpaaren (bp) und ca. 590 bp detektiert. Für das hSorCS1c spezifische PCR Produkt wurde eine Grösse von 487 bp erwartet. Die Sequenz des kurzen PCR Produktes entsprach der für hSorCS1c erwarteten Basenfolge, während das längere PCR Produkt zusätzlich eine 105 bp lange Insertion enthielt. Ein Vergleich mit der genomischen Sequenz ergab, dass die Insertion der spezifischen cDNA Sequenz von hSorCS1a entspricht. Dies beweist, dass die hSorCS1a cDNA in ihrem 3'untranslatiertem Bereich die für hSorCS1c kodierende

Sequenz enthält (Abb. 4D). Somit wurde durch diese RT-PCR die hSorCS1c cDNA nachgewiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass für die Erzeugung von hSorCS1a das Exon 25 des humanen SorCS1 Gens nicht intern gespleißt wird, und das erste Stoppkodon (indiziert in Abb. 4C als a) benutzt wird. Hingegen wird zur Erzeugung von hSorCS1c der mittlere Teil von Exon 25, welcher spezifisch für SorCS1a ist, herausgespleißt, und das zweite Stoppkodon benutzt (Abb. 4C als c).

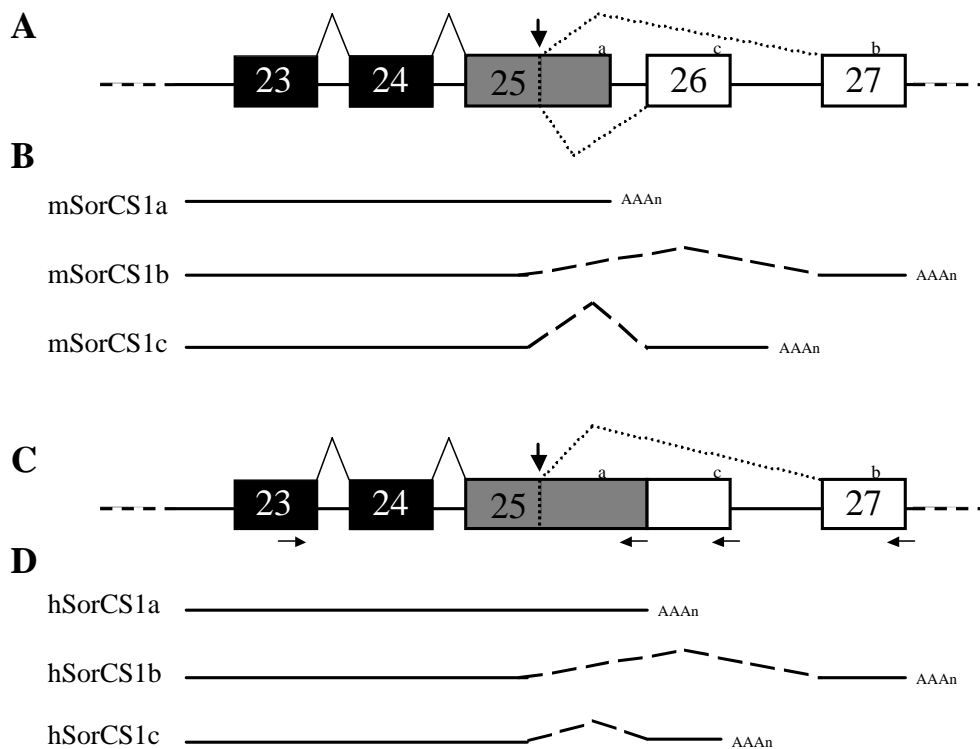


Abb. 4. Das murine und humane SorCS1 Gen.

Schematische Darstellung der Intron-Exonstruktur im 3'-Bereich des (A) murinen und (C) humanen SorCS1 Gens (nicht maßstabsgetreu), sowie der resultierenden mRNAs nach erfolgtem Spleißen (B und D). In (A) und (C) sind in schwarz die Exons 23 und 24. Das graue Kästchen stellt Exon 25 dar, das als internes/terminales Exon fungieren kann. Alternativ zum Exon 25 können die Exons 26 oder 27 (weiße Kästchen) als terminale Exons verwendet werden. Der vertikale Pfeil zeigt die 5' Spleißstelle für das murine und humane SorCS1 Gen an. Die horizontalen Pfeile kennzeichnen vorwärts und rückwärts gerichtete Primer, welche für die Klonierung von hSorCS1c bzw. für die Expressionsanalyse im Gewebe verwendet wurden.

CTCCCGCG

ATGGGAAAAGTTGGCGCGGCGCGGCTCCCAAGCCCGGCTGAGCGCGCTCCTGCGCGGCGCGGG
 M G K V G A G G G S Q A R L S A L L A G A G
 GCTCTTGATCTCTGCGCCCGGGGCTCGCGGCGGCTCCTGCTGCCCTGCGCCGACCCCA
 L L I L C A P G V C G G G S C C P S P H P
 GCTCCGCTCCACGCTCGACCTCGACCCCTAGGGGCTTTCCACCAGGGGCGCCAGCAGGGCT
 S S A P R S A S T P R G F S H Q G R P G R A
 CCTGCCACGCCCCCTCGTCTGAGTGGCTCCCTGTTCTCAGTGGCCCCGGGGACCGAGCGCT
 P A T P L P L V V R P L F S V A P G D R A L
 ATCCCTGGAGCGGGCTCGGGCACTGGGGCATCATGGCGTTGCTGCACGCTCGGCGCGGAGGA
 S L E R A R G T G A S M A V A A R S G R R
 GACGGAGCGGAGCGGATCAGGAAAGCGAAGCGGGGAGGGGCGGAGTGGAGCCCCGGGGA
R R S G A D Q E K A E R G E G A S R S P R G
 GTGCTAAGAGATGGAGGCGAGCAGGAGCTGGGACTCGGGAGCGGGACCCGGACAAAGCCACCCG
 V L R D G G Q Q E P G T R E R D P D K A T R
 CTTCGGATGGAGAACTGAGACTGACAGCACCACGTTTGGCGTGACGGGAGACTCAGCACACA
 F R M E E L R L T S T T F A L T G D S A H
 ACCAAGCCATGGTCCACTGGTTCGGCCAAACAGCAGCGTGTCTCATTGACAAAGCTCTCTAT
 N Q A M V H W S G H N S S V I L I L T K L Y
 GACTATAACCTGGGAGCATCAGAGAGCTCGCTTTGGAGGTCAACCGATTATGGAAACAACCTA
 D Y N L G S I T E S S L W R S T D Y G T T Y
 TGAAAGCTGAATGATAAAGTTGGTTGAAAACCATTTGAGCTATCTCTATGTGTCTTACCA
 E K L N D K V G L K T I L S Y L Y V C P T
 ACAAGCGTAAGATAAGTACTCAGACCCGGAGATGAGAGCAGTTTATGATCAGCTCAGAT
 N K R K I M L L T D P E I E S S L L I S S D
 GAAGGGCAACTTATCAAAGTACCGGCTGAACCTTACATTCAAAGCTTCTTTTTCAACCCCAA
 E G A T Y Q K Y R L N F Y I Q S L L F H P K
 ACAAGAAGACTGGATCTGGCATAAGTCAAGACCAAAAGTTATACAGCTCTGCTGAATTTGGGA
 Q E D W I L A Y S Q D Q K L Y S S A E F G
 GAAGATGGCAGCTTATCCAAGAAGGGTGTACCAACAGGTTCTACTGGTCTGTGATGGGTC
 R R W Q L I Q E G V V P N R F Y W S V M G S
 AATAAAGAACACGACCTTGTGCATCTTGAGGCCAGAAGTGGATGGTCACTCACATTATCTAAC
 N K E P D L V H L E A R T V D G H S H Y L T
 TTGCCGAATGCAAGACTGACAGAGCAACAGGAATCAGCCTTTCCAGGCTACATTTGACCCAG
 C R M Q N C T E A N R N Q P F P G Y I D P
 ACTCTTGATGTTTACAGGATCATATGTTGTTTTCAGTGCATCAGGAGGGCGCCACATAC
 D S L I V Q D H Y V F V Q L T S G G R P H Y
 TACGTGTCTACCGAAGGAATGATTTGCCAAATGAAGCTTCCGAAATATGCTTTGCCAAAGGA
 Y V S Y R R N A F A Q M K L P K Y A L P K D
 CATGCTGTTTATCAGCAGGATGAGAATCAGGTGTTCCGACGGTCCAAGAATGGAACAGAAATG
 M H V I S T D E N Q V F A A V Q E W N Q N
 ACACGTACAACCTTACATCTCAGACACACGTTGTCTACTTACCCTGGCCTTGGAGAATGTC
 D T Y N L Y I S D T R G V Y F T L A L E N V
 CAGAGCAGCAGGCGCCCTGAGGGCAACATCATGATCGACCTCTATGAGGTAGCAGGGATAAAGGG
 Q S S R G P E G N I M I D L Y E V A G I K G
 AATGTTCTTGCTAACAAGAAGATTGACAACCAAGTGAAGACTTTTACATACATATAACAAGGCA
 M F L A N K K I D N Q V K T F I T Y N K G
 GAGACTGGCGTTTGTGTCAGGCGCCGGACACGGATCTAAGGGGGACCCCGTGCATGCTTGCTG
 R D W R L L Q A P D T D L R G D P V H C L L
 CCCTATGTCTCACTACCCCTCAAGGCTCTGAGAATCCCTACACATCAGGATCATTGC
 P Y C S L H L H L K V S E N P Y T S G I I A
 CAGCAAAGCACAGCTCCAGCATCATAGTGCATCAGGTAATATAGGTTCTGAATGTCAGACA
 S K D T A P S I I V A S G N I G S E L S D
 CTGACATCAGCATGTTTGTCTCTCAGATGACGGGAACCCCTGGAGACAGATCTTTGAAGAAGAG
 T D I S M F V S S D A G N T W R Q I F E E E
 CACAGTGTTTGTACCTGGATCAAGTGGAGTCTCGTTGCTATGAAACACACATCTCCCAAT
 H S V L Y L D Q G G V L V A M K H T S L P I
 TCGACATCTTTGGTTGAGTTTGTGATGAAGGGAGATCTTGGAGCAATAACAGTTTCCATCTATTC
 R H L W L S F D E G R S W S K Y S F T S I

-8

65 CACTTTTTTGGATGGGGTCTGGGGGAGCTGGAGAAGAGACTCTCATCATGACAGTGTTTGGA 1950
 P L F V D G V L G E P G E E T L I M T V F G
 130 CACTTCAGCCACCGCTTGAATGGCAGCTGGTCAAAGTAGATTCAAAGTCCATTTTGTATAGACG 2015
 H F S H R S E W Q L V K V D Y K S I F D R R
 195 GTGTCCGCAAGAGGACTACAGACCTTGGCAGCTGCACAGCCAGGGGAAGCATGTATCATGGGAG 2080
 C A E E D Y R P W Q L H S Q G E A C I M G
 260 CAAAAAGGATATATAAAGCGAAAATCAGAGCGGAAGTGTATGCAAGAAAATATGCAAGAGCT 2145
 A K R I Y K K R K S E R K C M Q G K Y A G A
 325 ATGGAATCTGAACCTGTGTCTGACTGAGGCTGATTTTGGATGCACTATGTTATGAGCGACA 2210
 M E S E P C V C T E A D F D C D Y G Y E R H
 390 CAGCAATGGCCAGTGCCTGCCGGCATTTTGGTTCAATCCATCCTCTCTGTCAAAGGATGCGACT 2275
 S N G Q C L P A F W F N P S S L S K D C S
 455 TGGACAGAGTTCCTCAATAGTACTGGGTACAGGAAGGTGGTTTCCAATAATGCACTGATGGC 2340
 L G Q S Y L N S T G Y R K V V S N N C T D Y
 520 GTAAGGGAACAGTACACTGCCAAACCGAGAAGTCCCAGGGAAAGCCCGCGGGGCTGCGGAT 2405
 V R E Q Y T A K P Q K C P G K A P R G L R I
 585 AGTCACGCTGATGGAAGCTGACAGCGGAACAAGCAACAAGTCACTCATGTTGATGCACTTATG 2470
 V T A D G K L T A E Q G H N V T L M V Q L
 650 AAGAGGGTGTTCAGCGGACACTCATCAAGTGGACTTTGGCAGTGGTATCGCGGTGTCTTAC 2535
 E E G D V Q R T L I Q V D F G D G I A V S Y
 715 GTCATCTCAGCTCCATGGAAGATGGGATCAAACAGCTCTATCAAGCTGAGTGGGCAATTTCCG 2600
 V N L S S M E D G I K H V Y Q N V G I F R V
 780 GACCGTGCAGGTGGACAACAGCTGCGGTTCTGACAGCGCCCTCTGTACTTACATGTAAGTGTG 2665
 T V Q V D N S L G S D S A V L Y L H V T C
 845 CCTTGGAGCACGTGCACCTGTCTCTCCCTTGTCCACCAAAAGAAACAAAGAGGTCAATGCGAG 2730
 P L E H V H L S L P F V T T K N K E V N A T
 910 GCAGTGTGTGGCCAGCCAAAGTGGGACCTCACTTACGTGTGTGGTACGGAAACAACCGGA 2795
 A V L W P S Q V G T L T Y V W W Y G N N T E
 975 GCCTTGTACCTTGGAGGGAAGCATCTTCAGATTTACTTCAAGAAAGTGAATACCATCA 2860
 P L I T L E G S I S F R F T S E G M N T I
 1040 CAGTGCAGGTCTCAGCTGGGAATGCCATCTACAAGAACAAGACCATCGCAGTATATGAGGAA 2925
 T V Q V S A G N A I L Q D T K T I A V Y E E
 1105 TTCCGGTCTCTCGCTTCTTCTCCAAACCTGGATGACTAGCAACCCGGACATCCCTGAGTG 2990
 F R S L R L S F S P N L D D Y N P D I P E W
 1170 GAGGAGGACATCGGTGAGTCAAAAATCCCTGGTGGAAAGCACAGGGGTTCCAGGGCAGC 3055
 R R D I G R V I K K S L V E A T G V P G Q
 1235 ACATCTGGTGGCGGTCTCCCTGGCTTACCACCACTGTGAACCTTTTGTCTACCCATCAG 3120
 H I L V A V L P G L P T T A E L F V L P Y Q
 1300 GATCCAGCTGGAGAAAACAAAGTCACTGATGACCTGGAGCAGATATCAGAATGCTGATCCA 3185
 D P A G E N K R S T D D L E Q I S E L L I H
 1365 CACGCTCAACAAAACCTCAGTACACTTCAGCTGAAAGCAGGAGTCCGAGTCCCTTCCATGCTG 3250
 T L N Q N S V H F E L K P G V R V L V H A
 1430 CTCACCTTAACAGCGGCCCCCTGGTGGACCTCACTCCAACCCACAGTGGATCTGCCATGCTGAT 3315
 A H L T A A P L V D L T P T H S G S A M L M
 1495 TGTCTCAGTGGTGTTTGGGGCTGGCAGTGTTCGTCATCTCAAAGTTTAAAGGAGATCCC 3380
 L L S V V F V G L A V F V I Y K F K R K I P
 1560 GGGGATTAATGTTTATGCCAGATGCAAGTGAAGAAAGCAAGAGATGATCAGTCCAGTCACTC 3445
 G I N V Y A Q M Q N E K E Q E M I S P V S
 1625 ACTCTGAAAGCAGGCCAATGTCCCTCAGACTGAACCTAAGGAGGCTGGCCAGCTTATAGATGAG 3510
 H S E S R P N V P Q T E L R R P G Q L I D E
 1690 AAGGTGAATCCAGCTCATAGGTAATGATCCAGTAGCCACCA 3540
 K V E S Q L I G K stop

Abb. 5 Die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz vom humanen SorCS1c.

Die Pfeile markieren die Position der Primer, die zum klonieren der gesamten cDNA verwendet wurden. Das vorhergesagte Signalpeptid (SP) ist 33 Aminosäuren lang und kursiv dargestellt. Die Transmembrandomäne (TM) ist unterstrichen. Fettgedruckt dargestellt sind die Aminosäuren, die mit der Konsensus-Sequenz (R-XR/K-R) für Schnittstellen der Protease Furin übereinstimmen, sowie die Integrin-Bindungsstellen-Sequenz RGD.

Der schematisch dargestellte Vergleich des murinen und humanen SorCS1 Gens in Abbildung 4 zeigt, dass in beiden Spezies Exon 25 sowohl als terminales als auch internes Exon benutzt werden kann. Ist Exon 25 das terminale Exon, wird jeweils die Isoform SorCS1a erzeugt. Ist die 5'Spleißstelle innerhalb des Exons 25 aktiv, wird durch die Kombination mit Exon 27 hSorCS1b bzw. mSorCS1b erzeugt (Abb. 4A,C). Hingegen wird hSorCS1c aufgrund einer unterschiedlichen genomischen Organisation erzeugt. Im murinen Gen schließt sich an Exon 25 ein sehr kurzes Intron an, auf welches das für mSorCS1c spezifische Exon 26 folgt. So wird mSorCS1c, ähnlich wie mSorCS1b, durch die Benutzung eines alternativen terminalen Exons generiert. Im Gegensatz dazu wird im humanen Gen der mittlere Teil von Exon 25 herausgespleißt, der somit als optionales Intron betrachtet werden kann.

Zur Klonierung der gesamten cDNA, die für hSorCS1c kodiert, wurde eine PCR Reaktion durchgeführt. Es wurde der gleiche rückwärtsgerichtete Primer, wie bei der Identifikation der Isoform verwendet. Der vorwärtsgerichtete Primer korrespondierte mit bereits bekannter Sequenz 5' vom Startkodon (Abb. 5). Die resultierende cDNA ist 3564 bp lang und kodiert für eine 1179 lange Aminosäuresequenz.

3.2 Vergleich der humanen SorCS1c zytoplasmatischen Domäne mit bekannten Proteinsequenzen

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der murinen und humanen SorCS1 Isoformen und ihrer möglichen Bindemotive zeigt, dass die Homologie der zytoplasmatischen Domänen zwischen den Spezies unterschiedlich ausgeprägt ist. Die Aminosäuresequenz der murinen SorCS1a Isoform zeigt nur eine geringe Homologie zum humanen SorCS1a (31%). Beide besitzen von allen drei Isoformen die kürzesten zytoplasmatischen Domänen, weisen jedoch untereinander unterschiedliche Längen auf. So ist die murine SorCS1a wesentlich kürzer als die humane SorCS1a Isoform (Abb. 6). Dagegen ist die zytoplasmatische Proteinsequenz von hSorCS1b und hSorCS1c zwischen den Spezies nahezu identisch sind (Abb. 6). Die murine und humane SorCS1b Isoformen besitzen eine Homologie von 93% und sind zu 89% identisch. Dabei weisen beide die gleiche Länge auf. Die Isoformen von murinen und

humanen SorCS1c sind ebenfalls gleich lang und besitzen eine Homologie von 96% und sind zu 86% identisch (Abb. 6).

```

mSorCS1a YKFKRCV F L L L P S Y P R P P P P S S F C Q V Q K Q
hSorCS1a YKFKRCV S L Y P R S P T P D L F L L P D R F R S M C Y S D V H S S D G F Y
Konsensus YKFKRCV L S

mSorCS1b YKFKRRVALPSPSPSPA Q P G D S S L R L Q R P R P A T P P S S P K R G S A G A Q F A I
hSorCS1b YKFKRRVALPSPSPSPST Q P G D S S L R L Q R A R H A T P P S T P K R G S A G A Q Y A I
Konsensus YKFKRRVALPSPSPS Q P G D S S L R L Q R R A T P P S P K R G S A G A Q A I

mSorCS1c YKFKRKIPGINVYAQM Q N E K E Q E L I N P V S H S E S R P S V P H P D L R R P G Q L V
hSorCS1c YKFKRKIPGINVYAQM Q N E K E Q E M I S P V S H S E S R P N V P Q T E L R R P G Q L I
Konsensus YKFKRKIPGINVYAQM Q N E K E Q E I P V S H S E S R P V P L R R P G Q L

mSorCS1c D E K V E S Q L L G K
hSorCS1c D E K V E S Q L I G K
Konsensus D E K V E S Q L G K

```

Abb. 6 Vergleich der murinen und humanen Aminosäuresequenzen von SorCS1a-c.

Abgebildet sind die Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domänen der unterschiedlichen SorCS1 Isoformen. In orange sind die Übereinstimmungen der murinen und humanen Isoformen dargestellt, blau markiert die isofunktionellen Austausch. Die dritte Sequenz zeigt die Konsensus-Sequenz (Konsensus).

In allen murinen und humanen SorCS1 Isoformen lassen sich unterschiedliche Bindemotive und Internalisierungs- und Sortierungssignale finden. So enthalten die Aminosäuresequenzen von mSorCS1a und hSorCS1a Di-Leucin Motive, die als Internalisierungssignale fungieren können (Bonifcino und Traub, 2003), und Konsensus-Sequenzen für SH3-Bindemotive (PXXP) (Pawson und Scott, 1997) (Abb. 7). Wobei mSorCS1a zusätzlich zum SH3-Bindemotiv (PXXP) eine SH2-Konsensus-Sequenz (YXXP) enthält. Die nahezu identischen Aminosäuresequenzen der murinen und humanen SorCS1b zytoplasmatischen Domänen weisen weder bekannte Internalisierungs- noch Sortierungssignale, sondern nur vielfältige Bindemotive für SH3 Domänen (Abb. 7). Ähnlich ist es bei dem murinen und humanen SorCS1c. Diese Isoformen enthalten ebenfalls Bindemotive für SH3 Domänen. Zusätzlich weisen sie sowohl Di-Leucin Motive, als auch tyrosinhaltige Internalisierungs- und Sortierungssignale (Bonifcino und Traub, 2003) auf. Die unterschiedliche Präsenz

und Position von Bindemotiven und Internalisierungssignalen deutet darauf hin, dass die drei zytoplasmatischen Domänen unterschiedliche Funktionen haben.

hSorCS1a

Y K F K R C V S L Y P R S P T P D L F L L P D R F R S M C Y S D V H S S D G F Y

mSorCS1a

Y K F K R C V F L L L P S Y P R P P P S S F C Q V Q K Q

hSorCS1b

Y K F K R R V A L P S P P S P S T Q P G D S S L R L Q R A R H A T P P S T P K R G S A
G A Q Y A I

mSorCS1b

Y K F K R R V A L P S P P S P S A Q P G D S S L R L Q R P R P A T P P S S P K R G S A
G A Q F A I

hSorCS1c

Y K F K R K I P G I N V Y A Q M Q N E K E Q E M I S P V S H S E S R P N V P Q T E L R R
P G Q L I D E K V E S Q L I G K

mSorCS1c

Y K F K R K I P G I N V Y A Q M Q N E K E Q E L I N P V S H S E S R P S V P H P D L R R
P G Q L V D E K V E S Q L L G K

Abb. 7. Die zytoplasmatischen Domänen von SorCS1 und ihre Motive im Vergleich.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domänen der humanen und murinen SorCS1-Isoformen und ihrer möglichen Bindemotive zeigt, dass die Isoformen SorCS1b und -c zwischen den Spezies nicht nur nahezu identisch sind, sondern auch die gleichen Motive aufweisen, während die Isoformen von SorCS1a sich nicht ähneln. Die Di-Leucin-Motive sind in orange abgebildet, in grün die Aminosäuren, die für YXXØ (X = beliebige Aminosäure, Ø = hydrophobe Aminosäure) Internalisierungssignale charakteristisch sind. Die SH3-Bindemotive (PXXP) sind in rot und einfach unterstrichen gezeigt. Ebenfalls in rot, aber doppelt überstrichen dargestellt, ist das SH2-Bindemotive (YXXP).

SorCS1c ist die Einzige der zytoplasmatischen Domänen von SorCS1 Isoformen, die zu einer zytoplasmatischen Domäne anderer Proteine homolog ist. Die zytoplasmatische Domäne von SorCS1c besitzt die gleiche Länge wie die zytoplasmatische Domäne von SorCS2 und ist mit dieser zu 53% identisch und zu 55% homolog. Die zytoplasmatische Domäne von SorCS3 ist hingegen 19

Aminosäuren länger, aber zu 50% mit SorCS1c identisch und zu 72% homolog. SorCS2 und SorCS3 sind zu 37% identisch und zu 50% homolog miteinander (Abb. 8). Da alle drei zytoplasmatischen Domänen sich nicht nur sehr stark ähneln, sondern auch in ihren Motiven große Übereinstimmung aufweisen, könnten sie auch ähnliche Funktionen besitzen.

```

SorCS1c  KFKRKIPGINVYAQMONEKEQEMISPVSHSESRPNVPQTELRRPG
SorCS2   KFKRKRPGRTVYAQMHNENEQEMTSPVSHSEDVQGAVQGNHSGVV
SorCS3   KFKRKIPWINIYAQVQHDKEQEMIGSVSQSENAPKITLSDFTEPE
Konsens. KFKRK-P---VYAQM--EKEQEM---VS-SE----V---E-----

SorCS1c  QLIDKVESQLIGK-----
SorCS2   LSINSREMHSYLVS-----
SorCS3   ELLDKELDTRVIGGIATIANSESTKEIPNCTSV
Konsens. --ID-----I-----

```

Abb. 8 Vergleich der murinen und humanen zytoplasmatischen Domänen von humanem SorCS1, SorCS2 und SorCS3.

In orange sind die Übereinstimmungen zwischen den zytoplasmatischen Domänen dargestellt, blau markiert die isofunktionellen Austausch. Die dritte Sequenz zeigt die Konsensus-Sequenz (Konsens).

3.3 SorCS1-Isoformen sind differentiell exprimiert

Um zu untersuchen, ob die hSorCS1-Isoformen differentiell exprimiert werden, wurde eine RT-PCR in unterschiedlichen humanen Geweben durchgeführt. Für die Analyse wurde humaner adulter Cortex (Großhirnrinde) und adultes Cerebellum (Kleinhirn), sowie fetales Gehirn und fetale Leber herangezogen. Die Analyse ergab, dass alle drei Isoformen in den Gehirnproben vorkommen (Abb.9, Bahn 2-4 des Argarosegels), wobei nur hSorCS1c in der fetalen Leber nachzuweisen war (Abb.9, Bahn 1). Dieses Experiment untermauert die Vermutung, dass die SorCS1-Isoformen im humanem Gewebe differentiell exprimiert werden. Beim Nachweis von SorCS1c wurden Doppelbanden von 487 und 592 bp sichtbar (Abb.9, Bahn 2-4). Dies kann dadurch erklärt werden, dass zur Erzeugung von hSorCS1a das Exon 25 in seiner Mitte nicht gespleißt wird, und der terminale Teil des Exons, welches den für hSorCS1c kodierenden Abschnitt enthält, die 3'untranslatierte Region der hSorCS1a

mRNA bildet. Somit korrespondiert der Primer aus dem 3'Bereich der hSorCS1c Variante auch immer für die 3'untranslatierte Region von hSorCS1a. Die Nukleotidsequenz beider Banden bestätigt diese Annahme.

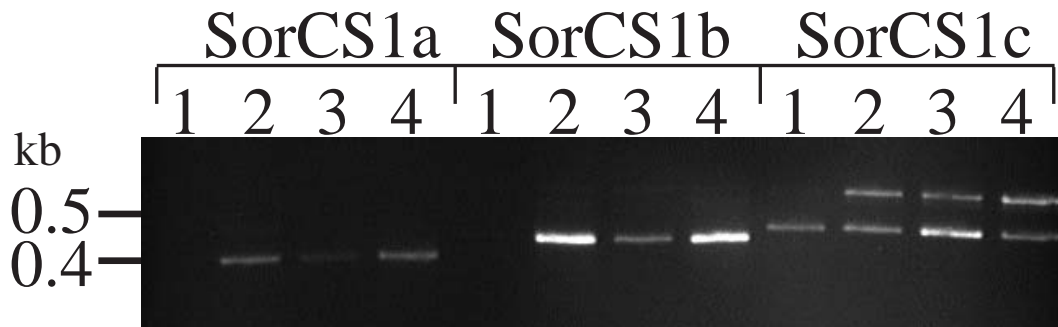


Abb. 9. Nachweis der SorCS1 Expression durch RT-PCR

Photographie eines 2% Agarosegels in dem durch Ethidiumbromid DNA unter UV-Licht visualisiert wurde. Aufgetrennt wurden Produkte aus einer RT-PCR. Als Template für die Reaktionen dienten humane fetale Leber (Bahn 1), humanes fetales Gehirn (Bahn 2), humanes adultes Cerebellum (Bahn 3) und humanes adultes Gehirn (Bahn 4). Es wurden die Spleißvarianten spezifischen Primer, wie in Abbildung 4 indiziert, verwendet. Die Größe der detektierten DNA-Fragmente korrespondierte mit den vorhergesagten Längen. SorCS1a, 404bp, SorCS1b, 450bp, SorCS1c, 487bp. Die zusätzliche Bande von 592bp, welche mit den SorCS1c spezifischen Primern generiert wurde repräsentiert SorCS1a, denn die untranslatierte Region von SorCS1a beinhaltet die Sequenz, die für SorCS1c kodiert.

3.4 Die zytoplasmatischen Domänen von SorCS1-Isoformen diktieren die subzelluläre Lokalisation

Transmembranproteine werden durch die Interaktion ihrer zytoplasmatischen Domäne mit zytosolischen Proteinen zu subzellulären Orten dirigiert. Da die drei hSorCS1-Isoformen unterschiedliche zytoplasmatische Domänen besitzen, wurde untersucht, ob durch diese der Rezeptor differentiell in Zellen verteilt wird. Hierzu wurden Chimäre-Rezeptoren kloniert.

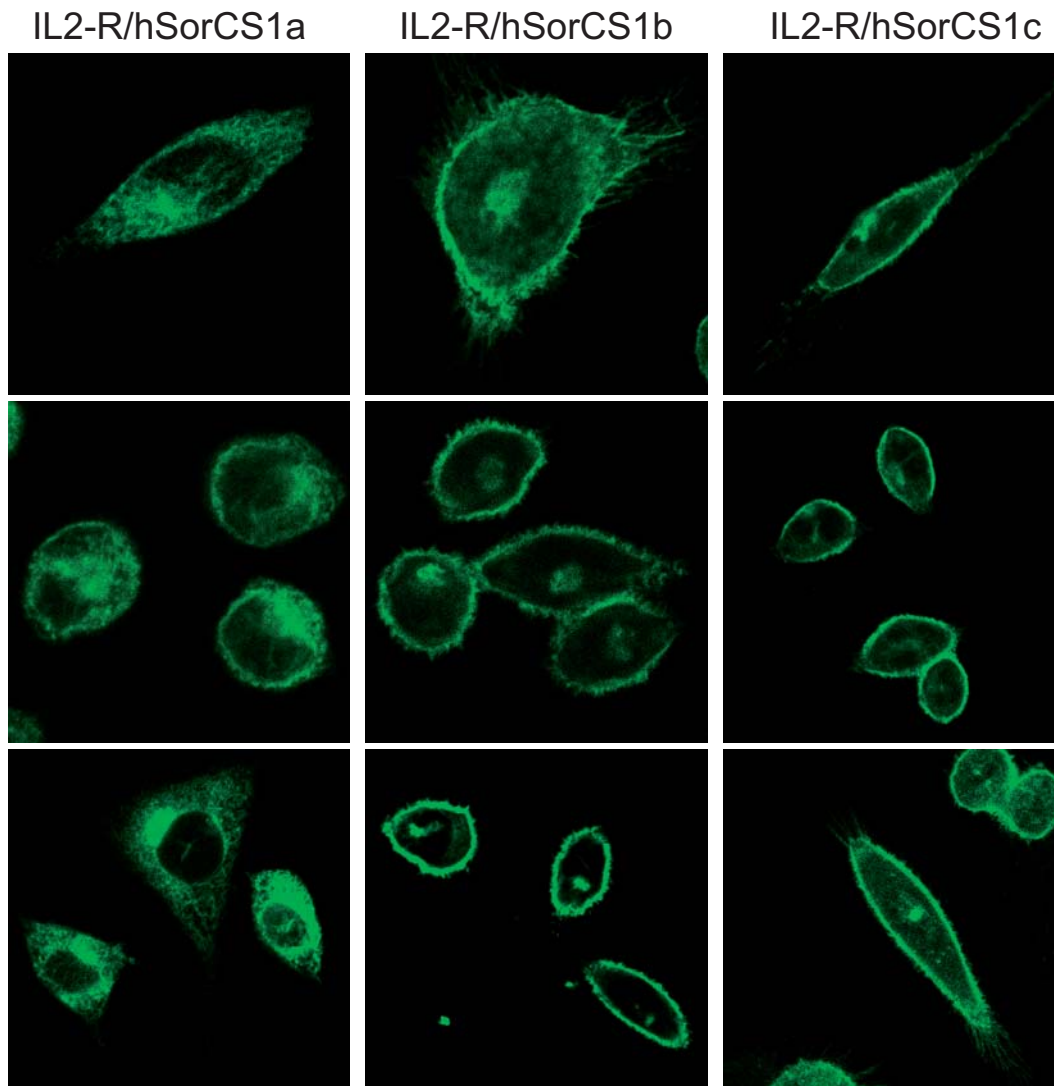


Abb. 10 Subzelluläre Verteilung von IL2-R/hSorCS1a-c Chimäre in stabil transfizierten Zellen.

CHO-Zellen wurden mit den IL2-R/hSorCS1a-c Chimäre stabil transfiziert. Diese setzen sich aus der extrazellulären und Transmembrandomäne des IL2-Rezeptors und den zytoplasmatischen Abschnitten von hSorCS1a, -b, oder -c zusammen. Die Zellen wurden permeabilisiert, mit dem ersten Antikörper (anti-IL2-R-Antikörper) inkubiert und mit einem Kaninchen anti-Maus FITC gekoppelten Antikörper visualisiert. Die Abbildungen wurden am konfokalen Mikroskop aufgenommen.

Da ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung stand, der eine hohe Affinität zu der extrazellulären Domäne des Interleukin2-Rezeptor- α (IL2-R), Tac/CD25, besitzt, wurden Chimäre-Rezeptoren, bestehend aus dem extrazellulären und transmembranen Teil des IL2-R und eines der drei zytoplasmatischen Enden von hSorCS1, erzeugt. CHO (Chinese-Hamster-Ovary) - Zellen wurden mit Expressionskonstrukten, für die

Chimären-Rezeptoren IL2-R/hSorCS1a, -b, oder -c, transfiziert. Stabil transfizierte Zellen wurden anschließend mit Zeocin selektioniert, und positive Klone wurden mittels Immunzytochemie identifiziert. Die drei Chimäre-Rezeptoren wiesen eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung auf. IL2-R/hSorCS1a kommt vornehmlich perinukleär im Zytoplasma vor (Abb. 10), IL2-R/hSorCS1b vorwiegend an der Zelloberfläche. Dagegen war IL2-R/hSorCS1c sowohl intrazellulär als auch vermehrt auf der Zelloberfläche lokalisiert. Diese Demonstration zeigt, dass die drei unterschiedlichen zytoplasmatischen Domänen eine differentielle subzelluläre Verteilung eines Rezeptors vermitteln können.

3.5 Die Internalisation Chimärer-Rezeptoren ist abhängig von der intrazellulären SorCS1-Domäne

Die unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rezeptoren wurde durch ihre zytoplasmatischen Abschnitte bedingt. Dies weist auf eine mögliche differentielle Funktion der Isoformen hin. Ein offensichtlicher Unterschied zwischen den Aminosäuresequenzen der jeweiligen zytoplasmatischen Enden, ist das Vorhandensein und die Position von Internalisierungssignalen. Des Weiteren ist hSorCS1a vorwiegend intrazellulär, dies könnte auf eine verstärkte Internalisation des Rezeptors von der Oberfläche zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde die Endozytosegeschwindigkeit und -kapazität der zytoplasmatischen Enden, bzw. der Isoformen untersucht. Diese Charakterisierung erfolgte durch zwei unterschiedliche Experimente.

In dem ersten Versuchsarrangement wurden CHO-Zellen mit den drei Chimären-Rezeptoren (IL2-R/hSorCS1a-c) stabil transfiziert und mit iodiertem IL2-R-Antikörper bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ungebundener Antikörper durch Waschen entfernt und die Zellen für unterschiedliche Zeiten bei 37°C inkubiert. 10-20% der zugegebenen iodierten Antikörper wurden als an die Zellen gebunden nachgewiesen. Die Fraktion des zellassozierten Antikörpers, welche sich nicht durch eine Inkubation bei pH 2,5 entfernen ließ, wurde als internalisiert definiert. Durch dieses Experiment wurde die Internalisierungskapazität der einzelnen Rezeptoren deutlich. IL2-

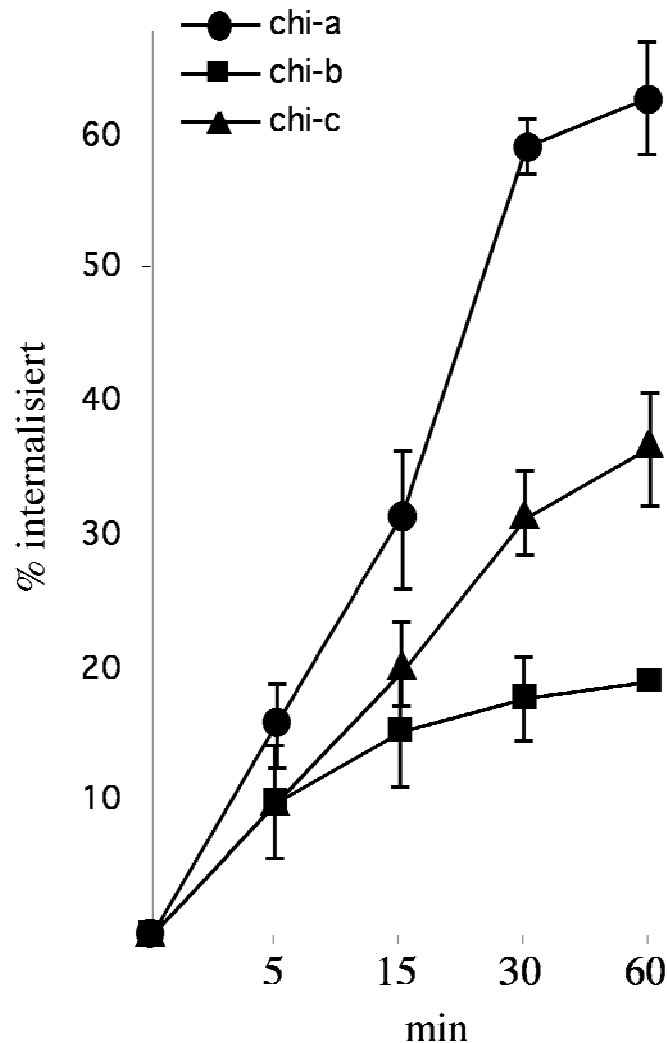


Abb. 11
Internalisierung von IL2-R/hSorCS1a-c Chimäre (Chi-a bis -c) mit iodiertem Antikörper.

Stabil transfizierte CHO-Zellen die Chi-a, (Kreis), Chi-b (Viereck) oder Chi-c (Dreieck) exprimieren wurden mit dem iodierten Antikörper, anti-IL2-R-Antikörper, für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Ungebundener Tracer wurde durch Waschen entfernt. Anschließend wurde die Inkubation mit vorgewärmtem Medium bei 37°C fortgesetzt, und zur vorbestimmten Zeit mit eiskaltem Säurepuffer behandelt. Darauf wurde der Säurepuffer in ein Zählrohr überführt. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit NaOH, und die dabei gewonnene Lösung wurde ebenfalls in ein Zählrohr überführt. Die durch die Säurebehandlung freigesetzte Radioaktivität wurde als mit der Zelloberfläche assoziierter Antikörper betrachtet, während die durch die NaOH Behandlung freigesetzte Radioaktivität als internalisierter Antikörper definiert wurde.

Das Ergebnis dieser Internalisierungsexperimente ist graphisch wiedergegeben. Sie zeigen die unterschiedlichen Internalisierungseigenschaften auf. Während Chi-a rapide internalisiert wird und bereits nach 30 min. zu 60% internalisiert ist (steil verlaufende Kurve), findet bei Chi-b keine Aufnahme statt (die Kurve verläuft abgeflacht). Chi-c dagegen beginnt ab 15 min. zu internalisieren, und setzt es bis zum Zeitpunkt 60 min. fort. Seine Internalisierungseigenschaft befindet sich genau zwischen Chi-a und Chi-b (mittlere Kurve).

R/hSorCS1a internalisierte schnell, und hatte bereits nach 60 Minuten 65% des Antikörpers aufgenommen. IL2-R/hSorCS1b zeigte nach einer Stunde nur eine geringe Aufnahme des an der Zelloberfläche gebundenen Antikörpers von unter 20%. Die Internalisierungskapazität von IL2-R/hSorCS1c lag im gleichen Zeitraum bei 30-40%.

Die Kurven in Abbildung 11 zeigen die unterschiedlichen Internalisierungseigenschaften auf. Während IL2-R/hSorCS1a eine schnelle Internalisation zeigte, und nach 30 Minuten bereits ca. 60% des Antikörpers internalisiert worden war, wurde für die anderen beiden Chimären-Rezeptoren eine wesentlich geringere Internalisierungsgeschwindigkeit nachgewiesen. IL2-R/hSorCS1b internalisierte nach 60 Minuten nicht einmal 20% des an der Zelloberfläche gebundenen Antikörpers, während die Internalisierungsgeschwindigkeit (und -kapazität) von IL2-R/hSorCS1c zwischen den beiden anderen Isoformen liegt. In einem zweiten Versuchsarrangement, wurden die zuvor beschriebenen mit den drei unterschiedlichen Chimären-Rezeptoren stabil transfizierten Zellen, für zwei Stunden bei 4°C, mit nicht iodiertem IL2-R-Antikörper, inkubiert. Nachdem ungebundene Antikörper durch Waschen entfernt wurden, folgte eine Inkubation der Zellen in 37°C warmen Medium für unterschiedliche Zeiten. Anschließend wurden die Zellen fixiert und der Antikörper in den fixierten Zellen mit einem FITC konjugiertem sekundären Antikörper visualisiert, und am konfokalen Mikroskop ausgewertet und dokumentiert. Abbildung 12 zeigt, dass die drei Isoformen unterschiedliche Internalisierungskapazitäten aufweisen. IL2-R/hSorCS1a weist zum Zeitpunkt Null eine reine Zelloberflächenfärbung auf. Nach 15 Minuten erscheint eine zytosolische, perinukleäre Färbung, die Zelloberfläche verliert dagegen an sichtbaren Konturen. Nach 30 Minuten ist auf der Zelloberfläche kaum noch Antikörper nachzuweisen, die Internalisation des IL2-R/hSorCS1a scheint so gut wie abgeschlossen zu sein. Das bestätigen auch die Abbildungen nach einer bzw. nach zwei Stunden, zu diesem Zeitpunkt erstrahlt das Zytoplasma, um den Zellkern herum, grün. Bei IL2-R/hSorCS1b ist zum Zeitpunkt Null eine starke Anfärbung des Antikörper-Rezeptor-Komplexes an der Oberfläche sichtbar. Das Zytoplasma erscheint schwarz. Diese Färbung verändert sich auch nicht nach 60 Minuten. Nach 120 Minuten ist vereinzelt eine schwache zytoplasmatische Färbung sichtbar. Zu

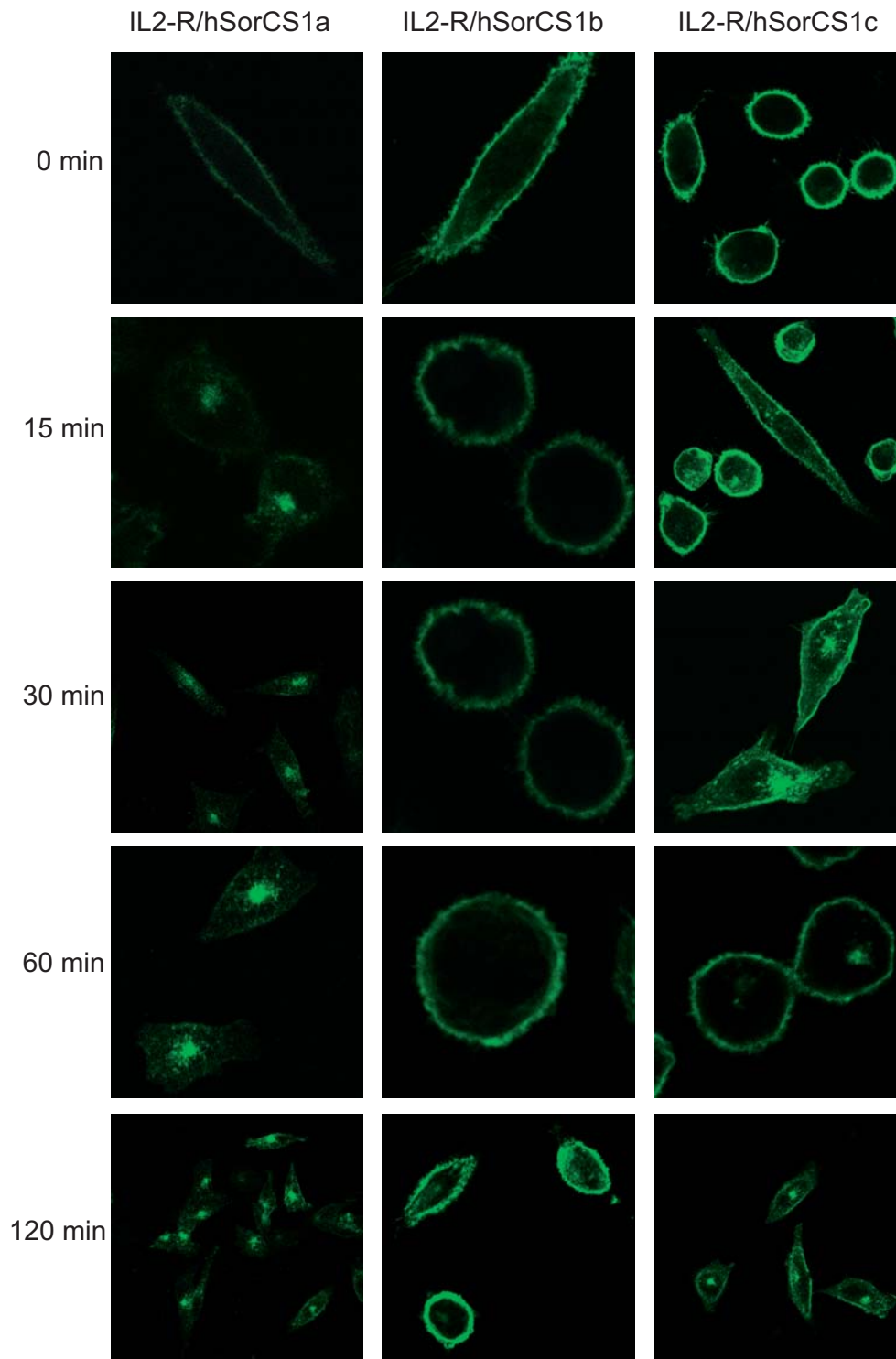


Abb. 12 Internalisierung von IL2-R/hSorCS1a-c. Dargestellt sind am konfokalen Mikroskop aufgenommene CHO-Zellen, die mit den Chimären-Rezeptoren IL2-R/hSorCS1a-c stabil transfiziert wurden. Die Zellen wurden für zwei Stunden mit dem IL2-R monoklonalen Antikörper aus Maus (anti-Tac-Ig) bei 4°C inkubiert, gewaschen, bei 37°C für 0-120 min. inkubiert, danach fixiert, gewaschen und mit einem Fluorescein Isothiocyanate (FITC) gekoppelten Antikörper visualisiert.

Beginn der Internalisation von IL2-R/hSorCS1c wurde eine starke Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche nachgewiesen. Nach 15 Minuten wird vereinzelt eine schwache intrazelluläre Färbung sichtbar, wobei die Zelloberfläche nach wie vor stark angefärbt bleibt. Nach 30 Minuten ist das Zytoplasma stärker angefärbt, doch auch zu diesem Zeitpunkt bleibt die Färbung der Zelloberfläche gleich. Nach 120 Minuten ist eine starke zytoplasmatische, perinukleäre Färbung sichtbar, aber im Gegensatz zur Isoform a, ist die Zelloberfläche immer noch leicht angefärbt.

Eine Zunahme der zytoplasmatischen Färbung, bei gleichzeitiger Abnahme der Zelloberflächenfärbung, ist bei einer Internalisierung eines Antikörpers bei dieser Versuchsanordnung zu erwarten. Für IL2-R/hSorCS1a wurde eine rasche und effektive Internalisierung nachgewiesen. Hingegen internalisierte IL2-R/hSorCS1b kaum, während IL2-R/hSorCS1c eine Zwischenstellung einnahm. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Resultaten, die mit Hilfe des iodierten Antikörpers gewonnen wurden.

3.6 Kolokalisation von IL2-R/hSorCS1-Chimäre und SorCS1-Wildtyp-Rezeptoren

Um zu untermauern, dass die zytoplasmatische Domäne bei der Internalisation entscheidend ist, und dass sich Wildtyp- und Chimäre-Rezeptoren gleich verhalten, wurden weitere Internalisierungsexperimente, diesmal mit doppelt stabil transfizierten Zellen, durchgeführt. Für diese Experimente wurden CHO-Zellen, die jeweils einen der verschiedenen Chimären-Rezeptoren stabil exprimierten, in unterschiedlichen Kombinationen, mit einem cDNA Konstrukt, das für eines der drei hSorCS1 Wildtyp-Rezeptoren kodierte, transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in Gegenwart von Hygromycin und Zeocin selektioniert, und positive Klone im Westernblot und durch Immunzytochemie identifiziert.

Der Internalisierung ging eine zweistündige Inkubation der doppelt transfizierten Zellen mit den monoklonalen Antikörpern Anti-IL2-Rezeptor aus Maus (1:100) und polyklonalen Antikörpern gegen SorCS1 aus Kaninchen (1:3000), bei 4°C voraus. Nach der Inkubation und gründlichem Waschen, wurde eine Zeitreihe von 0, 15, 30, 60, und 120 Minuten gestartet. Zum Zeitpunkt Null wurden alle Zellen mit PBS gewaschen und anschließend nur die Zeitreihe Null mit PBS-Paraformaldehyd fixiert,

während die übrigen Zellen nur gewaschen und mit vorgewärmten Medium für die noch verbliebene Zeit bei 37°C gehalten wurden. Nach der Fixierung und erneutem Waschen, erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit Fluoreszenz markierten Antikörpern (Alexa 488 gekoppelt mit Ziege anti Kaninchen und Alexa 568 gekoppelt mit Ziege anti Maus). Anschließend wurden die Zellen am konfokalen Mikroskop bei Wellenlängen, die den sekundären Antikörpern entsprachen, visualisiert und ausgewertet. Durch die Möglichkeit die einzelnen Bilder überlappend, bzw. die jeweiligen Abbildungen getrennt in ihren spezifischen Anfärbungen am konfokalen Mikroskop zu erfassen, ist eine genaue Lokalisation und Kolo-kalisation der nachgewiesenen Proteine möglich. Die Wildtyp-Isoformen verhielten sich in den Zeitreihen genauso wie die jeweiligen Chimären-Rezeptoren mit der gleichen zytoplasmatischen Domäne. Der Wildtyp-hSorCS1a internalisierte parallel mit IL2-R/hSorCS1a, hingegen internalisierte hSorCS1b nahezu gar nicht und hSorCS1c moderat. Zur Übersicht ist in Abb. 13 das Ergebnis der Internalisierungsexperimente mit den doppelt transfizierten Zellen nach zwei Stunden gezeigt.

Dargestellt ist die Internalisierung der Wildtyp-hSorCS1-Isoformen (grüne Fluoreszenz), im Vergleich zu den Chimären-Rezeptoren (rote Fluoreszenz). In Zellen, die IL2-R/hSorCS1a und hSorCS1b stabil exprimierten, wurde nach zwei Stunden IL2-R/hSorCS1a (rot) intrazellulär, aber zu einem geringen Teil, auch an der Zelloberfläche nachgewiesen. Während hSorCS1b (grün) nur an der Zelloberfläche erscheint, und somit nicht internalisiert wird (Abb. 13A). In der Überlagerung kolokalisieren beide Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die umgekehrte Konstellation, IL2-R/hSorCS1b und hSorCS1a (Abb. 13B), bestätigt das zuvor in Abb. 13A beobachtete Phänomen der differentiellen Internalisierung, jedoch wird entsprechend der zytoplasmatischen Domänen nun der Wildtyp-Rezeptor (hSorCS1a) internalisiert, eine intrazelluläre Grünfärbung ist sichtbar, und der Chimäre-Rezeptor nicht, weshalb die Zelloberfläche rot erscheint. Ein weiteres Experiment zeigt die Doppel-Transfektion von IL2-R/hSorCS1b mit hSorCS1b (13C). Da bekannt ist, dass IL2-R/hSorCS1b nicht internalisiert wird, ist es nicht verwunderlich, dass sowohl hSorCS1b, als auch IL2-R/hSorCS1b nur die Zelloberfläche anfärben, das Zellinnere ungefärbt erscheint und beide Rezeptoren kolokalisieren. Die Färbung des Wildtyp-Rezeptors erscheint im Gegensatz zum Chimären-Rezeptor geclustert. Dieses Phänomen könnte darin

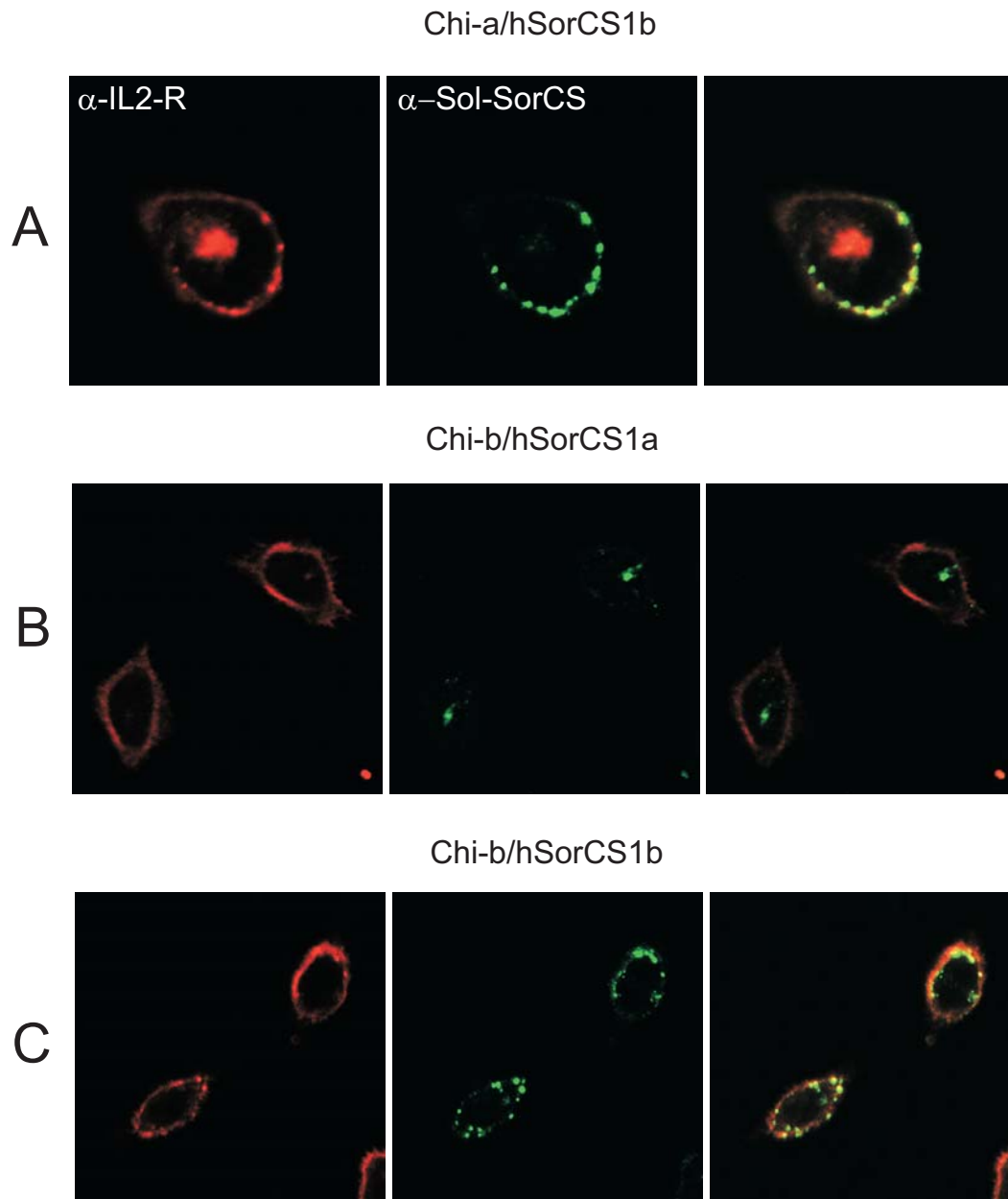
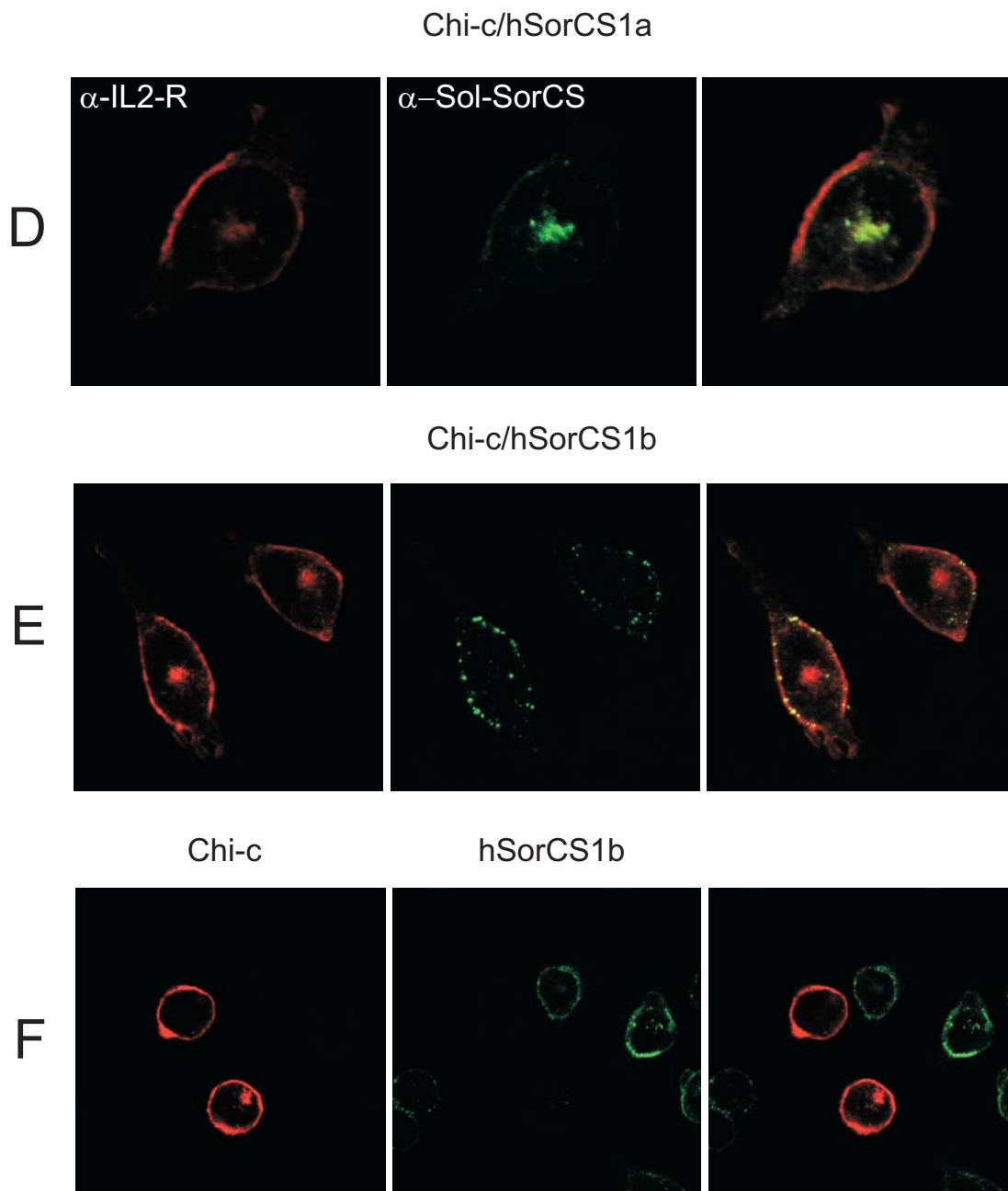


Abb. 13 (diese und nächste Seite) Kollokalisierung von IL2-R/hSorCS1a-c (Chi-a-c) und hSorCS1a-c Wildtypen.

CHO-Zellen, doppeltransfiziert mit einem Chimären-Rezeptor und je einem hSorCS1 Wildtyp, wurden mit primären Antikörpern (Kaninchen anti-SorCS (1:3000) und Maus anti-Tac (1:100)) für zwei Stunden inkubiert. Anschließend gewaschen und zwei Stunden bei 37°C im Medium inkubiert. Dann, nach der Fixierung, mit Fluoreszenz markierten sekundären Antikörpern (Alexa 488 gekoppelt mit Ziege anti-Kaninchen und Alexa 568 gekoppelt mit Ziege anti-Maus) visualisiert.

Gezeigt wird eine Doppelimmunfluoreszenz von Chi-a/hSorCS1b (A), Chi-b/hSorCS1a (B), und Chi-b/hSorCS1b (C), Chi-c/hSorCS1a (D), Chi-c/hSorCS1b (E). Chi-a,-b und-c-Rezeptoren sind rot dargestellt, die hSorCS1a-c Wildtypen grün und die übereinander gelegten Färbungen von Chi-Rezeptoren und Wildtypen rot-grün. Abb. 11 F zeigt nur einfach transfizierte Zellen (Chi-c und hSorCS1b), welche gemeinsam kultiviert und wie oben beschrieben behandelt wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung für Chi-c (rot) und hSorCS1b (grün), und die anschließende Überlagerung der Bilder zeigt, dass die Färbungen sich nicht überlagern.



begründet sein, dass der Antikörper gegen den Wildtyp-Rezeptor ein polyklonaler ist, während der IL2-R Antikörper ein monoklonaler ist.

Die Abbildungen 13D-E zeigen IL2-R/hSorCS1c mit jeweils hSorCS1a und hSorCS1b. Hier zeigt sich, dass IL2-R/hSorCS1c sowohl intrazellulär, als auch auf der Zelloberfläche lokalisiert ist (rot dargestellt), während hSorCS1a nur perinukleär stark grün leuchtet. In der Überlagerung der Färbungen erscheint IL2-R/hSorCS1c mit

hSorCS1a intrazellulär zu kolokalisieren (Abb. 13D). Während IL2-R/hSorCS1c an der Zelloberfläche auch mit hSorCS1b kolokalisiert.

Nicht alle Doppel-Transfektionen waren erfolgreich. Zum Teil resultierten sie in gemischten Populationen von Zellen, die nur mit einem der beiden Rezeptoren stabil transfiziert waren. Solche gemischten Zellpopulationen wurden für Kontrollexperimente verwendet, um die Spezifität der primären Antikörper zu prüfen und um zu zeigen, dass die emittierenden Wellenlängen sich nicht überlagerten, und somit die Experimente korrekt ausgeführt wurden. Abbildung 13 F stellt jeweils die einfache Immunfluoreszenzfärbung von IL2-R/hSorCS1c (rot) und hSorCS1b (grün) stabil transfizierten Zellen dar, und die Übereinanderlegung der beiden Färbungen. Es kommt zu keiner Überlagerung der Färbungen, diese sind somit spezifisch. Die Internalisierungsexperimente der doppelt transfizierten Zellen bestätigen, dass die jeweilige zytoplasmatische Domäne der hSorCS1a-c Isoformen von essentieller Bedeutung ist, für differentielle Internalisierung dieser Spleißvarianten, und dass die Wildtyp-Rezeptoren genauso internalisiert werden, wie die zuvor verwendeten Chimären-Rezeptoren.

4. Diskussion

In nahezu allen biologischen Prozessen spielen Proteine eine entscheidende Rolle. Besonders in ihrer Funktion als Zelloberflächenrezeptoren sind sie unverzichtbar, denn sie können starken Einfluss auf das Verhalten von Zellen nehmen, indem sie extrazelluläre Signale binden, und über unterschiedliche Mechanismen in intrazelluläre Signale umwandeln, oder aber als Importeur von spezifischen Proteinen fungieren, indem sie als endozytische Rezeptoren von der Zelle internalisiert werden, und so essentielle Metabolite in die Zelle einschleusen oder Abbauprodukte zu den Lysosomen transportieren (Marsh und McMahon, 1999; Sorkin und von Zastrow, 2002). Diese rezeptorvermittelte Endozytose vollbringt auch SorCS1, ein Mitglied der Vps10p-Domänen Rezeptorfamilie, dessen Mitglieder wahrscheinlich alle zur Endozytose fähig sind.

Vom humanen SorCS1-Gen sind bisher zwei Isoformen beschrieben worden. Da vom murinen SorCS1 jedoch drei Isoformen bekannt sind, war das Augenmerk dieser Arbeit darauf gerichtet, die dritte Spleißvariante des humanen SorCS1-Gens zu klonieren, und zusammen mit den beiden bereits zuvor identifizierten Isoformen, hSorCS1a und hSorCS1b, eingehend zu charakterisieren. Die unterschiedliche Funktion und Lokalisation der drei Isoformen, wurde durch verschiedene Internalisierungs- und Permeabilisierungsexperimente an stabil transfizierten CHO-Zellen dokumentiert.

Zur Identifizierung und Klonierung der dritten Spleißvariante von hSorCS1, diente als Grundlage die genomische Sequenz des humanen Chromosoms 10.

Da die bereits zuvor klonierten Isoformen, hSorCS1a und hSorCS1b, beide durch alternatives Spleißen eines zusammengesetzten internen/terminalen Exons entstehen, richtete sich die Analyse der genomischen Sequenz besonders auf den Abschnitt zwischen dem Exon 25, welches für hSorCS1a spezifisch ist, und Exon 26, das für hSorCS1b spezifisch ist.

Ein Vergleich der übersetzten analysierten Nukleotidsequenz mit der Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne von murinem SorCS1c, brachte eine homologe Aminosäuresequenz zum Vorschein. Die korrespondierende Nukleotidsequenz präsentierte am 5' und 3' Ende mögliche Spleißstellen, welche mit

Konsensus-Sequenzen von Intron-Exon Grenzen übereinstimmen (Norton, 1994; Goldstrohm et al., 2001). Die humane genomische Sequenz zeigt, bis zur 5' Spleißstelle innerhalb des Exons 25, in Organisation und kodierender Sequenz, Übereinstimmung zum homologen Maus-Gen (Abb. 4). Auch das differentielle Spleißen zeigt Parallelen zum murinen Gen. Allerdings ist die Sequenz, welche für die SorCS1a Isoform spezifisch ist, zwischen Mensch und Maus nicht konserviert. Die Homologie setzt sich erst in dem sich anschließenden Abschnitt, der für SorCS1c kodiert, fort. Während im Maus-Gen das alternative terminale Exon 26 nur für SorCS1c spezifisch ist, ist dieser Abschnitt im humanen Gen ebenfalls Teil der 3' untranslatierten Region von SorCS1a und somit Teil des Exons 25. Bei dem Spleißvorgang für hSorCS1c wird der mittlere Teil dieses Exons herausgespleißt. Der dabei herausgespleißte Sequenzabschnitt ist nicht konserviert, und bedingt nicht nur zwischen den Spezies unterschiedliche Spleißabläufe, sondern bedingt auch nicht konservierte Isoformen. Dieser niedrige Konservierungsgrad ist durchaus ungewöhnlich. Hingegen sind die murinen und humanen SorCS1b und -c Isoformen stark konserviert.

Im Allgemeinen ist das alternative Spleißen von Prä-mRNA ein zentraler und vielseitiger, regulatorischer Mechanismus zur effektiven und quantitativen Kontrolle der Genexpression, sowie zur funktionellen Modifikation und Modulation von Proteinen (Black, 2000; Blencowe, 2005). Alternative Spleißmuster resultieren aus der Verwendung alternativer 5' Spleißstellen, alternativer 3'Spleißstellen, optionaler Exons, einander ausschließender Exons oder zurückgehaltener Introns (Lopez et al., 1998; Goldstrohm et al., 2001). Die Regulation des alternativen Spleißens erfolgt auf eine zell- und gewebespezifische Art und Weise, und ist daher ein integraler Bestandteil von Genexpressionsprogrammen, die zum Beispiel in der Differenzierung des Nervensystems oder der Apoptose eine zentrale Rolle spielen. Die Wahl der Spleißstellen wird zeitlich und räumlich reguliert (Norton, 1994; Smith und Valcarcel, 2000). Für SorCS1 konnte in dieser Arbeit eine differenzielle Expression in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Während die hier getesteten neuronalen Gewebe alle drei Isoformen exprimierten, konnte nur hSorCS1c in fetaler Leber detektiert werden.

Für den 3' Bereich verschiedener Gene wurden unterschiedliche Exon-Arrangements beschrieben (Edwards-Gilbert et al., 1997). Eine Form stellen miteinander konkurrierende Polyadenylierungssignale eines terminalen Exons dar. Diese häufige

Variante bedingt alternative 3' untranslatierte Bereiche und reguliert wahrscheinlich die Stabilität der mRNA. Ein Beispiel hierfür ist die Aldolase B, ein wichtiges Enzym bei der Glykolyse (Maine et al., 1992). Andererseits können Exons ausgelassen werden und stattdessen andere terminale Exons verwendet werden, oder es werden zusammengesetzte interne/terminale Exons in Kombination mit weiteren terminalen Exons benutzt (Edwards-Gilbert et al., 1997). Hierbei wird der kodierende Bereich verändert, so besitzen zum Beispiel die Isoformen verschiedener Typ-I Transmembranrezeptoren meist unterschiedlich lange zytoplasmatische Domänen, gar keine zytoplasmatische Domänen oder sie sind so weit verkürzt, dass lösliche Formen des Rezeptors entstehen, wie zum Beispiel der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor (FGF-Rezeptor) oder der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-Rezeptor), von denen sowohl transmembrane als auch lösliche Formen transkribiert werden (Johnson et al., 1991; Reiter und Maihle, 1996). Ein weiteres Beispiel ist der Apolipoprotein E Rezeptor, für den ein alternatives Transkript gefunden wurde, welches eine Insertion innerhalb der zytoplasmatischen Domäne enthält (Brandes et al., 1997). SorCS1 stellt mithin eine Besonderheit dar, weil sich bis auf die ersten fünf Aminosäuren, die gesamten Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Somit handelt es sich nicht nur um Längenvariationen beziehungsweise Deletionen oder Insertionen innerhalb einer Domäne, sondern um vollständig verschiedene Einheiten. Dieser weitaus größere Unterschied in der Aminosäurekomposition lässt eine enorme funktionelle Variabilität des Rezeptors vermuten.

So besitzen beide SorCS1c-Spezies gegenüber ihren anderen Isoformen jeweils die längsten zytoplasmatischen Abschnitte. Die kürzesten zytoplasmatischen Domänen sind im murinen und humanen SorCS1a zu finden, wobei die murine SorCS1a wesentlich kürzer ist, als die humane Isoform. Es enthält, wie die humane SorCS1a, putative Internalisierungssignale. Sie könnten daher von der Funktion äquivalent zueinander sein, ansonsten weisen sie kaum Homologien auf. Im Gegensatz dazu, sind murines und humanes SorCS1b nahezu identisch. Sie besitzen jedoch in ihren zytoplasmatischen Abschnitten keinerlei Internalisierungssignale, wie es bei hSorCS1a als auch hSorCS1c der Fall ist. Die zytoplasmatischen Domänen von hSorCS1a und -b zeigen wenig Homologie zu zytoplasmatischen Domänen von bekannten Proteinen. Vergleicht man auf der Aminosäureebene die zytoplasmatische Domäne von hSorCS1c mit der des murinen SorCS1c, so stellt man eine Homologie

von 87% fest, und zu ca. 50% zeigt es Übereinstimmungen mit den zytoplasmatischen Abschnitten des menschlichen SorCS2 und SorCS3. Dabei sind einige mögliche funktionelle Motive, wie Internalisierungssignale, zwischen den Rezeptoren konserviert. Dies legt eine funktionelle Ähnlichkeit nahe. Allerdings sind SorCS2 und SorCS3 wenig beschrieben, somit ist ein Rückschluss auf die SorCS1c Funktion nicht zu ziehen.

In allen drei humanen SorCS1 zytoplasmatischen Domänen werden SH3-Domänen Bindemotive präsentiert. SH3-Domänen binden selektiv an prolinreiche Sequenzen und kommen in vielen Adaptorproteinen (AP) vor. Diese Adapterproteine können sowohl eine Funktion im Rezeptor-Clustering haben, als auch intrazelluläre Signale vermitteln (Pawson und Scott, 1997). Ein anderer Typ von Motiven, die in den zytoplasmatischen Domänen von SorCS1 präsentiert werden, sind die Internalisierungssignale. Allgemein sind zwei Gruppen von Internalisierungssignalen bekannt. Die eine Gruppe umfasst Signale, die auf Di-Leucin-Motiven beruhen, wie DXXLL oder D/EXXXLL/I, (X=beliebige Aminosäure); die andere Gruppe basiert auf einem ein Tyrosin enthaltenes Motiv, YXXØ (Ø = eine hydrophobe Aminosäure), (Sandoval und Bakke, 1994; Bonifacino und Traub, 2003). Beide Internalisierungssignale können auch als intrazelluläre Transport- oder Sortierungssignale, zum Beispiel beim Endosomalen- oder Lysosomalen-Transport, fungieren und beide Internalisierungssignale werden sowohl in hSorCS1a als auch in hSorCS1c präsentiert. Die unterschiedliche Präsenz und Position von Bindemotiven und Internalisierungssignalen deuten darauf hin, dass die drei zytoplasmatischen Domänen unterschiedliche Funktionen haben. Die subzelluläre Verteilung unterstreicht diese Annahme. Bei den Internalisierungsexperimenten weisen die Chimären- und Wildtyp-Rezeptoren die gleichen Eigenschaften auf. Während hSorCS1a vornehmlich intrazellulär, perinukleär, lokalisiert ist, werden hSorCS1b und -c auch stark auf der Zellmembran nachgewiesen. Die hier präsentierten immunozytologischen Experimente stehen im Einklang mit Experimenten, in denen durch Biotinylierung von Oberflächenproteinen und anschließender Immunpräzipitation der Anteil von an der Zellmembran präsentierten hSorCS1 Isoformen ermittelt wurde (Hermeijer et al., 2003). Demnach sind nur 10% des gesamten in stabil transfizierten CHO Zellen exprimierten hSorCS1a an der Zelloberfläche zu finden, während 30-40% von hSorCS1b und -c dort nachzuweisen sind. Dies trifft nicht nur auf die Chimären-Rezeptoren zu, sondern auch auf die

Wildtypen (Hermey et al., 2003). Die subzelluläre Verteilung gibt natürlich bereits einen Hinweis auf mögliche Internalisierungskapazitäten, denn Rezeptoren, die vermehrt internalisiert werden, sollten weniger auf der Zelloberfläche zu finden sein. Andererseits kann es auch andere Ursachen haben, dass ein Rezeptor nicht an der Zelloberfläche nachzuweisen ist. So zum Beispiel wenn er gar nicht vermehrt dorthin transportiert wird, oder aber wenn es an der Zelloberfläche zu einer proteolytischen Spaltung (Shedding) kommt. Die subzelluläre Verteilung von hSorCS1a ähnelt der von Sortillin und SorLA, sowie anderen endozytischen Rezeptoren (Nielsen et al., 1999; Jacobsen et al., 2001).

Die hSorCS1b-Isoform vermittelt keine Endozytose, dies ist in Übereinstimmung mit ihrer Akkumulation auf der Zellmembran und dem Fehlen von Internalisierungsmotiven. Dagegen wurden sowohl für hSorCS1a als auch für hSorCS1c Internalisierungsvorgänge nachgewiesen. Wobei hSorCS1a eine wesentlich effektivere und schnellere Internalisierung aufweist, als hSorCS1c. Auch in dieser Hinsicht ist hSorCS1a Sortillin und SorLA ähnlich (Nielsen et al., 1999; Jacobsen et al., 2001).

Die neuronale Lokalisation von SorCS1 wurde in Gewebeschnitten mit einem Antikörper untersucht, der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet war. Mit diesem Antikörper, der alle drei Isoformen nachweist, wurde sowohl eine Oberflächenmarkierung, als auch eine intrazelluläre, vesikuläre Färbung in Neuronen nachgewiesen (Hermey et al., 2001b). Die in den stabil transfizierten CHO-Zellen gefundene differentielle Verteilung der Isoformen könnte diese unterschiedliche Lokalisation in Neuronen erklären.

Eine Besonderheit von SorCS1 ist, dass er innerhalb der Vps10p-Domänen Rezeptor Familie als einziger Isoformen aufweist. Die einzigen beschriebenen Variationen der anderen Mitglieder, sind die löslichen Formen von SorLA und Sortilin (Hampe et al., 2000; Navarro et al., 2002; Zhu et al., 2004). Allerdings werden diese durch Shedding, also eine posttranslationale Modifikation des Proteins, generiert. Für SorCS1 konnte ebenfalls eine lösliche Form durch entsprechende Experimente nachgewiesen werden (Hermey et al., 2006). Mit den in dieser Arbeit hergestellten Zelllinien, wird es in zukünftigen Experimenten möglich sein, die postproteolytischen Ereignisse aufzuklären. Generationen von Rezeptoren könnten schon transkriptionell verglichen werden. So wurde für einige Rezeptoren, welche lösliche Formen besitzen, gezeigt, dass diese sowohl durch alternatives Spleißen, als auch durch

Shedding generiert werden können, wie zum Beispiel der Interleukin 6-Rezeptor (März et al., 1999). Ob es weitere Spleißvarianten gibt, die zum Beispiel auch für eine lösliche Form von SorCS1 kodieren, muss durch die Analyse von genomischen Sequenzen und molekularbiologische Versuche geklärt werden.

Die hier gezeigten Internalisierungsexperimente haben die Frage offen gelassen, wohin SorCS1a beziehungsweise -c endozytiert werden. Für Sortilin konnte diese Frage jedoch bereits beantwortet werden, und zwar wurde der Rezeptor nach der Endozytose in frühen Endosomen nachgewiesen (Nielsen et al., 2001). Dies wäre ebenfalls für die beiden SorCS1-Isoformen denkbar. Der weitere intrazelluläre Weg könnte den Rezeptor zu Lysosomen führen, er könnte aber auch zurück an die Zelloberfläche geschleust, also recycelt, werden. Weitere Internalisierungsexperimente, gefolgt von Koloalisationen des endozytierten Rezeptors mit entsprechenden Antikörpern, die gegen Markerproteine gerichtet sind, könnten über den Verbleib des Rezeptors nach der Internalisierung Auskunft geben.

Neuere Daten zeigen, dass SorCS1 möglicherweise auch an der Entstehung von Typ 2 Diabetes beteiligt ist. In diesen Experimenten wurden in adipösen Leptin-Knockout-Mäusen vermehrt SorCS1 Transkripte in den Langerhanschen Inseln des Pankreas nachgewiesen. Dabei wurde in terminalen Exons zwei der drei kodierenden Varianten gefunden. Es handelt sich hierbei um den Austausch einer einzigen Aminosäure in den zytoplasmatischen Domänen von murinem SorCS1a ($S^{20} \rightarrow F$) und mSorCS1c Gen ($S^{30} \rightarrow P$) (Clee et al., 2006). Beide Aminosäurereste haben anscheinend nichts mit Internalisierungsprozessen zu tun, sie sind jedoch möglicherweise ein Ziel zur Phosphorylierung. Somit scheint die Entstehung von Typ 2 Diabetes unabhängig von der Internalisierung und subzellulären Verteilung von SorCS1 zu sein. Entscheidende Fragen, die zukünftig zu beantworten sein werden, um die Funktion von SorCS1 weitergehend zu verstehen, sind: Welche Liganden außer PDGF bindet dieser Rezeptor? Diese werden nicht nur von SorCS1a und -c internalisiert und transportiert werden, sondern könnten auch durch die nicht-internalisierende hSorCS1b-Isoform eine Signaltransduktion vermitteln. Welche Rolle spielt es bei der Früherkennung bzw. Entstehung des Typ 2 Diabetes? Bereits jetzt kann SorCS1 als ein multifunktionaler Rezeptor betrachtet werden, weil die identifizierten Isoformen unterschiedliche zelluläre Funktionen vermitteln.

5. Material und Methoden

5.1 cDNA Synthese und Polymerasekettenreaktionen (PCR)

5.1.1 Primer Design

Es wurden Primer eingesetzt, die zur humanen SorCS1-Sequenz korrespondieren. Zur Erzeugung von chimären Expressionskonstrukten enthielten die Primer gleichzeitig die passenden Schnittstellen zur weiteren Klonierung. Alle Primer wurden mit dem Computerprogramm Oligo (Structure, Version 3.4) auf ihre Schmelztemperaturen überprüft.

Für die Identifizierung von hSorCS1c wurden Primer von der vorhergesagten cDNA Sequenz abgeleitet.

Vorwärtsgerichteter Primer: 5'- TAC CCA CCA CTG CTG AAC TCT TG-3'

Rückwärtsgerichteter Primer: 5'- TGG TGG CTA CTG GGA ATC ATT TAC-3'

Für die Klonierung der gesamten hSorCS1c cDNA wurde der gleiche rückwärtsgerichtete Primer verwendet. Ein vorwärtsgerichteter Primer wurde von der vorhergesagten gesamten cDNA Sequenz abgeleitet.

Vorwärtsgerichteter Primer: 5'- CTC CCG CGA TGG GAA AAG TTG GC-3'

Zur Untersuchung der differentiellen Expression wurde jeweils der gleiche vorwärtsgerichtete Primer und ein isoformspezifischer rückwärtsgerichteter Primer verwendet:

Vorwärtsgerichteter Primer: 5'- TAC CCA CCA CTG CTG AAC TCT TG-3'

Rückwärtsgerichteter Primer für hSorCS1a: 5'- TTA ATA GAA ACC ATC ACT GCT ATG-3'

Rückwärtsgerichteter Primer für hSorCS1b: 5'- CTC CCG CGA TGG GAA AAG TTG GC-3'

Rückwärtsgerichteter Primer für hSorCS1c: 5'- TGG TGG CTA CTG GGA ATC ATT TAC-3'

Für die Klonierung der chimären Expressionskonstrukte wurden folgende Primer verwendet:

IL2-R/hSorCS1a (Chi-a)

Vorwärtsgerichteter Primer: 5'-TCGT AAG CTT AAG TTT AAA AGG TGC G-3'

Rückwärtsgerichteter Primer: 5'-CCT CTC GAG TTA ATA GAA ACC ATC ACT GCT ATG-3'

IL2-R/hSorCS1b (Chi-b)

Vorwärtsgerichteter Primer: 5'-CGTC AAG CTT AAG TTT AAA AGG AGA GTA GCT TTA CCC-3'

Rückwärtsgerichteter Primer: 5'-GGGG CTC GAG TTA AAT TGC ATA CTG TGC CCC AGC AGA TCC -3'

IL2-R/hSorCS1c (Chi-c)

Vorwärtsgerichteter Primer: 5'^C AAG CTT AAG TTT AAA AGG AAG ATC-3'

Rückwärtsgerichteter Primer: 5'-TAC CTC GAG TCA TTT ACC TAT GAG C-3'

Unterstrichen sind jeweils die eingeführten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme HindIII (im vorwärtsgerichteten Primer) und XhoI (im rückwärtsgerichteten Primer).

5.1.2 Reverse-Transkriptions- (RT-) PCR und cDNA Synthese

Als Matrize zur Erststrang-Synthese diente totale RNA, die aus humaner fetaler Leber, fetalem Gehirngewebe, adultem Cerebellum oder adultem Gehirngewebe gewonnen wurde (Clontech). 1µg totale RNA wurde zusammen mit 40pmol Primern für 10 Minuten bei 94°C denaturiert und danach in einen auf 42°C vorgewärmten Reaktionsansatz, (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM Mg₂Cl, 0,5mM dNTPs, 200mM DTT), überführt. Anschließend wurden 200 Units Reversetranskriptase, die keine RNase H Aktivität besitzt (SuperScript II, Gibco BRL), hinzugegeben. Bei einer Temperatur von 42°C und einer Reaktionszeit von 55 Minuten, wurde der erste Strang der cDNA synthetisiert. Die Reaktion wurde

dann für 15 Minuten auf 70°C überführt, um sie zu beenden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten auf Eis inkubiert, und dann bei einer Temperatur von 37°C für 20 Minuten mit RNase H (Amersham Pharmacia) verdaut. Im Anschluss folgte eine Zwei-Schritt-PCR nach folgendem Protokoll:

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 9 min.
 2. 30 sek. bei 94°C
 3. 5 min. bei 68°C
 4. 8 min. bei 68°C
- 40 Zyklen: Schritt 2-3.

Es wurde für die Zwei-Schritt-PCR ein Reaktionsansatz wie unter 5.1.3. beschrieben verwendet.

5.1.3 Polymerasekettenreaktionen (PCR)

Bei PCR-Reaktionen wurde die Time Release Methode angewendet und im Robocycler von Stratagene mit beheiztem Deckel durchgeführt. Hierbei wurde folgender Reaktionsansatz, der sich aus Primern, Oligonukleotiden, DNA-Matrize und Puffern zusammensetzte, verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 1,5 mM MgCl₂, 5mM dNTPs, 10 µM des vorwärts- sowie des rückwärtsgerichteten Primers, 10-50 ng DNA-Matrize und Reaktionspuffer, entsprechend den Angaben des Herstellers. Das Volumen dieser Reaktionen betrug 50 µl.

Als Enzym wurde die hitzestabile Thermo aquaticus (Taq)-DNA Polymerase (Ampli Taq Gold von Perkin Elmer) eingesetzt, die erst nach einer neunminütigen initialen Denaturierung bei 94°C ihre Aktivität entfaltet, da dann der sie inhibierende Antikörper abgespalten wird.

Auch bei diesen Reaktionen wurde eine „Zwei-Schritt PCR“ durchgeführt. Allerdings nur für die chimären Konstrukte von IL2-R/hSorCS1a und IL2-R/hSorCS1b. Dementsprechend wurden die Primer so eruiert, dass sie sich bei einer Temperatur von 68°-72°C an die DNA-Matrize anlagern. Ein Zyklus bestand bei diesen Reaktionen aus einer Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C, einem zusammengefassten Annealing- und Elongations-Schritt für 1,5 Minuten bei

68°C. Dieser Zyklus wurde 35-mal wiederholt. Die sich anschließende finale Elongation wurde für 10 Minuten ebenfalls bei 68°C durchgeführt.

Für das chimäre Konstrukt von IL2-R/hSorCS1c erfolgte das Anealing und die Elongation bei zwei unterschiedlichen Temperaturen, da die Anealing-Temperatur nicht höher als 60°C sein dürfte, um ein optimale Primeranlagerung zu gewährleisten.

Hierbei wurde folgendes PCR-Protokoll angewendet:

1. 9min. 94°C
 2. 30sek. 94°C
 3. 30sek. 60°C
 4. 2min. 68°C
 5. 10min. 68°C
- 35 Zyklen: Schritt 2-4

Als DNA-Matrize dienten zuvor klonierte hSorCS1a, hSorCS1b, und hSorCS1c cDNAs.

Die so entstandenen PCR-Produkte wurden in den pGem-T-easy Vektor (Promega) subkloniert und sequenziert. Nach Bestätigung der richtigen Sequenz, wurden die cDNAs mit Hind III und XhoI verdaut. Die PCR-Fragmente erhielten somit die passenden Schnittstellen, um sie anschließend in die Expressionskonstrukte zu ligieren.

5.2 Klonierungstechniken

5.2.1 Auftrennung und Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Analyse von Plasmid-Präparationen, Restriktionsverdauen und zur Isolierung von DNA-Fragmenten, dienten Agarosegele in Elektrophorese-Gelkammern, in denen die aufzutrennende DNA aufgetragen wurde. Seakem LE-Agarose (FMC) wurde in 1xTAE-Puffer (0,2 M Tris-Acetat, 10mM EDTA pH8) gelöst, anschließend kurz aufgeköcht und mit 1µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die

Konzentration der Agarosegele hing von der Größe der DNA Fragmente ab. Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet. Die Probe wurde dann bei einer Laufgeschwindigkeit 5-10 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt.

DNA enthaltene TAE-Agarosestücke wurden unter UV-Licht (bei 360nm) ausgeschnitten.

Anschließend unter Verwendung des „QIA quick Gel Extraction Kits“ nach Anleitung des Herstellers (QIAGEN) extrahiert.

5.2.2 Subklonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das pGem-T-Easy Vector System (Promega) verwendet. Dieses Klonierungssystem macht sich die nicht Ziel-DNA abhängige Aktivität der in der PCR benutzten thermostabilen Polymerase zu eigen, mit deren Hilfe ein 3'-Desoxyadenosin an Doppelstrangmoleküle angefügt wird. Da der Plasmidvektor einen Thymidin-Überhang besitzt, wird durch das 3'-Desoxyadenosin ein direktes Inserieren des PCR-Fragmentes in den pGem-T-Easy Vektor erleichtert, da es sich um „sticky ends“ handelt. Der so ligierte Vektor wurde anschließend in kompetente E.coli DH5 α transformiert.

5.2.3 Ligation von DNA Fragmenten

Ligationen wurden mittels der T4-Ligase (Promega oder Amersham Pharmacia) durchgeführt. Insert und Plasmid wurde bei 4°C in Anwesenheit des entsprechenden Ligationspuffers über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Transformation.

5.2.4 Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien (E.coli, DH5 α) wurden entsprechend allgemeiner Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) hergestellt und freundlicherweise von

Marie Halverson zur Verfügung gestellt. 50-75µl kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 5µl eines Ligationsansatzes versetzt, dann anschließend für 30 Minuten auf Eis gelegt und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 450µl LB-Medium (ohne Ampicillin), wurde es in einem Schüttler bei 37°C für 30-40 Minuten inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen des Transformationsansatzes auf Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert (Sambrook et al., 1989).

Zur Herstellung einer blau/weiß Selektion wurde zusätzlich auf die Agarose-Platte 20µl IPTG + 40µl β-Gal hinzugefügt, und dann mit dem Reaktionsansatz vermischt. Kam es zur Bildung von weißen Kolonien, wurde das Insert erfolgreich hineinligiert. Blaue Kolonien sprachen für eine nicht erfolgte Ligation.

5.2.5 Mini- und Maxipräparation von DNA aus Bakterien

Minipräparation von DNA wurde mit Hilfe des Qiagen Miniprep Kits durchgeführt, Maxipräparation von DNA wurde mit Hilfe des Maxiprep Kits von Clontech durchgeführt und es wurde jeweils exakt nach den Angaben des Herstellers verfahren.

5.2.6 Sequenzierung von DNA

1µg DNA wurde entweder über Nacht luftgetrocknet oder in einer Vakuum Zentrifuge getrocknet, und anschließend kommerziell durch die Firma MWG sequenziert.

5.3 Herstellung von eukaryontischen Expressionskonstrukten

Um chimäre Rezeptoren in CHO-Zellen exprimieren zu können, wurden entsprechende eukaryontische Expressionsvektoren konstruiert. Dazu dienten die zuvor mittels PCR gewonnenen cDNA Fragmente mit den passenden

HindIII/XhoI Schnittstellen, der pcDNA3.1/Zeo(+) Vektor (Invitrogen) und ein cDNA-Fragment, das für den extrazellulären und transmembranen Anteil des Interleukin-2-Rezeptors (IL2-Rezeptor) kodiert (freundlicherweise überlassen von Dr. Susan E. LaFlamme). Durch das Schneiden des Vektors mit den Restriktionsenzymen NheI und XhoI, der für IL2-Rezeptor kodierenden cDNA mit NheI und HindIII, sowie den für die hSorCS1 zytoplasmatischen Teile kodierenden cDNAs mit HindIII und XhoI, wurden die gewünschten Fragmente für die sich anschließende Ligation geschaffen. Die Ligation der jeweiligen cDNA (kodierend für einen der drei möglichen zytoplasmatischen Domänen von hSorCS1) mit dem Vektor und der IL2-Rezeptor-cDNA, ergab den chimära IL2/hSorCS1-Rezeptor.

Zur Herstellung von Expressionskonstrukten, die hSorCS1-Isoformen in voller Länge kodieren und Zellen eine Hygromycinresistenz vermitteln, wurden diese mittels der Restriktionsenzyme NheI und NotI aus zuvor generierten Plasmiden, welche die cDNAs enthielten, und freundlicherweise von Guido Hermeijer zur Verfügung gestellt wurden, herausgeschnitten und in den Expressionvektor pcDNA3.1/Hygro(-) hineinligiert.

5.4 Transfektion von eukaryontischen Zellen und Zellkultur

5.4.1 Transfektion von CHO-Zellen und Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Für diesen Vorgang wurden CHO-Zellen in 6-Loch-Platten in zeocinfreiem Nährmedium ausgesät. Sobald sie eine Konfluenz von 30-50% erreicht hatten, konnte mit der Transfektion begonnen werden. Die Transfektion von Zellen erfolgte mit FuGene 6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals). Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und 2 ml frisches, zeocinfreies Medium hinzugegeben.

In einem separaten Tube wurden 2-5µl bzw. ca. 2µg DNA (IL2/hSorCS1-pcDNA3.1-Zeo) vorgelegt. In einem zweiten Tube, gefüllt mit 150µl HyaCCM-Medium mit Penicillin/Streptomycin (P/S) (ohne Zeocin), wurde 12µl FuGene

langsam in die Mitte des Tubes pipettiert, und dann leicht gemischt. Anschließend wurde die FuGene-Medium-Lösung tropfenweise zur DNA gegeben, danach leicht gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung zu den Zellen pipettiert, und anschließend für zwei Tage bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen umgesetzt. Das alte Medium wurde abgesaugt, anschließend wurden die Zellen trypsinisiert (1ml Trypsin wurde zu den Zellen gegeben, diese kurz geschwenkt, das überschüssige Trypsin abgesaugt, und 40 Sekunden bei 37°C inkubiert) und in 2ml Medium resuspendiert, so dass die Zellen vereinzelt waren. Davon wurden 250µl zu 65ml HyaCCM-Medium P/S, welches 300µg/ml Zeocin (Invitrogen) enthielt, gegeben. Anschließend wurden auf drei 96-Loch-Platten 200µl der Zell/Medium Mischung pro Loch verteilt und für ca. zwei Wochen bei 37°C im Zellinkubator gehalten. Schließlich wurden einzelne Zellklone mit Hilfe der Immunzytochemie und Western Blot-Analyse gescreent. Die positiv transfizierten Zellen wurden dann in 24 Well Plates überführt und für weitere Experimente im Wärmeschrank aufbewahrt oder im flüssigen Stickstoff eingefroren.

Doppelt transfizierte Zelllinien wurden hergestellt, indem die zuvor mit IL2/hSorCS1-Rezeptoren stabil transfizierte Zellen zusätzlich mit hSorCS1-pcDNA3.1-Hygro mittels Fugene, erneut transfiziert wurden. Die Zellen wurden anschließend in 96-Loch-Platten in Gegenwart von 300µg/ml Zeocin und 500µg/ml Hygromycin (Invitrogen) selektioniert. Anschließend wurden einzelne Zellklone, ebenfalls mit Hilfe der Immunzytochemie und Western-Blot-Analyse, gescreent.

5.4.2 Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeit wurde an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

Zellen wurden zum permanenten Lagern zunächst mit Hilfe von Trypsin von Zellkulturflaschen gelöst, in Medium resuspendiert, abzentrifugiert und in Einfriermedium (20% DMSO, 20% fötales Kälberserum, 60% Medium) resuspendiert und langsam auf -80°C abgekühlt, und dann anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

5.4.3 Screenen von stabil transfizierten Zellen mittels Western-Blot-Analyse

Bei diesem Verfahren wurden die zuvor transfizierten Zellen auf Eis gelegt und mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen aus den 96 Well Plates mit der Pipette abgeschabt und unter Sichtkontrolle in vorgekühlte 2ml Eppendorftubes überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 10.000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 50µl eiskaltem Lysispuffer (1% Triton X-100, 20mM Tris HCL, 10mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation der Zelldebris abgetrennt.

Für die Western-Blot-Analyse wurden 30µl der Zellprobe mit 10µl reduzierenden Sample Buffer (0,01M DTE) versetzt, kurz gevortext und für 3-5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurde es auf ein Polyacrylamid Gel (8% Sammelgel, 16% Trenngel) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Grössenabschätzung wurde parallel ein Molekulargewichtsstandard (Prestained Standard, Oncogene) aufgetragen.

Mittels eines „Wet-Blots“ wurden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF (Polyvinyliden Fluorid) (Biorad) übertragen. Zunächst wurde die Blotmembran mit Ethanol aktiviert und anschließend in Wasser und Blotting-Puffer (250mM Tris, 1,92M Glycin, pH 8,5) gewaschen. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte in einer Wasser gekühlten Blotting-Kammer (Biorad), in welcher Membran und Gel vollständig bedeckt waren, bei 100V und 200mA für 2 Stunden. Die Membran wurde dann über Nacht in 20ml TBST (500mM Natriumchlorid, 20mM Tris/HCl pH7,5, 20% Tween) mit 2% Milchpulver blockiert. Darauf wurde die Membran in TBST gewaschen und dann mit primärem Antikörper (Polyklonaler Anti-IL2-Rezeptor aus Ziege 1:5000 in TBST verdünnt, oder polyklonaler Anti-SorCS1 aus Kaninchen, 1:1000) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST, erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Schwein-Anti-Ziege mit Horse-Redish-Peroxidase konjugiert, oder Schwein-Anti-Kaninchen DAKO, 1:1000 in TBST verdünnt). Anschließend folgte ein finales

Waschen mit TBST und eine Visualisierung mittels ECL (AP Biotech) und eines Chemilumineszenz-Dokumentationsgerätes (Fuji).

5.4.4 Screenen von stabil transfizierten Zellen mittels Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden die Zellen aus den 96 Well Plates trypsinisiert, und in 1ml Medium resuspendiert. Davon wurden 200µl in eine Kammer eines Chamber Slides mit acht Kammern überführt und mit weiteren 200µl Medium je Kammer aufgefüllt. Damit sich die Zellen in den Chamber Slides in Ruhe ausdifferenzieren konnten, kamen sie für zwei Tage in den 37°C warmen CO₂ Zellinkubator.

Nach zwei Tagen wurde das alte Medium abgesaugt, und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit PBS/Paraformaldehyd (1xPBS, 4% Paraformaldehyd) für 30 Minuten fixiert. Danach wurden sie fünfmal mit PBS-Triton (1x PBS, 0,05% Triton X-100) gewaschen, ehe der erste Antikörper – pro Loch 75µl – hinzu gegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur oder aber über Nacht bei 4°C. Für die IL2-Chimera Experimente wurde als primärer Antikörper ein monoklonaler Maus Anti-IL2-Rezeptor Antikörper von Boehringer Mannheim, 1:100 in PBS-Triton verdünnt, verwendet. Zum screenen einer hSorCS1 Transfektion, wurden die Zellen mittels eines polyklonalen Kaninchen Anti-SorCS1 Antikörper, welcher gegen den luminalen/extrazellulären Teil von hSorCS1 gerichtet ist, und freundlicherweise von Guido Hermeijer zur Verfügung gestellt wurde, gescreent.

Nach der Inkubationszeit wurde wieder fünfmal mit PBS-Triton gewaschen, und dann mit dem zweiten Antikörper (Kaninchen-Anti-Maus oder Schwein-Anti-Kaninchen Fluorescein Isothiocyanate (FITC) gekoppelt, DAKO, 1:100 eingesetzt) im dunkeln und bei Raumtemperatur für weitere zwei bis drei Stunden inkubiert.

Danach erfolgte die letzte Waschprozedur. Anschließend wurden die Kammern der Chamber Slides entfernt und die Zellen mit Fluorescent Mounting Medium (DAKO) eingedeckelt und am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

5.5 Nachweis und Lokalisation von Proteinen in permeabilisierten Zellen

Stabil transfizierte Zellen wurden in Chamber Slides ausgesät und für ein bis zwei Tage wachsen gelassen, so dass sie etwa 30% konfluent waren. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS-Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS/Triton gewaschen und mit dem ersten Antikörper (Maus Anti-IL2-Rezeptor Antikörper von Boehringer Mannheim, 1:100 in PBS/Triton verdünnt) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS/Triton und eine zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Kaninchen Anti-Maus FITC gekoppelt, DAKO, 1:100 eingesetzt). Nach einem erneuten dreimaligen Waschen mit PBS/Triton, wurden die Kammern der Chamber Slides entfernt, und die Zellen mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt, und die Färbungen am konfokalen Mikroskop (LSM510, Axiovert Carl Zeiss) dokumentiert.

5.6 Internalisierungsexperimente mit nicht iodiertem Antikörper

Für diese Experimente wurden die zuvor stabil transfizierten Zellen in vierer Chamber Slides dünn ausgesät und für ein bis zwei Tage wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 200µl Medium, in dem der erste Antikörper verdünnt war, für zwei bis drei Stunden bei 4°C inkubiert. Als erster Antikörper diente der Anti-IL2-Rezeptor monoklonale Antikörper aus Maus von Boehringer, dieser wurde 1:100 verdünnt oder für Doppelmarkierungen der polyklonale Antikörper gegen SorCS1 aus Kaninchen, welcher 1:3000 eingesetzt wurde. Nach der Inkubationszeit wurde eine Zeitreihe von 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten gestartet. Bei der Zeit Null wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und mit PBS-Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert. Die anderen Zellen wurden in den Chamber Slides dreimal mit PBS gewaschen, die Chamber Slides mit 500µl vorgewärmten Medium aufgefüllt und für die angegebenen Zeiten bei 37°C im CO₂ Inkubator gehalten. Nach 15, 30, 60, oder 120 Minuten wurden diese Zellen gewaschen und fixiert. Nach der Fixierung wurden alle Zellen erneut mit PBS gewaschen, und dann mit einem Fluoreszenz markiertem

sekundären Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Kaninchen-Anti-Maus Fluorescein Isothiocyanate (FITC) gekoppelt, DAKO, 1:100 in PBS/Triton verdünnt oder für die Doppelmarkierungsexperimente wurden Alexa 488 gekoppelt mit Ziege-Anti-Kaninchen und Alexa 568 gekoppelt mit Ziege-Anti-Maus verwendet). Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben eingedeckelt.

5.7 Internalisierungsexperimente mit iodiertem Antikörper

Gleiche Mengen von stabil transfizierten und nicht transfizierten CHO-Zellen wurden ausgesät und ca. zwei Tage wachsen gelassen, bis sie eine Konfluenz von 50% aufwiesen. Es wurden immer zwei verschiedene Zelllinien gleichzeitig in je fünf 4 Well Plates bearbeitet, um einen direkten Vergleich erzielen. Die nicht transfizierten CHO-Zellen dienten als negative Kontrolle. Iodierter Maus Anti-IL2-Rezeptor Antikörper (Boehringer Mannheim) wurde freundlicherweise von Nina Jørgensen zur Verfügung gestellt.

Zu Beginn des Iodierungsexperimentes stand die Tracer-Einstellung. Es wurden 4000cpm/ 300µl CHO-Medium für ein Loch (Well) eingesetzt. Die Zellen wurden für zwei Stunden bei 4°C mit dem iodierten Antikörper inkubiert. Ungebundener Tracer wurde durch dreimaliges waschen mit eiskaltem PBS entfernt. Nach Zugabe von vorgewärmtem Medium wurden die Zellen für 0, 5, 15, 30, 60, oder 120 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gelegt, das Medium abgesaugt, und die Zellen für fünf Minuten auf Eis mit eiskaltem Säurepuffer (0,5M NaCl, 0,5M Acetic Acid, pH 2,3) behandelt. Darauf wurde der Säurepuffer in ein Zählrohr überführt. Im Anschluss wurden die Zellen für zweimal zehn Minuten mit 1M NaOH behandelt, und diese Lösungen wurden ebenfalls in ein Zählrohr überführt. Sämtliche Fraktionen wurden im Gammacounter (Beckmann) analysiert. Die durch die Säurebehandlung freigesetzte Radioaktivität wurde als mit der Zelloberfläche assoziierter Antikörper, und die durch die NaOH Behandlung freigesetzte Radioaktivität als internalisierter Antikörper definiert. Dieses Experiment wurde für jede Zelllinie dreimal durchgeführt.

6. Literaturverzeichnis

Andersen, O.M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C.A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K.R., Cappai, R., Masters, C.L., Gliemann, J., Mufson, E.J., Hyman, B.T., Paul, S.M., Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2005) Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 13461-13466.

Barker, A. (2004) p75^{NRT} is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, 42, 529-533

Birn, H., Verroust, P.J., Vexø, E., Hager, H., Jacobsen, C., Christensen, E.I., and Moestrup, S.K. (1997) Characterization of an epithelial ~460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B₁₂ and binds receptor associated protein. *J. Biol. Chem.* 272, 26497-26504

Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395-447

Bork, P., Downing, A., Kieffer, B., and Campbell, I.D. (1996) Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q. Rev. Biophys.* 29, 119-167

Brandes, C., Novak, S., Stockinger, W., Herz, J., Schneider, W.J., and Nimpf, J. (1997) Avian and murine LR8B and human apolipoprotein E receptor 2: differentially spliced products from corresponding genes. *Genomics* 42, 185-191

Edwards-Gilbert, G., Veraldi, K.L., Milcarek, C. (1997) Alternative poly (A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res.* 25, 2547-2561

Gliemann, J. (1998) Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands. *Biol. Chem.* 379, 951-964

Gliemann, J., Hermey, G., Nykjaer, A., Petersen, C.M., Jacobsen, C., and Andreasen, P.A. (2004) The mosaic receptor sorLA/LA11 binds components of the plasminogen-activating system and platelet-derived growth factor-BB similarly to LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), but mediates slow internalization of bound ligand. *Biochem. J.* 381, 203-212

Goldstrohm, A.C., Greenleaf, A.L., Garcia-Blanco, M.A. (2001) Co-transcriptional splicing of pre-mRNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene* 277, 31-47

Hampe, W., Urny, J., Franke, I., Hoffmeister-Ullerich, S.A.H., Herrmann, D., Petersen, C.M., Lohmann, J., and Schaller, H.C. (1999) A head-activator binding protein present in hydra in a soluble and a membrane-anchored form. *Development* 126, 4077-4086

Hampe, W., Riedel, I.B., Lintzel, J., Bader, C.O., Franke, I., and Schaller, H.C. (2000) Ectodermal shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *J. Cell Sci.* 113, 4475-4485

Hampe, W., Rezgaoui, M., Hermans-Borgmeyer, I., and Schaller, H.C. (2001) The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons. *Hum. Genet.* 108, 529-536

Hermans-Borgmeyer, I., Hampe, W., Schinke, B., Methner, A., Nykjaer, A., Süsens, U., Fenger, U., Herbarth, B., and Schaller, H.C. (1998) Unique expression pattern of a novel mosaic receptor in the developing cerebral cortex. *Mech. Develop.* 70, 65-76

Hermans-Borgmeyer, I., Hermey, G., Nykjaer, A., and Schaller, H.C. (1999) Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 65, 216-219

Hermey, G., Riedel, I.B., Hampe, W., Schaller, H.C., and Hermans-Borgmeyer, I. (1999) Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 347-351

Hermey, G., and Schaller, H.C. (2000) Alternative splicing of murine SorCS leads to two forms of the receptor that differ completely in their cytoplasmic tails. *Biochim. Biophys. Acta* 1491, 350-354

Hermey, G., Schaller, H.C., and Hermans-Borgmeyer, I. (2001a) Transient expression of SorCS in developing telencephalic and mesencephalic structures of the mouse. *NeuroReport* 12, 29-32

Hermey, G., Riedel, I.B., Rezgaoui, M., Westergaard, U.B., Schaller, C., and Hermans-Borgmeyer, I. (2001b) SorCS1, a member of the novel sorting receptor family, is localized in somata and dendrites of neurons throughout the murine brain. *Neurosci. Lett.* 313, 83-87

Hermey, G., Keat, S.J., Madsen, P., Jacobsen, C., Petersen, C.M., and Gliemann, J. (2003) Characterization of sorCS1, an alternative splice receptor with completely different cytoplasmic domains that mediate different trafficking in cells. *J. Biol. Chem.* 278, 7390-7396

Hermey, G., Plath, N., Hübner, C.A., Kuhl, D., Schaller, H.C., and Hermans-Borgmeyer, I. (2004) The three sorCS genes are differentially expressed and regulated by synaptic activity. *J. Neurochem.* 88, 1470-1476

Jacobsen, L., Madsen, P., Moestrup, S.K., Lund, A.H., Tommerup, N., Nykjaer, A., Sottrup-Jensen, L., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1996) Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the α_2 -macroglobulin receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* 271, 31379-31383

Jacobsen, L., Madsen, P., Jacobsen, C., Nielsen, M.S., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (2001) Activation and functional characterization of the mosaic receptor sorLA/LR11. *J. Biol. Chem.* 276, 22788-22796

Jacobsen, L., Madsen, P., Nielsen, M.S., Geraerts, W.P.M., Gliemann, J., Smit, A.B., Petersen, C.M. (2002) The sorLA cytoplasmatic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding. *FEBS Lett.* 511, 155-158

Johnson, D.E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L.T. (1991) The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4627-4634

Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2004) Neurobiology: A move to sort life from death. *Nature* 427, 843-848

Kikuno, R., Nagase, T., Ishikawa, K., Hirosawa, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1999) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 6, 197-205

LaFlamme, E.S., Thomas, L.A., Yamada, S.S., and Yamada, K.M. (1994) Single subunit chimeric integrins as mimics and inhibitors of endogenous integrin functions in receptor localization, cell spreading and migration, and matrix assembly. *J. Cell Biol.* 126, 1287-1298

Lopez, A.J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: Developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* 32, 279-305

März, P., Otten, U., and Rose-John, S. (1999) Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2995-3004

Maine, A.B., Stauffer, J.K., Tolan, D.R., and Ciehek-Baez, E. (1992) Unique use of alternative polyadenylation signals in the mouse aldolase B gene. *Biochem. Biophys. Acta* 1129, 243-245

Marcusson, E., Horazdovski, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., Emr, S.D. (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS 10 gene. *Cell* 77, 579-586

Marsh, M., and McMahon, T. (1999) The structural era of endocytosis. *Science* 285, 215-220

Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.-P., and Vincent, J.-P. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/Sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 26273-26276

Motoi, Y., Aizawa, T., Haga, S., Nakamura, S., Namba, Y., and Ikeda, K. (1999) Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res.* 833, 209-215

Nagase, T., Kikuno, R., Ishikawa, K.I., and Ohara, O. (2000) Prediction of the coding sequence of unidentified human gene. XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vivo. *DNA Res.* 7, 65-73

Navarro, V., Vincent, J.-P., and Mazzella, J. (2002) Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 298, 760-764

Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1999) Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 274, 8832-8834

Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kaspar, D., Pohlmann, R., and Petersen, C.M. (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys

Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180-2190

Norton, P.A. (1994) Alternative pre-mRNA splicing: factors involved in Spleiß site selection. *J. Cell Sci.* 107, 1-7

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L., and Petersen, C.M. (2004) Sortilin is essential for proNGF induced cell death. *Nature* 427, 843-848

Offe, K., Dodson, S.E., Shoemaker, J.T., Fritz, J.J., Gearing, M., Levey, A.I., and Lah, J.J. (2006) The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J. Neurosci.*, 26, 1596-1603.

Pawson, T., and Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adapter proteins. *Science* 278, 2075-2080

Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H., Røigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 272, 3599-3605

Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobse, L., Gliemann, J., Moestrup, S.K., and Madsen, P. (1999) Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.* 18, 595-604

Reiter, J.L., and Maihle, N.J. (1996) A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res.* 24, 4050-4056

Rezgaoui, M., Hermeij, G., Riedel, I.B., Hampe, W., Schaller, H.C., and Hermans-Borgmeyer, I. (2001) Identification of SorCS2, a novel member of the VPS10 domain

containing receptor family, prominently expressed in the developing mouse brain. *Mech. Dev.* 100, 335-338

Sandoval, I.V., and Bakke, O. (1994) Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* 4, 292-297

Sarret, P., Krzywkowski, P., Segal, L., Nielsen, M.S., Petersen, C.M., Mazella, J., Stroh, T., and Beaudet, A. (2003) Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 461, 483-505

Scherzer, C.R., Offe, K., Gearing, M., Rees, H.D., Fang, G., Heilman, C.J., Schaller, C., Bujo, H., Levey, A.I., and Lah, J.J. (2004) Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 61, 1200-1205.

Seidah, N.G. and Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 848, 45-62

Smith, C.W.J. and Valcarcel, J. (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem.* 25, 381-388

Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 600-614

Spoelgen, R., von Arnim, C.A.F., Thomas, A.V., Peltan, I.D., Koker, M., Deng, A., Irizarry, M.C., Andersen, O.M., Willnow, T.E., and Hyman, B.T. (2006) Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J. Neurosci.* 26, 418-428.

Takatsu, H., Katoh, Y., Shiba, Y., Nakayama, K. (2001) Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains. *J. Biol. Chem.* 277, 18477-18482

Willnow, T.E., Nykjaer, A., and Herz, J. **(1999)** Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nature Cell Biol.* 1, 157-162

Yamazaki, H., Bujo, H., Kusunoki, J., Seimiya, K., Kanaki, T., Morisaki, N., Schneider, W.J., and 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. *J. Biol. Chem.* 271, 24761-24768

Zhu, Y., Bujo, H., Yamazaki, H., Hirayama, S., Kanaki, T., Takahashi, K., Shibasaki, M., Schneider, W.J., and Saito, Y. **(2002)** Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells in vitro. *Circulation* 105, 1830-1836

Zhu, Y., Bujo, H., Yamazaki, H., Ohwaki, K., Jiang, M., Hirayama, S., Kanaki, T., Shibasaki, M., Takahashi, K., Schneider, W.J., and Saito, Y. **(2004)** LR11, and LDL receptor gene family member, is a novel regulator of smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* 92, 752-758