

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Beteiligung cytoplasmatischer Proteine an der Signalkaskade
von SorLA/LR11**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von
Zara Hashemol Hosseini
aus Hamburg

Hamburg
2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 25.02.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. W. Hampe

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Schmale

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Rinninger

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

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

Meiner Mutter.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. SorLA/LR11	1
1.2. Hu-K4	12
1.3. THG-1a und THG-1	13
1.4. Art-27	14
2. Arbeitshypothese und Fragestellung	16
3. Methoden und Materialien	17
3.1. Zellbiologische Methoden	17
3.2. Proteinchemische Methoden	21
3.3. Molekularbiologische Methoden	26
3.4. Bioinformatische Methoden	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Hu-K4	28
4.2. THG-1a	30
4.3. Art-27	34
5. Diskussion	45
5.1. Hu-K4	45
5.2. THG-1a und THG-1	46
5.3. Art-27	49
5.4. Proteine der Signalkaskade von SorLA/LR11	52
6. Zusammenfassung	53
7. Literaturverzeichnis	54
8. Abkürzungsverzeichnis	64
Anhang	65
Danksagung	65
Lebenslauf	66
Eidesstattliche Erklärung	67

1. Einleitung

1.1. SorLA/LR11

Hydrophile Botenstoffe können nach Bindung an spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen Signalkaskaden aktivieren und auf diese Weise grundlegende Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose im Organismus steuern. Die Wirkungsweise zahlreicher Botenstoffe oder membranständiger Rezeptoren ist bislang unverstanden.

SorLA/LR11 (*sorting-receptor related protein containing low-density lipoprotein receptor class A repeats* oder *low-density lipoprotein-receptor relative with 11 binding repeats*) ist ein solcher membranständiger Rezeptor. Es kann zahlreiche Liganden binden und nimmt nach mehrfacher Prozessierung an verschiedenen funktionellen Systemen teil. Dabei ist der Initiierungsmechanismus der durch SorLA/LR11-vermittelten zellulären Prozesse bisher unbekannt. Die vorliegende Arbeit untersucht die Beteiligung von cytoplasmatischen Proteinen an der Signalkaskade von SorLA/LR11.

Struktureller Aufbau von SorLA/LR11

SorLA/LR11 ist ein 250 kDa großes Rezeptormolekül mit einer einzelnen Transmembrandomäne (Typ-1-Transmembranrezeptor). Der extrazelluläre Anteil von SorLA/LR11 birgt verschiedene Domänen (Abb. 1.1.), die strukturell hauptsächlich für zwei Rezeptorfamilien charakteristisch sind: die der Lipoprotein-Rezeptoren und der Vps10p-Domänen-Rezeptoren (Jacobsen et al., 2001). Dem N-Terminus von SorLA/LR11 folgt zunächst eine Vps10p-Domäne (*vacuolar protein sorting 10 protein*), benannt nach einem ursprünglich in Hefen als Sortierungsrezeptor beschriebenen Protein zum Transport der löslichen Carboxypeptidase Y zwischen frühen Endosomen und prävakuolären, lysosomalen Zellkompartimenten (Marcusson et al., 1994). Diese Vps10p-Domäne enthält ein so genanntes CC-Segment, eine Anordnung von fünf Disulfidbrücken, die in diesem Bereich als Bindestellen für Liganden vermutet werden (Westergaard et al., 2004). Weiter carboxyterminal benachbart folgt eine Reihung von fünf etwa 50 Aminosäuren langen LDL-Rezeptor-Einheiten vom Typ LDLR-B (*LDL-receptor class B repeats*) mit dem F/YWTD-Motiv,

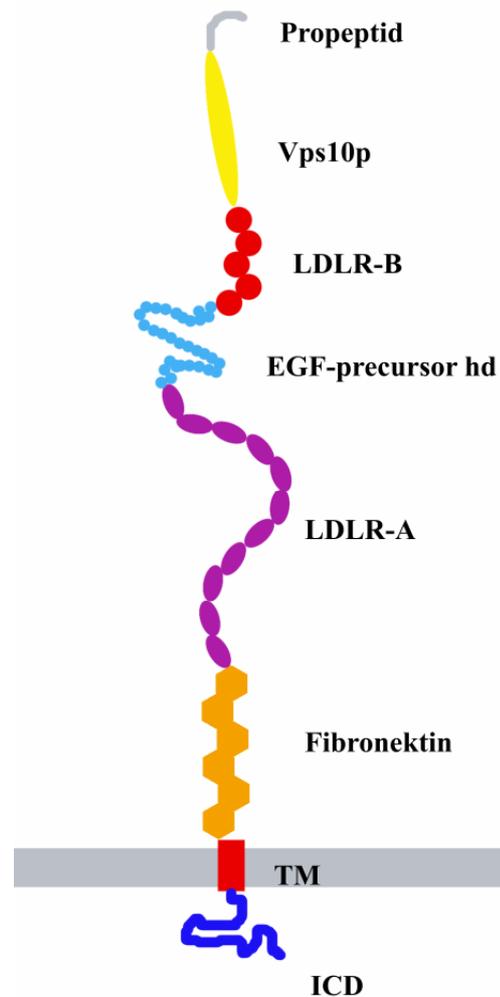


Abb. 1.1.: Struktureller Aufbau von SorLA/LR11 (Schema). Dargestellt ist die Domänenstruktur von SorLA/LR11. Der reife Rezeptor besitzt kein Propeptid. Propeptid - SorLA/LR11 Propeptid; VPS10p - *vacuolar sorting protein 10 protein*-Domäne; LDLR-A/B - *low density lipoprotein receptor class A/B repeat*; EGF-precursor hd - *epidermal growth factor precursor homology domain*; Fibronektin - Fibronektin Typ III; TM - Transmembrandomäne; ICD - Intrazellulärdomäne.

auch β -Propeller-Modul genannt (Yamazaki et al., 1996; Jacobsen et al., 2001). Es schließt sich eine cysteinreiche, dem EGF-Vorläuferprotein (*Epidermal growth factor*) ähnliche Domäne an. Der folgen 11 etwa 40 Aminosäuren lange LDL-Rezeptor-Einheiten vom Typ LDLR-A (*LDL-receptor class A repeats*) mit jeweils drei Disulfidbrücken und einer Konformation, die dieser Rezeptordomäne eine negative Oberflächenladung bereitet. So befindet sich in diesem Bereich eine weitere für die Familie der LDL-Rezeptoren typische Ligandenbindungsstelle. Vor der Transmembrandomäne schließen sich weiter sechs Fibronektin Typ III-Einheiten an. Diese sind charakteristische Bestandteile der Gruppe der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle, wo sie für interzelluläre Interaktionen mitverantwortlich gemacht werden. Der C-Terminus von SorLA/LR11 liegt cytoplasmatisch und wird durch eine 56 Aminosäuren lange Intrazellulärdomäne (ICD, *intracellular domain*) dargestellt, welche verschiedene funktionelle Motive birgt, unter anderem eine ACLL-

Einheit (*acidic-cluster dileucine*) und tyrosinhaltige Motive, wie beispielsweise das FANSHY-Motiv. Damit fehlt SorLA/LR11 im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie das ähnliche (FE)NPXY-Motiv, ein Internalisierungssignal für die Clathrin-vermittelte endocytotische Aufnahme der Lipoprotein-Rezeptoren nach Bindung ihrer Liganden (Westergaard et al., 2004; Jacobsen et al., 2001; Yamazaki et al., 1996; Mörwald et al., 1997). Bekannte Internalisierungsprozesse von SorLA/LR11 werden möglicherweise durch die oben genannten Motive vermittelt. Eine Signalkaskade von SorLA/LR11 ist derzeit nicht bekannt.

Synthese, Prozessierung und Abbau von SorLA/LR11

Die hier beschriebene Struktur von SorLA/LR11 ist die des „reifen“ Rezeptors, wie er beispielsweise an der Zelloberfläche vorliegen kann. Da SorLA/LR11 in verschiedenen Zellkompartimenten auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse Einfluss zu nehmen scheint, soll auch kurz auf Bildung und Abbau dieser reifen Form eingegangen werden.

Die genetische Information für SorLA/LR11 liegt auf Chromosom 11 (Jacobsen et al., 1996). Derzeit gibt es keine Hinweise auf regulierende Faktoren auf Transkriptionsebene. Nach der folgenden Translation entsteht ein Präprorezeptor von SorLA/LR11, welcher im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle wahrscheinlich zunächst sein Signalpeptid verliert und im N-terminalen, luminalen Bereich mehrere N-glykosidische Bindungen erfährt. Die anschließende Abspaltung eines etwa 50 Aminosäuren langen, am N-Terminus befindlichen Propeptids durch Furin erfolgt beim Menschen am Motiv ⁵⁰RRKR⁵³ und geht mit einer Modifikation der N-Glykosylierungen im Golgi-Apparat einher (Hampe et al., 2000; Böhm et al., 2006). Erst die Furin-abhängige Spaltung ermöglicht die Bindung von Liganden an SorLA/LR11. Nach heterologer Expression befinden sich etwa 90 % des gereiften Rezeptors im Golgi-Apparat der Zellen, während sich nur etwa 10 % von SorLA/LR11 auf der Zelloberfläche befinden und dort extrazellulären Liganden zugänglich sind (Jacobsen et al., 2001). Dieses subzelluläre Verteilungsmuster scheint aber in Abhängigkeit zu betrachteten Zellen bzw. Geweben zu stehen. Während SorLA/LR11 in Zellen des peripheren Nervensystems vorwiegend in Zellkörpern und zellkörpernahen Bereichen neuronaler Ausläufer nachweisbar ist und im zentralen Nervensystem häufiger in Form mehrerer punktförmiger, cytoplasmatischer Anreicherungen in Zellen gefunden wurde, befindet sich SorLA/LR11 in Sammelrohrethelien der Niere nur in intrazellulären Vesikeln sowie im trans-Golgi,

aber weder an der Zelloberfläche, noch in Lysosomen (Posse et al., 2000; Motoi et al., 1999; Riedel et al., 2002; Gutekunst et al., 2003). Insgesamt wird SorLA/LR11 insbesondere in neuronalen Geweben, so im Hippocampus, in Purkinje-Zellen des Kleinhirns, im cerebralen Kortex und in einigen Kerngebieten des Hirnstammes stark exprimiert (Hermans-Borgmeyer et al., 1998). Deutliche Expression ist auch in Leber, Nebenniere und Testis gezeigt worden (Yamazaki et al., 1996).

Doch die Prozessierung von SorLA/LR11 geht noch weiter: in Analogie zu anderen Mitgliedern der Vps10p-Domänen-Rezeptorfamilie kann die Ektodomäne in der Zellmembran durch die Metalloprotease TACE (*tumor-necrosis factor α -converting enzyme*) abgespalten und in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Abb. 1.2.A.) (Hampe et al., 2000; Hermey et al., 2006). Die Funktion der Ektodomäne nach ihrer Abspaltung ist nicht bekannt. Eine Wirkung als Corezeptor für andere Rezeptoren bei der Bindung gemeinsamer Liganden wird ebenso diskutiert, wie die Abspaltung der Ektodomäne nach Ligandenbindung als Voraussetzung für weitere Prozessierungs- bzw. mögliche Signalschritte. Es bleibt in der Zellmembran also ein C-terminales Fragment (CTF) zurück, welches weiter durch den γ -Sekretase-Komplex zu einem β -Peptid (Sor β) und der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 (SorICD) gespalten werden kann (Böhm et al., 2006). Der γ -Sekretase-Komplex erhält seine Proteaseaktivität durch zwei Aspartylreste (Asp257 und Asp385) in der Transmembrandomäne von Presenilin-1 (Tandon und Fraser, 2002). Besonderheit ist hier die Schnittstelle im hydrophoben Bereich innerhalb der Membran. Weitere Bestandteile dieses Proteasekomplexes sind PEN-2 (*Presenilin enhancer-2*), Aph-1 (*anterior pharynx defective-1*) und Nicastrin, wobei die stöchiometrische Zusammensetzung des Komplexes bislang nicht eindeutig geklärt ist. Im Gegensatz zu den Presenilinen sollen letztere auf die Proteaseaktivität nur modulierend einwirken können (Wolfe und Kopan, 2004). Für die entstehende Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11, das SorICD, werden verschiedene Aspekte des Verbleibens diskutiert: so gibt es erste Hinweise dafür, dass ein NLS (*nuclear localization signal*) mit dem Motiv KHRR zu einer Anreicherung von SorICD im Zellkern führen kann, wo möglicherweise unter Mitwirkung anderer Proteine als Koaktivatoren eine Transkriptionsinitiation bzw. -regulation von Zielgenen vermutet wird. Der Abbau von SorICD erfolgt intrazellulär wahrscheinlich durch IDE (*insulin degrading enzyme*), einer Thiol-abhängigen Metalloprotease, welche im Körper für die Spaltung der Peptidhormone Insulin und Glucagon verantwortlich ist (Böhm et al.,

2006; Edbauer et al., 2002). Erste Hinweise deuten auf eine durch SorICD bedingte Erhöhung der Konzentration an SorLA/LR11, bleiben aber sowohl im Mechanismus als auch in ihrer zellulären Bedeutung noch ungeklärt (Böhm et al., 2006).

Funktionelle Aspekte

Wie bereits erwähnt gibt es zahlreiche Liganden für die verschiedenen Domänen des neuronalen Rezeptors SorLA/LR11. Einige von ihnen sind zur Übersicht in Tabelle 1.1. dargestellt. Obgleich in vielen Fällen ihre volle Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist, sollen im Folgenden drei auf ihnen aufbauende zellbiologische Modelle vorgestellt werden.

Mitose, Proliferation und Differenzierung

Das als erstes beschriebene Modell zur Funktion nimmt seinen Ursprung nicht bei SorLA/LR11, sondern bei seinem Homologen HAB (*head activator binding protein*), einem sich strukturell nur in der Anzahl einzelner Domänen unterscheidenden Protein. HAB wurde in *Chlorohydra viridissima* als Rezeptor für das Undekapeptid HA (*head activator*) entdeckt und ist an der Entwicklung und Regeneration der Kopfregeion dieser Organismen beteiligt. Als Gegenspieler zu HI (*head inhibitor*) bewirkt HA in hohen Konzentrationen bei kopfspezifischen Stammzellen den Übergang in die Mitosephase des Zellzyklus, während geringere Konzentrationen an HA für die Zelle Differenzierung bedeuten (Hampe et al., 1999b; Hampe et al., 1999a). Leitet HA die Differenzierung von Nervenzellen ein, so wahrscheinlich durch Mitwirkung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors unter Aktivierung des cAMP-Systems mit Einbeziehung von CREB (*cAMP responsive element binding protein*) als Transkriptionsfaktor (Hampe et al., 1999b). HAB oder die prozessierte Ektodomäne von HAB werden dabei als Corezeptor diskutiert. In humanen Zelllinien neuronalen oder neuroektodermalen Ursprungs wirkt HA dagegen als Wachstumsfaktor und führt somit zu einer verstärkten Zellteilung (Lintzel et al., 2002). Sowohl *in vitro* bei der Proliferation neuronaler Zellen als auch *in vivo* insbesondere bei der embryonalen Entwicklung des murinen zentralen Nervensystems sind erhöhte Expressionsraten von SorLA/LR11 beschrieben worden (Hirayama et al., 2000; Hermans-Borgmeyer et al., 1998). Gemeinsam lässt dies eine SorLA/LR11-vermittelte Wirkung von HA auf den Zellzyklus annehmen. Hinweise auf mögliche Signalwege zu dieser erhöhten Zellteilungsrate blieben jedoch bislang aus.

Liganden	Bindungsdomäne	mögliche Funktion für SorLA/LR11	Referenz
Head Activator, HA	Vps10p	Proliferation	Lintzel et al., 2002
Glial derived neurotrophic factor, GDNF	Vps10p	-	Westergaard et al., 2004
Neurotensin	Vps10p	-	Jacobsen et al., 2002
SorLA/LR11-Propeptid	Vps10p	blockiert Ligandenbindung an Vps10p-Domäne vor Propeptid-Spaltung	Lintzel et al., 2002; Westergaard et al., 2005
β -site APP cleaving enzyme, BACE	-	Proteinsortierung	Spoelgen et al., 2006
Amyloid Precursor Protein, APP	LDLR-A	Proteinsortierung	Andersen et al., 2005; Andersen et al., 2006
ApoE und ApoE-haltige Lipoproteine: β -VLDL (very low-density lipoprotein) HDL (high-density lipoprotein)	LDLR-A	Aufnahme durch Internalisierung	Jacobsen et al., 2002; Yamazaki et al., 1996; Taira et al., 2001
α_2 -makroglobulin-receptor associated protein, RAP	LDLR-A	blockiert Ligandenbindung an Rezeptorvorstufen	Jacobsen et al., 1996
Lipoproteinlipase	LDLR-A	-	Jacobsen et al., 2002
uPA-PAI-1-Komplex	LDLR-A	Proliferation	Gliemann et al., 2004; Zhu et al., 2004
PDGF-BB	LDLR-B	Proliferation	Gliemann et al., 2004
Golgi-localizing γ -adaptin ear homologous ADP-ribosylation factor binding proteins, GGA-1 und GGA-2	SorICD	Proteinsortierung	Jacobsen et al., 2002

Tab. 1.1.: Liganden von SorLA/LR11 (eine Auswahl).

Diesem Modell der Mitoseaktivierung durch SorLA/LR11 ist eines entgegengesetzt, welches nicht Mitose, sondern Zelltod induzieren kann. Der hierbei beteiligte Vps10p-Rezeptor ist der Neurotensin-3-Rezeptor Sortilin. Erst vor einiger Zeit wurde seine Funktion als Corezeptor zu p75^{NTR} bekannt: nur die gleichzeitige Bindung beider Rezeptoren mit proNGF (Vorläuferprotein von *nerve growth factor*) kann zum Zelltod führen (Nykjaer et al., 2004). Bindet stattdessen Neurotensin an Sortilin, dann bleibt der proNGF-Effekt aus (Kaplan und Miller, 2004). Nach Neurotensinbindung wird zur Zeit eine Aktivierung des ERK1/2 und Akt-Signalweges angenommen, welche letztlich zu einer Ausschüttung zahlreicher Chemokine und Cytokine führt (Dicou et al., 2004).

Rezeptor-vermittelte Endocytose und Zellmotilität

Die Einordnung von SorLA/LR11 in die Familie der LDL-Rezeptoren begründet sich nicht nur auf die strukturelle Ähnlichkeit, sondern nicht zuletzt auch auf die Funktion von SorLA/LR11 bei der Aufnahme von Lipoproteinen aus dem Blutserum in die Zelle. Zwar bindet das LDL (*low-density lipoprotein*) selbst nicht an SorLA/LR11, aber durch Bindung des Apolipoprotein E (ApoE) an SorLA/LR11 können andere ApoE-haltige Lipoproteine wie beispielsweise HDL (*high-density lipoprotein*) und β -VLDL (*very low-density lipoprotein*) an SorLA/LR11 binden und durch Internalisierung der gebundenen Lipoproteine aufgenommen werden (Yamazaki et al., 1996; Taira et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass nach *in vitro*-Inkubation mit β -VLDL sich intrazellulär Cholesterolester in Form von Fetttropfen anreichern und dass dieser Effekt stärker ist, wenn SorLA/LR11 vermehrt exprimiert wird (Taira et al., 2001). So ist auch gezeigt worden, dass besonders in atherosklerotischen Läsionen arterieller Gefäßwände SorLA/LR11 überwiegend in der Intima stark exprimiert wird (Kanaki et al., 1999). Hier findet man neben SorLA/LR11 auch ein anderes Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie, das 600 kDa große LRP-1 (*low-density lipoprotein receptor related protein-1*). LRP-1 ist wie SorLA/LR11 in der Lage die Isoform BB des Wachstumsfaktors PDGF (*platelet derived growth factor*) zu binden und ähnlich wie andere Liganden durch Endocytose in die Zelle aufzunehmen (Gliemann et al., 2004). Dabei wird zunächst nach Bindung von PDGF-BB an LRP-1 zur Initiation der zugehörigen Signalkaskade sowohl eine Tyrosin-abhängige Phosphorylierung der Intrazellulärdomäne von LRP-1 wie auch die Aktivierung des PDGF-Rezeptors selbst angenommen (Loukinova et al., 2002). Es ist gezeigt worden, dass in erkrankten Gefäßbereichen eine vermehrte Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Intima

der Gefäßwand und auch eine Vermehrung dieser Zellen als Wirkung von PDGF zustande kommen; dabei wirkt LRP-1 wahrscheinlich als Corezeptor des PDGF-Rezeptors und kann unter Einfluss von ApoE die proliferative Wirkung hemmen. SorLA/LR11 wirkt nun als Gegenspieler zu LRP-1: es bindet PDGF-BB ähnlich wie LRP-1, internalisiert aber deutlich langsamer und führt letztlich zu einer verstärkten Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Intima (Gliemann et al., 2004; Zhu et al., 2002). Weitere gemeinsame Liganden von SorLA/LR11 und LRP-1 in diesem Zusammenhang sind uPA (*urokinase-type plasminogen activator*), uPAR (*uPA receptor*) und PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*). Auch sie werden als Komplex LRP-1-vermittelt in die Zelle aufgenommen, und es kommt wieder zur Hemmung der ansonsten durch diesen Komplex eingeleiteten Zellmotilität (Chazaud et al., 2000). Erneut wird SorLA/LR11 als Gegenspieler zu LRP-1 diskutiert: so konkurriert die Bindung des uPAR an SorLA/LR11 an der Zelloberfläche mit der LRP-vermittelten Aufnahme des Komplexes und dessen Auswirkungen (Zhu et al., 2004). Ob und welcher Art diese beiden Mechanismen miteinander direkt verknüpft sind und wie nach Bindung an SorLA/LR11 das Signal in das Zellinnere weitergegeben wird, bleibt ungeklärt.

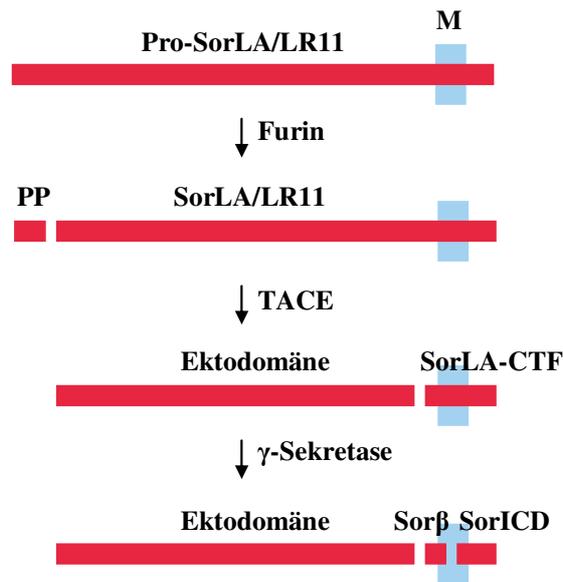
Proteinsortierung

Die Rolle von SorLA/LR11 bei intrazellulären Proteinsortierungsprozessen wurde schon früh wegen seiner Zuordnung zur Vps10p-Domänen-Rezeptorfamilie angenommen. Wie bereits erwähnt, ist das Hefeprotein Vps10p an solchen Prozessen beteiligt (Marcusson et al., 1994). Es bindet die VHS-Domäne (*Vps27/Hrs/STAM*) von GGA-1 und GGA-2 (*Golgi-localizing γ -adaptin ear homologous ADP-ribosylation factor-binding protein*) zur Vermittlung zwischen *trans*-Golgi und späten Endosomen (Boman, 2001). Der *trans*-Golgi-Bereich von Zellen wird allgemein als Verpackungs- und Sortierungsmaschinerie der Zelle angesehen, von wo aus Lipide und Proteine meist über Endosomen an andere zelluläre Kompartimente versandt werden. Die erwähnten GGAs wirken als Adaptorproteine bei der Proteinsortierung und sind für die Formation von Vesikeln im *trans*-Golgi mitverantwortlich. Auch andere Mitglieder der Vps10p-Familie interagieren mit GGAs, so auch Sortilin, welches ebenso wie SorLA/LR11 eine Intrazellulärdomäne mit einer ACLL-Einheit hat und hierüber GGA-2 binden kann (Takatsu et al., 2001; Nielsen et al., 2001; Jacobsen et al., 2002). Sortilin ist sehr stark im Golgi-Apparat der Zellen angereichert und wird nach Bindung von Neuropeptiden

wie Neurotensin oder BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) für ihre intrazelluläre Proteinsortierung verantwortlich gemacht (Mazella et al., 1998; Chen et al., 2005).

Hinweise auf Sortierungsprozesse durch SorLA/LR11 und ebenso auch eine zunächst außerhalb dieses Zusammenhanges lange diskutierte Verbindung von SorLA/LR11 zur Alzheimerschen Demenzerkrankung beginnen sich erst seit neuerer Zeit allmählich zu einem Bild zusammenzufügen. Bei der Alzheimer Demenz sind zwei histologische Merkmale bei betroffenen Patienten charakteristisch. Dies sind zum einen intrazelluläre Fibrillen aus hyperphosphoryliertem, aggregiertem τ -Protein (tau-Protein) und extrazelluläre, so genannte senile Plaques, welche hauptsächlich aus A β -Peptid bestehen (Herz und Beffert, 2000). Dieses A β -Peptid geht nach mehreren Prozessierungsschritten aus dem Vorläuferprotein APP (*amyloid precursor protein*) hervor (Abb. 1.2.B.). APP ist ein transmembranes Protein, welches an der Zellmembran durch α -Sekretase in eine lösliche Ektodomäne (sAPP α) und ein C-terminales Fragment (CTF α) geschnitten werden kann (Kopan und Ilagan, 2004; Cam und Bu, 2006). Alternativ kann APP durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und in späten Endosomen zunächst durch die Protease BACE (*β -site APP cleaving enzyme*) zum löslichen sAPP β und membranständigen CTF β prozessiert werden. In einem weiteren Schritt wird CTF β innerhalb der Membran durch den bereits beschriebenen γ -Sekretase-Komplex zur Intrazellulärdomäne von APP (AICD) und dem 40-42 Aminosäuren langen β -Peptid (A β) gespalten. Ohne die vorherige Spaltung durch BACE entsteht folglich kein A β -Fragment. Für BACE selbst wird ein möglicher Recycling-Mechanismus diskutiert: nach Bindung von BACE an APP werden beide gemeinsam durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und nach Spaltung von APP im späten Endosomen gelangt BACE, transportiert durch GGA, wieder zurück an die Zelloberfläche (Tang et al., 2005; He et al., 2005). Welche Rolle SorLA/LR11 dabei einnimmt, bleibt noch in vielen Einzelheiten spekulativ. Sicher ist bislang, dass bei Alzheimer-Patienten und in Kerngebieten mit den Alzheimer-typischen senilen Plaques die SorLA/LR11-Expression abnimmt (Scherzer et al., 2004; Offe et al., 2006). Weiterhin konnten direkte Interaktionen von SorLA/LR11 mit APP und auch mit BACE überzeugend dargelegt werden. Erste Hinweise bei der Interaktion zwischen SorLA/LR11 und APP deuten auf eine mögliche Anreicherung von APP im Golgi-Apparat und auf eine geringere A β -Entstehung hin (Andersen et al., 2005; Offe et al., 2005). Auch die Interaktion von SorLA/LR11 mit BACE findet wahrscheinlich im Golgi-Apparat statt und geht mit

A. SorLA/LR11



B. APP

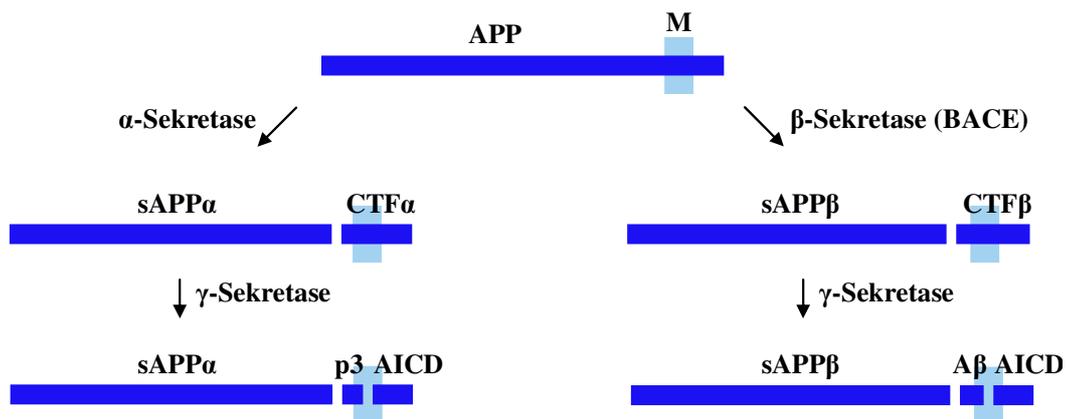


Abb. 1.2.: Prozessierung von SorLA/LR11 und APP im Vergleich (Schema). M – Membran. A. Der reife Rezeptor SorLA/LR11 entsteht nach Abspaltung des Propeptids (PP) durch die Protease Furin im Golgi-Apparat. Nach Ligandenbindung wird die Ektodomäne durch die Metalloprotease TACE abgespalten und in den extrazellulären Raum abgegeben. Das verbleibende C-terminale Fragment (SorLA-CTF) wird γ -Sekretase-abhängig zu Sor β und der Intrazellulärdomäne SorICD gespalten. B. Die Prozessierung von APP verläuft alternativ α - bzw. β -Sekretase-abhängig. In beiden Fällen wird eine lösliche Ektodomäne (sAPP α bzw. sAPP β) abgespalten und ein entsprechendes C-terminales Fragment bleibt in der Membran (CTF α bzw. CTF β). Dieses wird in einem nächsten Schritt γ -Sekretase-abhängig unter Freisetzung der Intrazellulärdomäne von APP (AICD) proteolytisch gespalten: aus dem CTF α -Fragment wird das Peptid p3 und aus dem CTF β -Fragment wird das A β -Peptid freigesetzt. Letzteres aggregiert extrazellulär zu den für die Alzheimer-Demenz charakteristischen amyloiden Plaques.

einer verminderten Interaktion zwischen APP und BACE einher (Spoelgen et al., 2006). Die kürzlich abgeschlossene Entwicklung einer SorLA/LR11-knock-out-Maus (Andersen et al., 2005) weckt Hoffnung auf zukünftig in diesem und anderen Bereichen gewonnene Erkenntnisse.

Proteine der Signalkaskade von SorLA/LR11

Für alle bisher in der Literatur beschriebenen Liganden und Funktionen von SorLA/LR11 ist bislang keine Signalkaskade gezeigt worden. Es ist nicht gelungen, eine Beteiligung der bekanntermaßen mit LRP-1, Sortilin oder APP cytoplasmatisch interagierenden Proteine oder auch nur biochemische Modifikationen der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 selbst bei der Signalkaskade von SorLA/LR11 nachzuweisen. Einzig die γ -Sekretase-abhängige Abspaltung der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 ähnlich zu anderen γ -Sekretase-Substraten wie LRP-1 oder APP lässt analog eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen vermuten (Böhm et al., 2006).

Die Arbeitsgruppe um Wolfgang Hampe hat mithilfe einer Hefedoppelhybridanalyse mit SorICD nach an der Signalkaskade beteiligten Proteinen gesucht. Die Grundlage dieser Methode ist die von zwei wechselwirkenden Proteinuntereinheiten abhängige Transkriptionsaktivierung der Gene für α - bzw. β -Galaktosidase. Diese Untereinheiten sind die N-terminale GAL4-DNA-Bindedomäne und die C-terminale GAL4-Aktivierungsdomäne des Proteins GAL4, welche nur gemeinsam die Expression der Reportergene ermöglichen. Werden die einzelnen Bindedomänen von GAL4 voneinander getrennt und mit anderen Kandidaten-Proteinen fusioniert, so kommt es nur bei Interaktion dieser Kandidaten zu einer Aktivierung der Galaktosidase-Expression. Die angewendete Hefedoppelhybridanalyse wurde mit einem Fusionsprotein aus SorICD und der DNA-Bindedomäne als Köderprotein und Fusionsproteinen aus einer cDNA-Bank aus humanem Hirngewebe und der Aktivierungsdomäne von GAL4 als Beuteprotein in Hefen durchgeführt. Drei der aus diesen Experimenten hervorgehenden Kandidatenproteine wurden in einem unabhängigen GST-Bindungsassay bestätigt. Dabei haben die Kandidatenproteine *in vitro* die GST-gekoppelte (*Glutathion-S-Transferase*) Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 gebunden und wurden mit Glutathion-Sepharose präzipitiert (Munck, 2004). Beide Experimente weisen auf Interaktionen von SorICD mit den Kandidatenproteinen Hu-K4, THG-1a und Art-27 hin, welche im Folgenden beschrieben werden.

1.2. Hu-K4

Hu-K4 (*human K4 homologue*) gehört in die Superfamilie der HxKxxxxD-Motivtragenden Proteine (Cao et al., 1997; Munck et al., 2005). Dazu gehören unter anderem sowohl die Phospholipasen D1 und D2 (PID1 und PID2) als auch verschiedene Virusproteine, welche an der Replikation des *Vaccinia Virus* beteiligt sind. Für Mitglieder der Phospholipase-D-Familie ist gezeigt worden, dass zwei intakte HKD-Motive für ihre katalytische Enzymaktivität bei der Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Cholin und Phosphatidsäure benötigt werden (Munck et al., 2005). Die Isoformen D1 und D2 nehmen beide an verschiedenen Signalkaskaden teil und sind funktionell diversen Bereichen wie Zellzyklus, Migration, Rezeptor-vermittelte Endocytose und Vesikeltransport zuzuordnen (Foster und Xu, 2003). Andere Mitglieder der HKD-Superfamilie sind die genannten Homologen zu K4L. Hierzu gehören unter anderem das Virusprotein K4L selbst, seine Homologen Hu-K4 (auch Phospholipase D3 genannt) aus Mensch und sam-9 (*Schwannoma-associated mRNA-9*) aus der Maus, sowie das entfernter verwandte Virusprotein p37. Letzteres ist nach der intrazellulären Vermehrung von viraler DNA in der infizierten Wirtszelle an der Umhüllung der gereiften Virionen mit Zellmembranen und wahrscheinlich auch an der Weitergabe der infektiösen Virionen von Zellen zu Zellen ausschlaggebend beteiligt (Blasco und Moss, 1991). Die Bedeutung des K4L selbst bei der Virusreplikation ist weiter unbekannt. So fehlt einigen Pockenviren das zugehörige Gen teilweise oder auch vollständig, ohne dass dies zu einer Auffälligkeit im Lebenszyklus der Viren führt. Für das murine Homologon sam-9 ist eine verstärkte Expression in der postnatalen und auch adulten neuronalen Entwicklung insbesondere des Hippocampus und des somatosensiblen Kortex gezeigt worden, welche beides Areale der Verarbeitung und Bewertung aufgenommener Reize darstellen (Pedersen et al., 1998). Ähnlich zu sam-9 wird Hu-K4 ebenfalls im Gehirn, aber auch in einer Vielzahl anderer wie auch fetaler Gewebe vermutlich in Form unterschiedlicher Spleißvarianten exprimiert. Im Gegensatz zu den Phospholipasen D1 und D2 wird für Hu-K4 nach Aufklärung und Erweiterung der anfänglich angenommenen Genstruktur eine Transmembrandomäne angenommen (Munck et al., 2005). Hu-K4 verteilt sich in der Zelle überwiegend auf das Endoplasmatische Retikulum und könnte dort mit SorLA/LR11 in Interaktion treten (Munck, 2004).

1.3. THG-1a und THG-1

THG-1 (*Transforming Growth Factor β stimulated clone 22 homologous gene-1*) ist Mitglied einer kleinen Proteinfamilie, zu der neben THG-1 und THG-2 als weitere Säugetierhomologe TSC-22 (*Transforming Growth Factor β stimulated clone 22*), DIP (*δ -sleep inducing peptide immunoreactive peptide*) und aus *Drosophila melanogaster* das entfernter verwandte shortsighted (auch genannt bunched) gehören (für Weiteres siehe: Kester et al., 1999; Shibanuma et al., 1992; Seidel et al., 1997; Treisman et al., 1995). Alle diese Homologen stellen nach derzeitigem Kenntnisstand eine neue Transkriptionsfaktorfamilie dar, deren strukturelle Gemeinsamkeiten aus einer TSC-Box und einer *leucine zipper*-Domäne bestehen (Kester et al., 1999). Am besten charakterisiert ist hier das 18 kDa große TSC-22. Die Expression von TSC-22 wird indirekt durch TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*) und weitere Wachstumsfaktoren und Cytokine stimuliert. TGF- β 1 kann abhängig von Zelltyp und Wachstumsstadium die Zellproliferation positiv wie negativ kontrollieren: so wirkt es beispielsweise wachstumshemmend auf einschichtige Epithelien und wachstumsfördernd auf mesodermale Zellen (Gupta et al., 2003; Shibanuma et al., 1992). In der zellulären Antwort auf Stimulation mit TGF- β 1 wird TSC-22 bereits früh in murinen Osteoblasten-Zellen vorübergehend hochreguliert (Shibanuma et al., 1992). Der hier zugehörige Signalweg wird vermutlich durch Phosphorylierung intrazellulärer Proteine wie Smad3 nach Bindung von TGF β an seinen Rezeptor aktiviert (Okano et al., 2006). Smad3 und Smad4 können weiter an TSC-22 binden und so möglicherweise über Zusammenwirken weiterer Proteinkaskaden die TGF β -Wirkung bei der Zelldifferenzierung verstärken (Choi et al., 2005). Obgleich TSC-22 die Transkription von Zielgenen wie dem CNP (*c-type natriuretic peptide*) durch Bindung an GC-reiche Regionen im Promotorbereich direkt einleiten kann, wird aufgrund Fehlens einer klassischen DNA-Bindedomäne eher eine indirekte Einflussnahme von TSC-22 auf Transkriptionsvorgänge angenommen (Ohta et al., 1996). Dazu kann TSC-22 Homodimere oder auch Heterodimere mit THG-1 ausbilden, für welche eine stärkere Repressorfunktion beschrieben ist als für die monomeren Proteine. Dieser Repressoraktivität liegt jedoch nicht eine DNA-Interaktion durch die *leucine zipper*-Domäne zugrunde, wie es für andere Proteine beispielsweise aus der bZIP-Familie (*basic leucine zipper*) beschrieben ist, sondern es wird die Bindung an direkt wirkende Transkriptionsfaktoren über eine prolinreiche Region in der Nähe zur TSC-Box von

THG-1 und TSC-22 erwogen. Hierzu passen Beobachtungen, die eine Anreicherung von THG-1 im Zellkern von COS-1-Zellen beschreiben (Kester et al., 1999).

Bei THG-1a handelt es sich um eine Spleißvariante zu THG-1. Während humane THG-1-mRNA in zahlreichen Geweben nachweisbar ist, darunter bevorzugt in Herz und quergestreifter Skelettmuskulatur, befindet sich THG-1a-mRNA ausschließlich in Strukturen des zentralen Nervensystems, verstärkt in solchen mit besonders hohem Anteil an Gliazellen wie dem Corpus callosum (Munck, 2004). Ein weiteres dem humanen THG-1 nahe verwandtes Protein ist das murine THG-1pit, welches in engem Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung der Hypophyse und des Riechhirns zu stehen scheint. So wird die Transkription von THG-1pit in der Hypophyse durch Lhx3 (*LIM homeobox gene 3*) kontrolliert. *In situ* Hybridisierungen an Maushirnen zeigen die Expression von THG1pit beginnend an Tag 8 der embryonalen Mausentwicklung insbesondere in Bereichen neuronaler Vorläuferzellen unter anderem des späteren Hypophysenvorderlappens (Körnerzellen und Interneurone). Dieses Expressionsprofil bleibt bis zum 6. postnatalen Tag bestehen und ist auch in erwachsenen Tieren noch nachweisbar (Canterini et al., 2005; Fiorenza et al., 2001). Inwiefern sich THG-1a und THG-1pit funktionell gleichen, bleibt weiter unklar. Ihre Rolle bei Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen neuronaler Zellen und Gewebe hebt die Bedeutung der Transkriptionsfaktor-Gruppe um THG-1 bezüglich einer möglichen Interaktion mit der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 hervor.

1.4. Art-27

UXT (*ubiquitously expressed transcript*) wurde erstmals von Schroer et al. beschrieben (1999). Es handelt sich um ein etwa 18 kDa großes Protein mit Expression in allen untersuchten Geweben, besonders in Tumorgeweben. Lange Zeit blieb seine Funktion unbekannt. Seine Proteinstruktur mit α -helikalen Einheiten gleicht sowohl den Spektrin-Wiederholungen von Aktin-bindenden Proteinen als auch der helikalen Region verschiedener Transkriptionsfaktorfamilien, zu der auch das SREBP1 (*sterol responsive element binding protein 1*) gehört (Liu und McKeehan, 2002a). Diese Strukturhomologien und die subzelluläre Verteilung des Proteins in Cytosol und Zellkern führten schließlich zur Annahme eines neuartigen Transkriptionsfaktors, der mit anderen transkriptionsregulierenden Proteinen interagieren kann (Liu et al., 2002b). Als eine Hefedoppelhybridanalyse eine Interaktion zum Androgen-Rezeptor zeigte,

wurde UXT fortan als Art-27 (*androgen receptor trapped clone-27*) bezeichnet. Für seinen neuen Bindungspartner, den Androgen-Rezeptor, ist bekannt, dass er sich nach Bindung von Androgenen aus einem Hsp90-enthaltenden Komplex lösen kann, und in Form eines neuen Komplexes in den Zellkern wandert, wo meist über Bindung an Promotorregionen die Transkription von verschiedenen Zielgenen reguliert wird. Dabei sind zahlreiche intrazelluläre Proteine als Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren beschrieben worden. Erste Hinweise über das Vorhandensein von Art-27 in einem bis dahin nicht näher identifizierten, aus Kernextrakten isoliertem Multiproteinkomplex verleiten ebenso wie eine verstärkte Transkriptionsaktivierung von verschiedenen Steroidrezeptoren durch Art-27 zu Spekulationen über seine transkriptionsregulierende Wirkung (Markus et al., 2002). Diese Untersuchungen werden weiter durch Beobachtungen gestützt, welche eine Kolo-kalisierung von Art-27 mit dem Androgen-Rezeptor in luminalen Epithelzellen der Prostata zeigen. Hier haben erste Untersuchungen gezeigt, dass Art-27 beim Prostata-Carcinom vermindert exprimiert wird und dass das Wiedereinführen von Art-27 in Prostata-Krebs-Zelllinien zu einer Minderung der Androgen-abhängigen Proliferation führt (Taneja et al., 2004; Li et al., 2005).

Diese Hinweise auf den Einfluss von Art-27 auf die Zellproliferation durch Wirkung als Transkriptionsfaktor in einem nukleären Proteinkomplex machen Art-27 zu einem attraktiven Kandidaten für eine Interaktion mit SorLA/LR11.

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

SorLA/LR11 dient als Rezeptor für zahlreiche Liganden, darunter auch für das Neuropeptid Kopfaktivator. Dessen Bindung an SorLA/LR11 führt zunächst zur proteolytischen Abspaltung der Extrazellulärdomäne durch die Metalloprotease TACE und anschließend zur Freisetzung der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 durch den γ -Sekretasekomplex. Der Ablauf der weiteren Signalkaskade ist bislang ungeklärt, jedoch gibt es Hinweise auf eine Anreicherung dieser prozessierten Intrazellulärdomäne im Zellkern. In einer Hefedoppelhybridanalyse mit der intrazellulären Domäne von SorLA/LR11 und einer cDNA-Bank aus humanem Hirngewebe wurden die cytoplasmatischen Proteine Hu-K4, THG-1a/THG-1 und Art-27 als Kandidaten für eine Interaktion mit SorLA/LR11 identifiziert. Zwei der Proteine werden derzeit als Transkriptionsregulatoren diskutiert. Die vorliegende Arbeit soll mithilfe immunocytochemischer Untersuchungen mit und ohne Stimulation von SorLA/LR11 durch Liganden wie Kopfaktivator eine Beteiligung dieser Proteine an der Signalkaskade von SorLA/LR11 aufklären.

3. Methoden und Materialien:

3.1. Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zelllinien:

In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Zelllinien verwendet worden (siehe unten).

Zelllinien	Herkunft	Nährmedium
COS	renale Fibroblasten der afrikanischen Grünen Meerkatze	Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), high glucose, plus 10 % Fetales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin (alles Gibco/Invitrogen)
CHO-K1	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters	HAM's F-12 Nutrient Mixture, plus 10 % Fetales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin (alles Gibco/Invitrogen)
LAN-5	humane Neuroblastom-Zellen	RPMI- Medium 1640, plus 10 % Fetales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin (alles Gibco/Invitrogen)
BON	humane Carcinoid-Zellen des Pankreas (neuroendokrin)	HAM's F-12 Nutrient Mixture, plus 5 % Fetales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin
HT-22	murine Hippocampus-Neurone	Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, plus 10 % Fetales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin

Die Kultivierung dieser Zelllinien erfolgte durch regelmäßiges Wechseln des Nährmediums. Bei Erreichen einer einschichtigen Zellschicht mit etwa 80 % Zelldichte wurden die Zellen mit 1 mL Trypsin pro 75 cm² Fläche bedeckt und nach etwa 1-2 min vorsichtig abgeklopft. Die Zellsuspension wurde in frischem Nährmedium verdünnt und auf Zellkulturflaschen (75 bzw. 175 cm²), Petrischalen (Durchmesser 5 cm, 10 cm bzw. 20 cm) oder 6- bzw. 24-Lochplatten (alles NUNC) verteilt. Die Inkubation zum Zellwachstum erfolgte bei 37° C und 5 % CO₂. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Sollten Zellen später immunocytochemisch angefärbt werden, so wurden sie direkt auf Deckgläschen ausgesetzt. Im Falle der LAN-5-Zelllinie wurde deren Oberfläche zuvor mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (Sigma) nach Herstellerangaben beschichtet.

Zellkulturzusätze:

Für Experimente mit dem Glycosylierungshemmstoff Tunicamycin (SigmaAldrich) wurde dieses in reinem DMSO gelöst und dem Nährmedium in Endkonzentrationen von 0, 1 und 3 µg/mL beigemischt. Weiteres Zellwachstum erfolgte durch 24-stündige Inkubation unter üblichen Bedingungen.

Transfektion mittels Elektroporation:

Je Ansatz wurden zwei zu etwa 80 % konfluent bewachsene 75 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in Nährmedium verdünnt. Nach Zentrifugation bei 800xg für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen in PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 350 µL PBS resuspendiert und auf einen 40 µL DNA-Ansatz aus je 10 µg der zu transfizierenden DNA und 10 µL Herring Sperma DNA (Invitrogen) gegeben. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte die Elektroporation in einer Elektroporationsküvette (Biorad) mit GenePulser (Biorad) bei U= 0,32 kV und C= 500 µF. Anschließend wurden die Zellen zügig in ihr Nährmedium überführt und in entsprechender Verdünnung unter üblichen Bedingungen für zwei Tage inkubiert.

Expressionsvektoren:

Alle verwendeten Expressionvektoren wurden von W. Hampe/ AG Neurobiochemie bereitgestellt.

Bezeichnung des Vektorkonstruktes	Beschreibung
pcDNA3.1/Hygro_PLD3	Hu-K4 in pcDNA3.1
pcDNA3.1/Art-27-myc-His	myc-tagged Art-27 in pcDNA3.1
pcDNA3.1/myc-His_THG-1a	myc-tagged THG-1a in pcDNA3.1
pSorLAok30	humanes SorLA/LR11 in pcDNA3

Liganden-Induktion von Zellen mit HA/GDNF:

Zu verwendende Zellen wurden vor Induktion mit einem Liganden in definiertem Medium (Boels et al., 2001) inkubiert: zu etwa 60 % konfluente Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 10-14 Stunden in definiertem Medium (Grundmedium plus 1 mg/mL Insulin, 10 mg/mL Transferrin, 2 mM Ethanolamin, 3 μ M Na₂SO₃) bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Liganden-Induktion erfolgte mit HA (Hampe et al., 2000) in der Endkonzentration 2 nM bzw. humanem GDNF (Strathmann Biotec AG) in Endkonzentrationen zu 20, 50, 100 ng/mL. Durch anschließendes Waschen mit PBS wurde die Induktion gestoppt und die Zellen zügig weiterverarbeitet.

Fixierung von Zellen :

Für die Fixierung von kultivierten Zellen wurden zwei verschiedene Fixiermethoden verwendet. Für die Fixierung mit PFA (Paraformaldehyd) wurden die Zellen zweimal mit PBS (Invitrogen) gewaschen und anschließend zweimal 15 min in 4 % PFA/PBS inkubiert. Restliche Spuren von PFA (hat Eigenfluoreszenz!) wurden durch sechsmaliges Waschen mit PBS entfernt. Für die Fixierung mit Eisessig/Ethanol wurde zweimal mit PBS (Invitrogen) gewaschen, anschließend für 5 min mit eiskaltem 1 % Eisessig/Ethanol-Gemisch inkubiert und weitere dreimal mit PBS gewaschen.

Permeabilisierung von Zellen:

Sollen intrazelluläre Proteine in PFA fixierten Zellen immunocytochemisch dargestellt werden, so ist eine Permeabilisierung der Zellmembran notwendig. Hierfür wurden die Zellen mit Permeabilisierungslösung (0,5 % Glycin/ 0,1 % Saponin/ PBS) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Zellen, welche mittels Eisessig/Ethanol fixiert wurden, entfällt die Permeabilisierung.

Immunfluoreszenzfärbung:

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden nach Fixierung und eventuell Permeabilisierung zum Blockieren freier Bindungsstellen mit Blockierlösung inkubiert. Die Zusammensetzung dieser Blockierlösung wurde abhängig vom bis dahin verwendeten Procedere ausgewählt; so wurden Blockierungszusätze bei permeabilisierten Zellen der Permeabilisierungslösung (0,5 % Glycin/ 0,1 % Saponin/ PBS) zugesetzt, ansonsten bildete PBS die Grundlage der verwendeten Blockierlösung. Als Blockierzusätze wurden abhängig vom verwendeten Antikörper 1 % BSA (Bovines Serumalbumin) und eventuell 5 % Pferdeserum und/oder 10 % Ziegenserum eingesetzt. Die Inkubation in der Blockierlösung erfolgt für 30-60 min bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4° C.

Antikörper	Typ	Verdünnung	Herstellung
anti-myc 9E10	monoklonal, Maus	1:1000	Covance,USA
anti-myc A-14	polyklonal, Kaninchen	1:500	Santa Cruz Biotechnologies, Inc.
anti-SorICD	polyklonal, Kaninchen	1:3000	Hampe et al., 2000
anti-58k	monoklonal, Maus	1:50	SigmaAldrich
anti-PDI	monoklonal, Maus	1:200	Stressgen Biotechnologies
anti-EEA1	monoklonal, Maus	1:100	BD Biosciences
Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes, Invitrogen
Alexa Fluor 546 conjugated goat anti- mouse IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes, Invitrogen

Die Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in Blockierlösung erfolgte für mindestens 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper verdünnt in Blockierlösung für 45-60 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Abschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und zur Anfärbung von DNA in DAPI-Lösung (5 μ M 4',6-diamidino-2-phenylindole in PBS verdünnt) für 10 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Deckgläschen wurden fünfmal mit PBS gewaschen und abschließend mittels 5-10 μ L Fluoromount G (Southern Biotechn. Assoc., USA) auf Objektträger gebracht. Nach weiteren 60 min ist das Fluoromount G fest getrocknet und die Objektträger sind bei 4° C haltbar.

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie:

Konfokale Bilder wurden mit LSM 510 Meta (Zeiss, Deutschland) aufgenommen. Weil sich die Fragestellung der vorliegenden Arbeit mit der intrazellulären Lokalisierung bzw. eventuell auch Kolokalisierung von Proteinen beschäftigt, wurde das Pinhole (entspricht einer Blende) so ausgewählt, dass sich für die einzelnen Aufnahmen stets Schichtdicken von etwa 0,9-1,1 μ m ergaben. Verwendet wurden 40x bzw. 63x Ölimmersions-Objektive.

Das Auszählen von Zellen für die Beurteilung der relativen Häufigkeit definierter zellulärer Lokalisationen erfolgte im Blindversuch anhand angefertigter konfokaler Bildaufnahmen aus mehreren Experimenten.

3.2. Proteinchemische Methoden:

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die Auftrennung von Proteinen in einer Probe nach ihrem Molekulargewicht erfolgt durch SDS-PAGE. Dafür wurden zunächst alle Proben mit 5x Laemmli-Probenpuffer (0,3 M Tris, pH 6,8, 10 % SDS, 25 % β -Mercaptoethanol, 0,1 mg/mL Bromphenolblau, Glycerol) versetzt und 5 min bei 95° C aufgeköcht. Die 0,75 mm bzw. 1,5 mm dicken Gele (Zusammensetzung s.u.) wurden durch Eingießen und anschließende Polymerisation zwischen zwei fest gestellten Glasplatten hergestellt. Die Gele wurden in eine Elektrophorese-Kammer (Mini-Protean, Biorad) eingespannt, mit Laemmli-Laufpuffer (3 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS, ad 1 L Aqua dest., pH 8,8 mit HCl einstellen) überschichtet und mit den Proteinproben beschickt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 25-30 mA pro Gel.

	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10 %	12 %	5 %
Aqua dest.	8,4 mL	7,25 mL	6,6 mL	3,07 mL
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL	-
0,5 M Tris HCl, pH 6,8	-	-	-	1,25 mL
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	2,8 mL	3,75 mL	4,5 mL	0,625 mL
10 % SDS	150 µL	150 µL	150 µL	50 µL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL	10 µL
10 % APS	50 µL	50 µL	50 µL	35 µL

Western Blot:

Die mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über Western Blot auf eine Membran übertragen, wo sie anschließend spezifisch detektiert werden können. Die Gele wurden hierfür in eine Blotkammer (MiniProtean, Biorad) eingebracht: es wurden 0,45 µm PVDF-Membranen bzw. bei kleinem, erwartetem Molekulargewicht des untersuchten Proteines 0,1 µm P^{SQ}-Membranen (Millipore, USA) entsprechender Größe in reinem Methanol für einige Minuten äquilibriert, dann in Blotting-Puffer (56,2 g Glycin, 12,1 g Tris ad 4 L Aqua dest., plus 1 L reines Methanol) abgespült und frei von Luftblasen auf das Gel gelegt. Gel und Membran wurden beidseits von 3 Lagen in Blotting-Puffer eingeweichem Filterpapier und je einem Polsterschwämmchen umgeben. Die Blotkammer wurde mit eiskaltem Blotting-Puffer randvoll gefüllt. Der Blotvorgang erfolgt bei 400 mA über 1 h. Anschließend wurde die Membran vorsichtig wieder ausgebaut. Gegebenenfalls erfolgte eine Gesamtproteinfärbung durch 5-minütige Inkubation mit Ponceaulösung (Sigma), welche mit Aqua dest. wieder auswaschbar ist. Eine Inkubation in Blockierlösung (je nach später verwendetem Antikörper: 5 % BSA, 0-10 % Milchpulver, Waschpuffer A) erfolgte für mindestens 2 h bei Raumtemperatur (RT) unter stetem Schwenken. Die Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in der zuvor verwendeten Blockierlösung erfolgte schüttelnd über Nacht bei 4° C. Nach Waschen der Membranen für 15 min in Waschpuffer A (45 g NaCl, 12,1 g Tris, 5 g Tween, ad 5 L Aqua dest., pH 7,4), für zweimal 15 min in Waschpuffer B (12,5 g NaDoc, 5 g SDS, 45 g NaCl, 12,1 g Tris, 5 g Tween, ad 5 L Aqua dest., pH 7,4) und

erneut 15 min in Waschpuffer A erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper verdünnt in Blockierlösung für 1-2 h bei RT unter Schwenken. Die Membran wurde wie zuvor beschrieben nochmals 1 h gewaschen. Ein Chemilumineszenz-Substrat (Super Signal West Dura Extended, Pierce) wurde auf der Membran verteilt und durch Exponieren und Entwickeln eines Röntgenfilmes (Biomax MR, Kodak) wurden Proteinbanden sichtbar gemacht.

Antikörper	Typ	Verdünnung	Herstellung
anti-PLD-3	polyklonal, Kaninchen	1:2000	Munck et al., 2005
anti-myc 9E10	monoklonal, Maus	1:500	Covance, USA
anti-LaminA	monoklonal, Maus	1:250	abcam, UK
anti-Art-27	polyklonal, Kaninchen	1:1300	Markus et al., 2002; bereitgestellt von S. Logan
anti-SorICD	polyklonal, Kaninchen	1:3000	Hampe et al., 2000
GARPO (goat-anti-rabbit IgG, Peroxidase-gekoppelt)	Ziege	1:20.000	Jackson Immuno Research, USA
GAMPO (goat-anti-mouse IgG, Peroxidase-gekoppelt)	Ziege	1:20.000	Jackson Immuno Research, USA

Membranpräparation:

Zu verwendende Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in Nährmedium aufgenommen und 5 min bei 1000xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µL PBS/PIC (pro 10 mL PBS je 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) aufgenommen und für den Zellaufschluss 3-5 mal 10 sec bei 50 %-Amplitude mit Ultraschallschallspitze (Branson Digital Sonifier) auf Eis sonifiziert. Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 1000xg und 4° C abgetrennt und anschließend in 200 µL Puffer A aufgenommen (=Zellfraktion). Aus dem

Überstand wurden durch Zentrifugation für 60 min bei 100.000xg und 4° C (TL-100, Beckmann) eine lösliche Überstandsfraction (=lösliche Proteinfraction) und ein Membranpellet gewonnen. Das Pellet wurde in 200 µL Puffer A resuspendiert: dazu wurden Membranen mehrfach durch 20, 24 und 27 G starke Kanülen gezogen (=Membranfraction). Alle Proteinfractionen wurden mit 5x Laemmli-Probenpuffer (0,3 M Tris, pH 6,8, 10 % SDS, 25 % β-Mercaptoethanol, 0,1 mg/mL Bromphenolblau, Glycerol) versetzt und 5 min bei 95° C aufgeköcht. Eine Lagerung erfolgte bei -20° C.

Gewinnung von Membranproteinen mittels Na₂CO₃, NaCl, Triton und PBS:

Bei dieser Methode werden Membranproteine insgesamt durch Solubilisieren der Membranen in Triton X-100, aber auch peripher an Membranen anliegende Proteine durch Ablösung mittels Na₂CO₃ gewonnen (siehe auch Hampe et al., 1999b).

Zu verwendende Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in Nährmedium aufgenommen. Nach Abtrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 1000xg wurden die Zellen in 2 mL PBS/PIC (pro 10 mL PBS je 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultrasonifikation (Branson Digital Sonifier) für sechsmal 10 sec bei 50 %-Amplitude auf Eis. Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 1000xg und 4° C (Sigma-Zentrifuge) abgetrennt und der Überstand in mehrere Aliquots aufgeteilt. Nach erneuter Zentrifugation für 60 min bei 100.000xg und 4° C (TL-100, Beckmann) wurden die gewonnenen Membranpellets jeweils in einem der folgenden Puffer P1-P4 aufgenommen.

P1: PBS/PIC;

P2: 50 mM MES, pH 6, 1 M NaCl, PIC;

P3: 50 mM MES, pH 6, 1 M NaCl, 1 % Triton X-100, PIC;

P4: 100 mM Na₂CO₃, pH 11,5, PIC.

Die Membranen wurden zum Resuspendieren mehrfach durch 20, 24 und 27 G-Kanülen gezogen. Anschließend wurden alle Ansätze 3 h bei 4° C rotiert. Nach Beiseitestellen des mit P1 versetzten Ansatzes (auf Eis) wurden die mit P2-P4 versetzten Proben nochmals für 60 min bei 100.000xg und 4° C (TL-100, Beckmann) zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und den mit P2 und P4 versetzten Membranproben wurde Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Alle Überstände wurden in Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Röhrchen für „10 kDa

membrane cutoff" (Millipore, USA) überführt und 20 min bei 4000xg und 4° C zentrifugiert. Nach Zugabe von jeweils 500 µL 50 mM MES, pH 6/ PIC (Roche) auf alle Aliquots wurden die Ansätze nochmals für 45 min bei 4000xg und 4° C zentrifugiert, bis das Volumen maximal eingengt war. Anschließend wurden alle Proben mit 50 mM MES, pH 6/ PIC auf das gleiche Volumen verdünnt. Alle vier Proben (mit P1-P4 versetzt) wurden mit 5x Laemmli-Probenpuffer (0,3 M Tris, pH 6,8, 10 % SDS, 25 % β-Mercaptoethanol, 0,1 mg/mL Bromphenolblau, Glycerol) versetzt, 5 min bei 95° C aufgeköcht und bei -20° C gelagert.

Deglycosylierung mit PNGase F:

Fertig präparierte und in Laemmli-Probenpuffer aufgeköchte Membranen aus transient transfizierten COS-Zellen (siehe Membranpräparation) wurden 5 min bei 95° C aufgeköcht, mit PNGase-Puffer (0,5 % Triton-X-100, 10 mM EDTA, 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) auf das 10fache Volumen verdünnt und nochmals 5 min bei 95° C aufgeköcht. Nach Abkühlen der Proben auf etwa 37° C wurden zweimal je 30 U PNGaseF (Roche) bzw. gleiches Volumen PNGase-Puffer zugegeben und jeweils 10-14 h bei 37° C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte eine Proteinfällung durch Zugabe von vierfachem Volumen Methanol, einfachem Volumen Chloroform und Verdünnen mit dreifachen Volumen Wasser. Nach Zentrifugation der Proben für 5 min bei 16.100xg und 4° C zur Phasenauftrennung befanden sich die Proteine in der Interphase. Die obere Phase wurde abgetrennt und der unteren Phase wurde das dreifache Volumen an Methanol zugegeben, 5 min bei 16.100xg und 4° C zentrifugiert und das Proteinpellet nach Trocknen in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und bei -20° C gelagert.

Kernextraktion:

Bei der Kernextraktion handelt es sich um eine Methode zur Gewinnung von Kernproteinen (siehe auch: Schreiber et al., 1989). Eingesetzt wurden zu etwa 75-80 % konfluent bewachsene Zellkulturschalen. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Je Petrischale (10 cm Durchmesser) wurden die Zellen in 400 µL Kernextraktions-Puffer A (10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 2 mM DTT, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets/ Roche) abgekratzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden unter Zugabe von Nonidet P-40 auf eine Endkonzentration von 1 % und etwa 15 sec Vortexen aufgeschlossen. Durch

Zentrifugation für 30 sec bei 16.100xg wurde ein Kernpellet gewonnen. Die Zellkerne wurden in 200-300 µL Kernextraktions-Puffer B (Kernextraktions-Puffer A plus 400 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40) resuspendiert und 15 min bei 4° C rotiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4° C und 16.100xg wurde der Überstand für 40 min bei 4° C und 100.000xg nochmals zentrifugiert. Die Kernextrakte (=Überstand) wurden abgenommen und mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 10 %). Eine Lagerung erfolgte bei -80° C.

3.3. Molekularbiologische Methoden:

RT-PCR:

Für die RNA-Isolation wurden je Ansatz konfluent gewachsene Zellen aus einem Loch einer 6-Loch-Platte (Nunc) eingesetzt. Die RNA-Isolation wurde mithilfe des Kits NucleoSpin® RNA II (Machery-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Kontrolle erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese.

Die gewonnene RNA wurde zur Synthese von cDNA eingesetzt. Es wurden 1 µL isolierte RNA, 1 µL Oligo-dT (Invitrogen), 1 µL RNaseInhibitor (Invitrogen), 2 µL Aqua dest. für 10 min bei 70° C gemeinsam inkubiert. Dieser Ansatz wurde weiter mit 2 µL 0,1 mM DTT, 1 µL dNTP-Mix (10 mM je dNTP), 1 µL MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen), 4 µL 5x ReverseTranskriptase-Puffer (Invitrogen) und 7 µL Aqua dest. versetzt und 60 min bei 37° C inkubiert.

Die anschließende PCR wurde sowohl für das zu untersuchende Art-27 als auch zur Kontrolle für das *house keeping gene* GAPDH durchgeführt. Für die PCR für Art-27 wurden 1 µg cDNA, 0,2 µL Platinum Taq-Polymerase (Invitrogen), 5 µL 10x Platinum Taq-Polymerase-Puffer, 1 µL dNTP-Mix (je 10 mM), 1,5 µL 50 mM MgCl₂ und je 0,5 µL von den Primern Art-27PCRfor und Art-27revok ad 50 µL Aqua dest. zusammengegeben. Die DNA-Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung für 2 min bei 94° C, dann 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94° C, 30 sec Annealing bei 55° C und 40 sec Extension bei 72° C, die finale Elongation erfolgte für 10 min bei 72° C. Eine Lagerung der PCR-Produkte erfolgte weiter bei 4° C bzw. -20° C. Für die PCR für GAPDH wurden 1 µg cDNA, 0,5 µL Platinum Taq-Polymerase (Invitrogen), 2,5 µL 10x Platinum Taq-Polymerase-Puffer, 1 µL dNTP-Mix (je 10 mM), 1 µL 50 mM MgCl₂ und je 0,5 µL von den Primern GAPDHsense und GAPDHantisense ad 25 µL Aqua dest. zusammengegeben. Die DNA-Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung

für 5 min bei 94° C, dann 35 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 95° C, 30 sec Annealing bei 60° C und 30 sec Extension bei 72° C, die finale Elongation erfolgte für 7 min bei 72° C. Eine Produktkontrolle erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese.

Primer	Sequenz
Art27PCRfor	5'-ATA AGC TTG CCA CCA TGG CGA CGC CCC CTA AGC-3'
Art27revok	5'-ATT CTC TAG AAT GGT GAG GCT TCT CTG GG-3'
GAPDHsense	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
GAPDHantisense	5'-TTC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Agarose-Gelelektrophorese:

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Je nach erwarteter Größe wurden 1-2 % Agarose in TBE-Puffer (10,8 g Tris, 5,5 g Borsäure, 20 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0 mit Essigsäure einstellen, ad 1 L Aqua dest.) aufgekocht, mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und in eingespannte Gelschlitten gegossen. Nachdem die Agarose-Gele erstarrt sind, wurden sie in die Elektrophorese-Kammer (Biorad) eingelegt und mit TBE-Puffer überschichtet. Zu untersuchende Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer (250 mg Bromphenolblau, 250 mg Xylencyanol, 33 mL 150 mM Tris, pH 7,6, 60 mL Glycerol, ad 100 mL Aqua dest.) beschwert und in die Geltaschen eingefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100-200 V. Die Darstellung von Nukleinsäurebanden erfolgt unter UV-Licht.

3.4. Bioinformatische Methoden:

Untersuchungen von Proteinsequenzen:

Analysen zur Hydrophobizität von Proteinsequenzen wurden mit dem Programm DNASar 4.0 durchgeführt und als Hydrophobizitäts-Plot nach Kyte und Doolittle dargestellt.

4. Ergebnisse

Der Neurorezeptor SorLA/LR11 ist an zahlreichen physiologischen wie pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Dabei bindet SorLA/LR11 Liganden aus verschiedenen funktionellen Systemen, wird selbst mehrfach prozessiert und vermittelt so deren Signale an das Zellinnere. Ausgehend von einer Hefedoppelhybridanalyse wurden drei Kandidaten für eine Interaktion mit der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 (SorICD) gefunden, welche in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

4.1. Hu-K4

Zur Klärung einer möglichen Interaktion zwischen dem C-terminalen Bereich von Hu-K4 und SorICD wurden zunächst Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der beiden Proteine durchgeführt. Eine Interaktion findet dabei am ehesten in demjenigen Zellkompartiment statt, in dem beide Proteine lokalisiert sind, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Aufklärung der Genstruktur (Munck, 2004) führte zur Identifizierung einer hydrophoben Region im Protein (Abb. 4.1.), welche auch die Anreicherung von Hu-K4 in Zellmembranen erklärte. Vorhersagen des Programms DNASTar führen zur Annahme einer möglichen Membrandomäne bestehend aus 17 Aminosäuren. Membranproteine des Endoplasmatischen Retikulums können transmembran oder durch Verankerung an der Membran luminal sowie vollständig extraluminal des ER liegen. Da Hu-K4 durch sein Laufverhalten bei der Gelelektrophorese größer erscheint als das berechnete Molekulargewicht von 55 kDa, sind Modifizierungen des Proteins zu vermuten. Einen ersten Hinweis darauf liefern sieben mögliche N-Glykosylierungsmotive C-terminal des hydrophoben Areals (Abb. 4.1. A). Solche N-Glykosylierungen gehören zu den posttranslationalen Modifikationen, wie sie nur im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums stattfinden. Um N-Glykosylierungen von Hu-K4 nachzuweisen, wurden Membranen aus transient transfizierten COS-Zellen mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) behandelt (Abb. 4.2. B). Im Vergleich zu unbehandelten Membranen zeigt sich nach elektrophoretischer Auftrennung ein schnelleres Laufverhalten für Hu-K4 knapp oberhalb der 50 kDa-Markerbande. Auch Experimente, bei denen COS-Zellen für 24 h unter Einwirkung des Glykosylierungshemmstoffes Tunicamycin standen (Abb. 4.2. A), zeigen in der

A.

```

1  M K P K L M Y Q E L   K V P A E E P A N E   L P M N E I E A W K   30
31  A A E K K A R W V L   L V L I L A V V G F   G A L M T Q L F L W   60
61  E Y G D L H L F G P   N Q R P A P C Y D P   C E A V L V E S I P   90
91  E G L D F P N A S T   G N P S T S Q A W L   G L L A G A H S S L   120
121 D I A S F Y W T L T   N N D T H T Q E P S   A Q Q G E E V L R Q   150
151 L Q T L A P K G V N   V R I A V S K P S G   P Q P Q A D L Q A L   180
181 L Q S G A Q V R M V   D M Q K L T H G V L   H T K F W V V D Q T   210
211 H F L G S A N M D W   R S L T Q V K E L G   V V M Y N C S C L A   240
241 R D L T K I F E A Y   W F L G Q A G S S I   P S T W P R F Y D T   270
271 R Y N Q E T P M E I   C L N G T P A L A Y   L A S A P P P L C P   300
301 S G R T P D L K A L   L N V V D N A R S F   I Y V A V M N Y L P   330
331 T L E F S H P H R F   W P A I D D G L R R   A T Y E R G V K V R   360
361 L L I S C W G H S E   P S M R A F L L S L   A A L R D N H T H S   390
391 D I Q V K L F V V P   A D E A Q A R I P Y   A R V N H N K Y M V   420
421 T E R A T Y I G T S   N W S G N Y F T E T   A G T S L L V T Q N   450
451 G R G G L R S Q L E   A I F L R D W D S P   Y I H D L D T S A D   480
481 S V G N A C R L L

```

B.

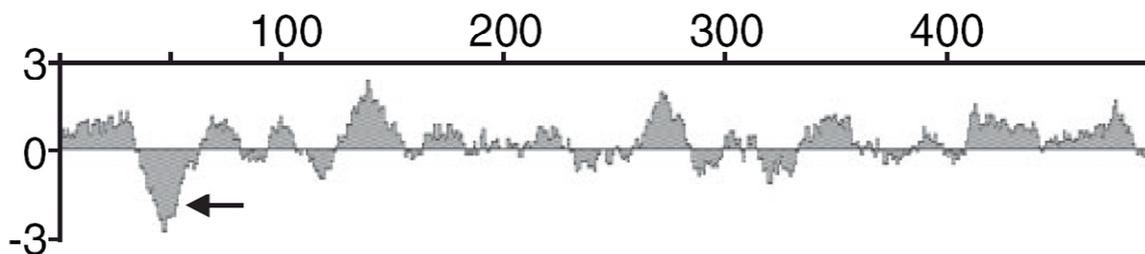


Abb. 4.1.: Sequenzanalyse von Hu-K4. A. Proteinsequenz von Hu-K4 mit putativer Transmembrandomäne grau unterlegt und möglichen N-Glykosylierungsmotiven mit der Sequenz NxT/S orange unterlegt. B. Hydrophobizitätsplot von Hu-K4 mit Pfeil auf wahrscheinliche Transmembrandomäne gerichtet.

Western Blot-Analyse ein verringertes Molekulargewicht als Ausdruck der fehlenden N-Glykosylierung. Beides weist auf eine Lokalisation der C-terminalen Domäne von Hu-K4 innerhalb des ER-Lumens hin und schließt damit eine physiologische Interaktion mit der cytosolischen Domäne von SorLA/LR11 aus.

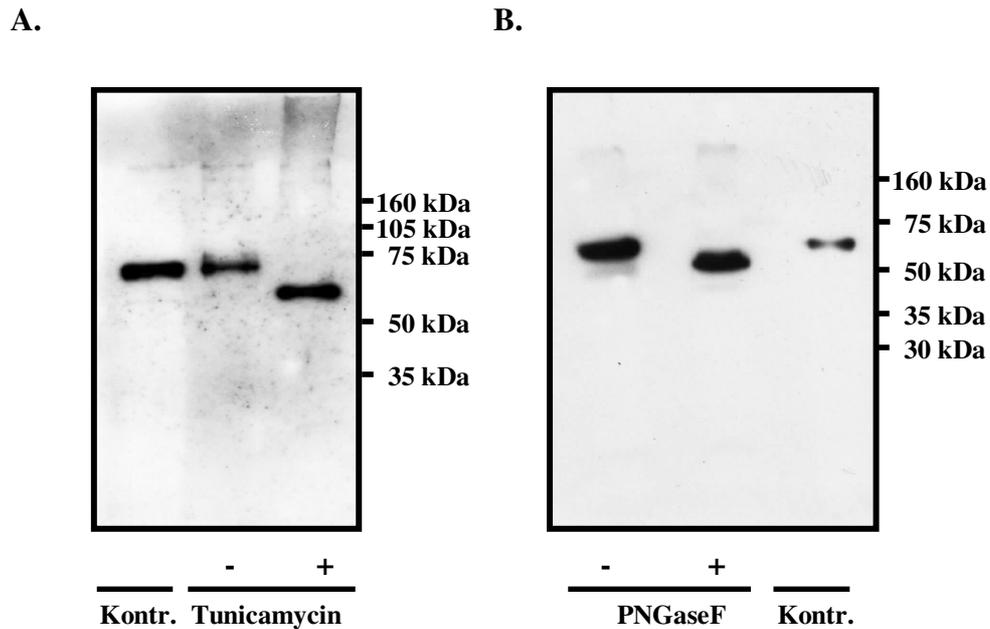
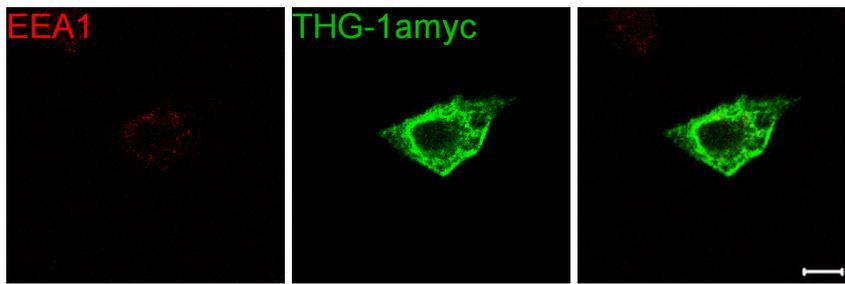


Abb. 4.2.: Glykosylierung von Hu-K4. COS-Zellen wurden mit Hu-K4 per Elektroporation transient transfiziert, ihre Membranfraktionen gewonnen und auf ein 10 % SDS-PAA-Gel aufgetragen. Analyse durch Western Blot erfolgte mit einem primären Antikörper gegen Hu-K4 und entsprechendem Sekundärantikörper. Als Kontrolle wurden unbehandelte Membranen aus Hu-K4 transfizierten COS-Zellen verwendet. A. Hu-K4 transfizierte COS-Zellen wurden vor Präparation der Membranen für 24 h mit (+) bzw. ohne (-) den Glykosylierungshemmstoff Tunicamycin (1 μ g/mL) inkubiert; B. Membranfraktionen von Hu-K4 transfizierten COS-Zellen wurden vor SDS-PAGE mit Peptid-N-Glykosidase F (+) bzw. nur dem Inkubationspuffer (-) behandelt.

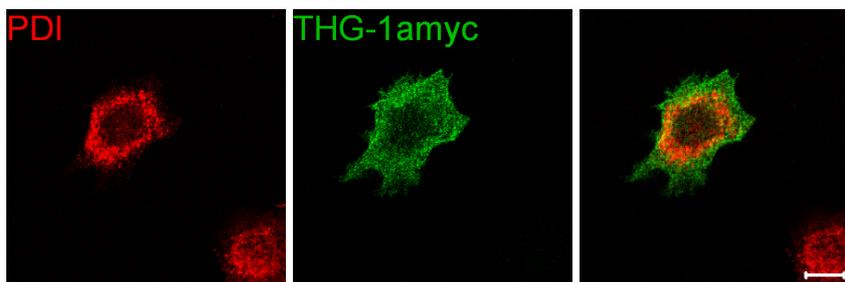
3.2. THG-1a

THG-1 und THG-1a werden beide als Transkriptionsregulatoren bei proliferativen Vorgängen diskutiert. Beide Proteine kommen löslich in Zellen vor, sind aber ähnlich wie SorLA/LR11 auch in zellulären Membranen angereichert (Munck, 2004). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden auf die in neuronalen Geweben exprimierte Spleißvariante THG-1a eingeeengt. Eine direkte Interaktion mit SorLA/LR11 wäre bei einer ähnlichen intrazellulären Verteilung anzunehmen. Im Laufe der intrazellulären Reifung durchläuft SorLA/LR11 verschiedene Zellkompartimente wie das Endoplasmatische Retikulum, Golgi-Apparat und frühe Endosomen. Um einen möglichen Aufenthalt von THG-1a in einem dieser Bereiche zu untersuchen, wurden CHO-K1-Zellen transient mit einem myc-getaggen THG-1a-Konstrukt (pcDNA3.1/myc-His_THG-1a) transfiziert (im Folgenden als THG-1a_{myc} bezeichnet)

A. Endosomen



B. Endoplasmatisches Retikulum



C. Golgi-Apparat

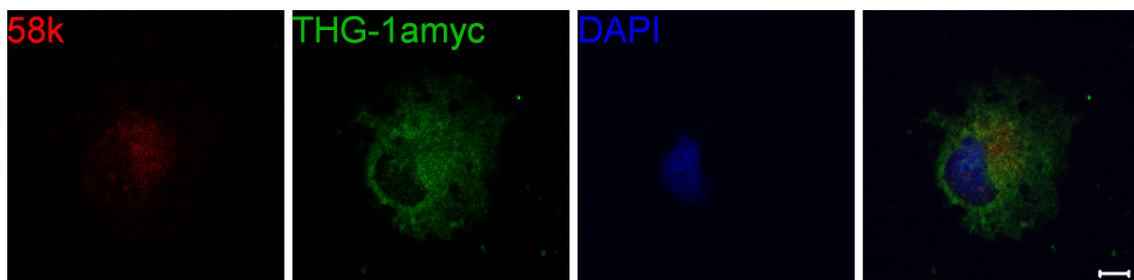
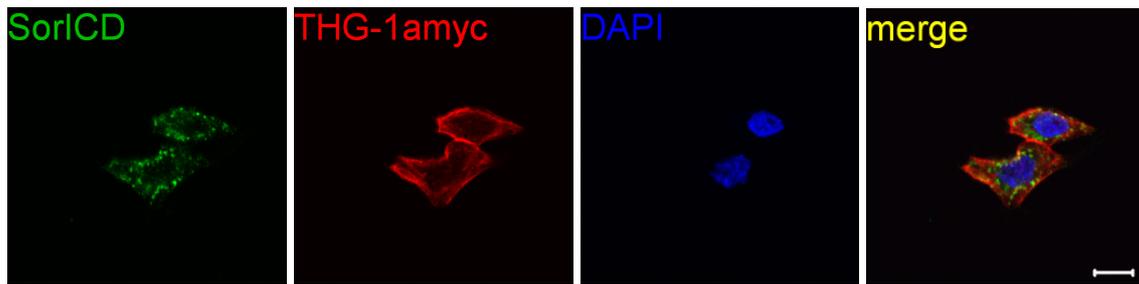


Abb. 4.3.: Lokalisierung von THG-1amyc und Markerproteinen für Endosomen, Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat. THG-1amyc transfizierte Zellen wurden immunocytochemisch mit einem primären Antikörper gegen das myc-Epitop und einem AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (grün). Zusätzlich wurden Markerproteine der Zellkompartimente Endosomen, Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat detektiert, der hierfür verwendete Sekundärantikörper ist AlexaFluor546-gekoppelt (rot). Alle konfokalen Aufnahmen zeigen Schichtdicken von 1-1,1µm, der Skalierungsbalken zeigt 10 µm Länge. *A.* Bei CHO-K1 Zellen wurde zur Detektion von frühen Endosomen ein Primärantikörper gegen EEA1 (*early endosome antigen 1*) verwendet. *B.* Bei CHO-K1 Zellen wurde zur Detektion des Endoplasmatischen Retikulums ein Primärantikörper gegen PDI (*Protein disulfide isomerase*) verwendet. *C.* Bei COS-Zellen wurde zur Detektion des Golgi-Apparates ein Primärantikörper gegen 58k (*58 kDa Golgi Protein*) verwendet. Eine Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) (blau).

A.



B.

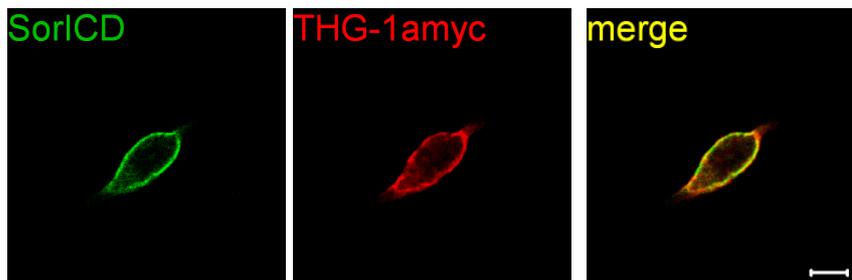


Abb. 4.4.: Kolokalisierung von THG-1myc und SorLA/LR11. THG-1myc und SorLA/LR11 wurden mittels Elektroporation in CHO-K1 (A.) bzw. HT-22 (B.) Zellen transfiziert und immunocytochemisch dargestellt. Die Detektion von THG-1myc erfolgte mit einem Antikörper gegen das myc-Epitop und einem AlexaFluor546-gekoppelten Sekundärantikörper (rot). Die Detektion von SorLA/LR11 erfolgte mit einem primären Antikörper gegen SorICD und einem AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün). Überlagerungen zeigen sich gelb. Eine Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die konfokalen Bildaufnahmen zeigen Schichtdicken von 1-1,1 μ m. Skalierungsbalken: 10 μ m.

und immunocytochemisch mit für die Zellkompartimente entsprechenden Markerproteinen angefärbt (Abb. 4.3.). Dabei sind Kolokalisierungen von THG-1myc mit EEA1 (*early endosome antigene-1*) oder PDI (*proteine disulfide isomerase*) partiell erkennbar. Wegen deutlicher unspezifischer Reaktivität des anti-58k-Antikörpers in CHO-K1 Zellen wurde in diesem Fall auf COS-Zellen zurückgegriffen. Eine Kolokalisierung mit 58k (*58 kDa Golgi-Protein*) ist hier ebenfalls partiell sichtbar. Es ist jedoch zu beachten, dass auch bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie derart schwache Überlappungen des Fluoreszenzsignals nicht Zeichen einer Kolokalisation von THG-1myc in einem der untersuchten Zellkompartimente gleichzusetzen sind, so dass für keines dieser Kompartimente eine Anreicherung mit THG-1myc wahrscheinlich ist.

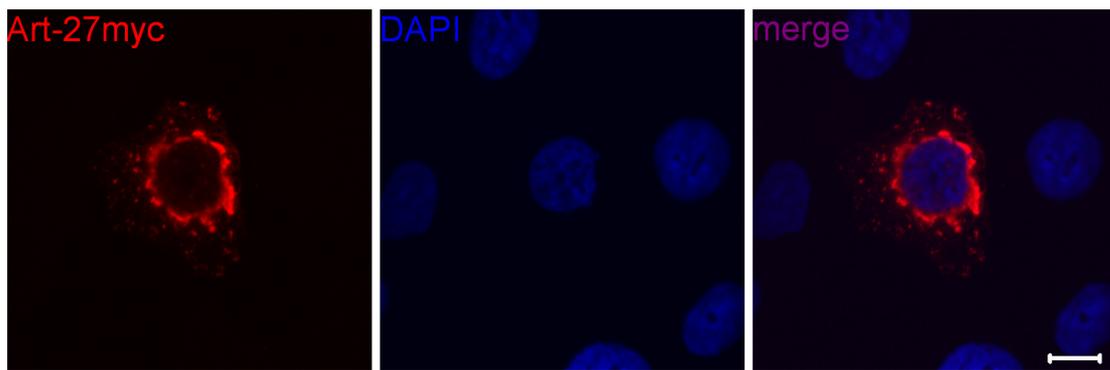
Für eine erste Annäherung an die Frage nach einer zellulären Interaktion zwischen SorLA/LR11 und THG-1*myc* wurden diese gemeinsam heterolog in verschiedenen Zelllinien exprimiert. Eine gleichzeitige Transfektion von CHO-K1 Zellen mit THG-1*myc* und SorLA/LR11 zeigt immuncytochemisch differente Verteilungsmuster für beide Proteine an (Abb. 4.4.). Während für SorLA/LR11 eine vesikuläre, perinukleär betonte Verteilung auftritt, wie sie in der Literatur schon beschrieben ist, zeigt THG-1*myc* eher ein peripheres, filamentartig erscheinendes Muster. Bisherige Untersuchungen zu den Mitgliedern der TSC-Familie deuten auf Einflüsse bei Proliferation und Differenzierung (Shibanuma et al., 1992). Um eine Beteiligung von SorLA/LR11 an diesen Prozessen zu untersuchen, wurden cotransfizierte CHO-K1 Zellen für 0, 2, 10 und 30 min mit 2 nM HA induziert und immuncytochemisch dargestellt (nicht gezeigt). In diesen Induktionsversuchen zeigte sich weder eine Veränderung der subzellulären Verteilung von THG-1*myc* noch eine aufkommende Kolokalisierung mit SorLA/LR11. Überraschenderweise wurden jedoch bei gleichem Versuchsaufbau mit der neuronalen Hippocampus-Zelllinie HT-22 Kolokalisierungen beobachtet. SorLA/LR11 und THG-1*myc* sind hier im Zellrandbereich besonders stark anfärbbar. Induktionsversuche mit HA zeigten jedoch auch hier keinen Effekt auf das Verteilungsmuster. Alle an HT-22 Zellen durchgeführten Experimente sind aufgrund von Transfektionsraten von < 1 % jeweils nur an geringen Zellzahlen durchgeführt worden und daher eingeschränkt beurteilbar. Dennoch weisen die Induktionsversuche mit HA auf eine fehlende physiologische Interaktion zwischen SorICD und THG-1*myc*. Hierzu passen bisherige Ergebnisse mit THG-1a-mRNA, welche eine starke Expression im Corpus callosum darstellen (Munck, 2004). Diese anatomische Struktur beinhaltet als Verbindungseinheit beider Hemisphären des Gehirns weitestgehend neuronale Zellfortsätze und Gliazellen, so dass eine überwiegend gliale Expression für THG-1a diskutiert wird. Im Gegensatz dazu wird SorLA/LR11 deutlich in Neuronen exprimiert, was eine intrazelluläre Interaktion unwahrscheinlicher macht. Obwohl in der bisherigen Literatur THG-1 als konstant im Zellkern angereichert beschrieben worden ist (Kester et al., 1999), war in keiner der untersuchten Zelllinien eine solche Kernanreicherung zu erkennen. Ursächlich hierfür kann eine Beeinträchtigung der zellulären Lokalisation sowohl durch die Position des *myc*-tags als auch durch den heterologen Expressionsmodus sein.

4.3. Art-27

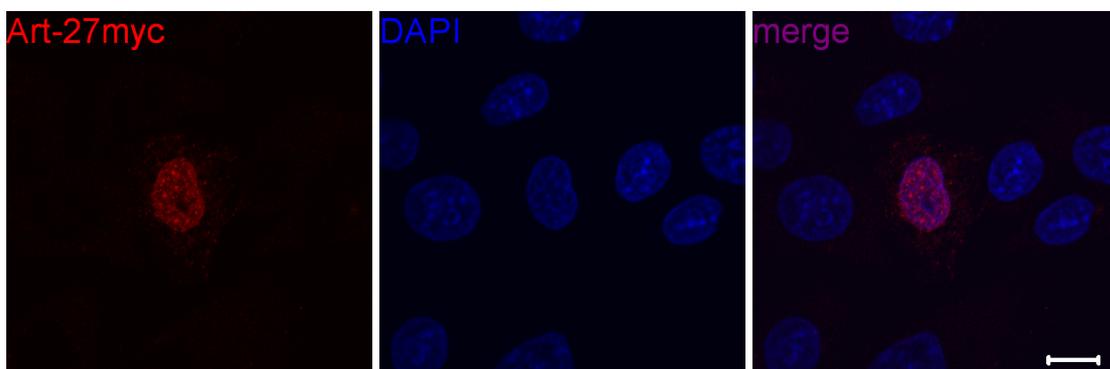
Bisherige Untersuchungen zu Art-27 weisen auf einen aktivierenden Transkriptionsfaktor in der Signalkaskade des Androgen-Rezeptors hin, welcher sich vorwiegend in Kernarealen, aber auch im Cytosol darstellen lässt (Markus et al., 2002). Für weitergehende Untersuchungen zur Klärung einer physiologischen Interaktion zwischen SorICD und Art-27 wurden aus Mangel an einem für Immunfluoreszenz geeigneten Antikörper gegen endogenes Art-27 in der vorliegenden Arbeit Zellen transient mit einem Expressionskonstrukt für myc-getaggtetes Art-27 (pcDNA3.1/Art-27-myc-His) transfiziert (im Folgenden als Art-27myc bezeichnet). Trotz Verwendens verschiedener Protokolle für physikalische und auch chemische Transfektionsmethoden ist es nicht gelungen, Transfektionsraten von etwa 2-3 % in CHO-K1 bzw. COS-Zellen zu übertreffen. Weiterhin auffallend war, dass stets nur vereinzelte Zellen nach Transfektion mit Art-27myc immunocytochemisch anfärbbar waren, nicht jedoch wie erwartet mehrere nahe beieinander liegende Zellen. Lichtmikroskopisch war jedoch kein Unterschied in der Morphologie der transfizierten Zellen feststellbar. Ursächlich hierfür können eine verminderte bzw. gestörte Teilungs- oder auch Überlebensfähigkeit von transfizierten gegenüber nicht-transfizierten Zellen sein.

Trotz dieser Einschränkung wurden auch wegen der fehlenden Möglichkeit der Detektion von endogenem Art-27 weitergehende Untersuchungen mit dem überexprimierenden Zellmodell durchgeführt. Zur Charakterisierung der zellulären Verteilung von Art-27 wurden zunächst CHO-K1 Zellen transient mit Art-27myc transfiziert und immunocytochemisch angefärbt. Es zeigten sich verschiedene zelluläre Verteilungsmuster für Art-27myc, welche sich in drei Gruppen einordnen ließen (Abb. 4.5.). Bei einem Teil der Zellen ist Art-27myc hauptsächlich perinukleär verteilt und bildet dabei meist einen Ring um den Zellkern herum. Häufig finden sich zudem zur Zelloberfläche hin in der Anzahl abnehmende, kleine vesikulär erscheinende Ansammlungen (Abb. 4.5. A). Ein zweiter Teil zeigt für Art-27myc eine diffuse, weitgehend homogene Verteilung im Zellkern selbst (Abb. 4.5. B). Dabei sind in der Zellperipherie keine weiteren Bereiche anfärbbar. Ein dritter Teil zeigt Art-27myc in diffuser Verteilung im Bereich des Zellkerns häufig mit zusätzlicher, ringförmiger Intensitätssteigerung im Randbereich des Zellkerns und zahlreichen perinukleär betonten, stark anfärbbaren, vesikulär erscheinenden Ansammlungen (Abb. 4.5. C). Morphologisch erscheint dieser Teil der Art-27myc transfizierten CHO-K1 Zellen wie ein Mischtyp aus den beiden erstbeschriebenen Gruppen.

A.



B.



C.

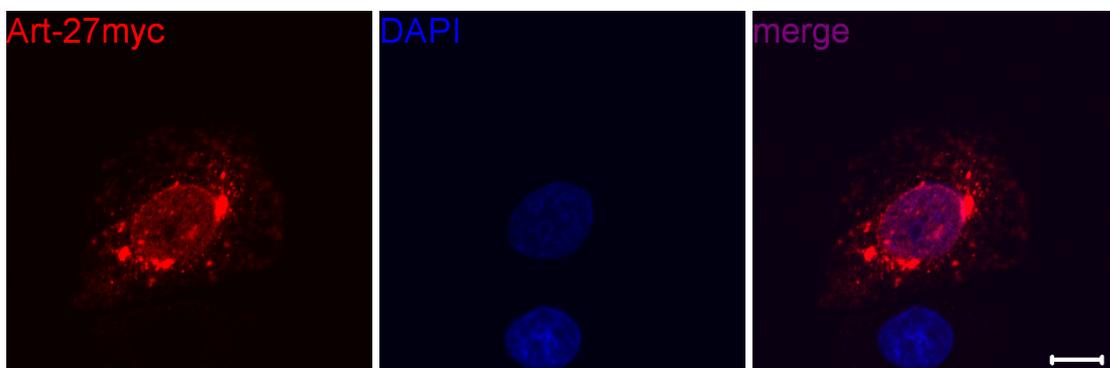
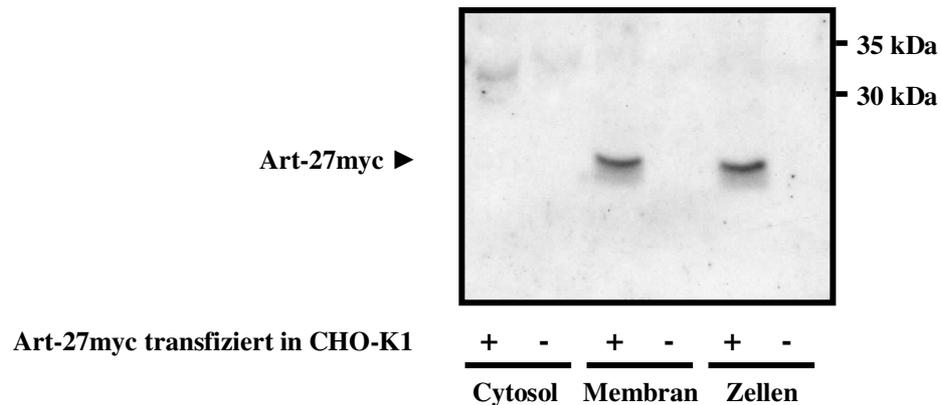


Abb. 4.5.: Expression von Art-27myc in CHO-K1. Art-27myc wurde per Elektroporation in CHO-K1 Zellen transfiziert und anschließend immunocytochemisch mit einem primären Antikörper gegen das myc-Epitop und einem AlexaFluor546-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) detektiert. Eine Anfärbung des Zellkerns erfolgte mittels DAPI (blau). Die konfokalen Aufnahmen zeigen eine Schichtdicke von 1-1,1 μm ; Skalierungsbalken: 10 μm .

Diese Veränderlichkeit im Erscheinungsbild der transfizierten Zellen führte zur Annahme eines eher löslichen Proteins, welches in verschiedenen zellulären Zusammenhängen seine Lokalisation innerhalb der Zelle verändern kann. So wurden in

A.



B.

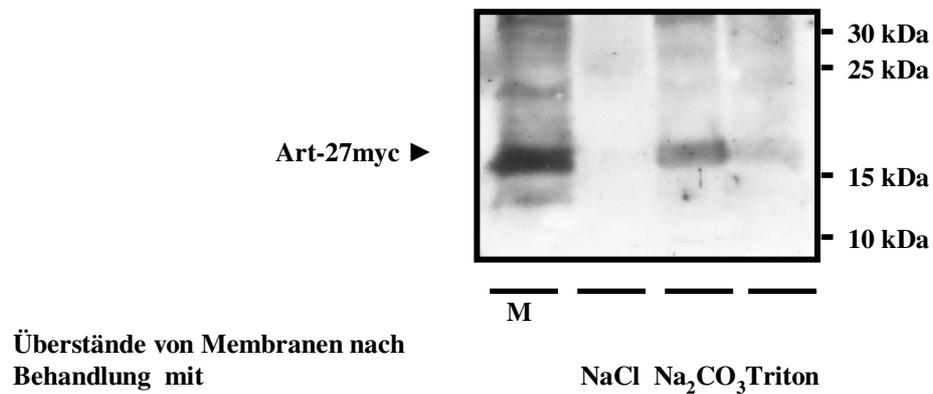


Abb. 4.6.: Membranassoziation von Art-27myc. Art-27myc transfizierte CHO-K1 Zellen wurden zum Zwecke der Membranpräparation mechanisch aufgeschlossen und in lösliche bzw. membrangebundene Fraktionen aufgetrennt (A.) oder es wurden nach Abtrennung der löslichen Fraktion die Membranen für 2 h mit NaCl, Na₂CO₃ bzw. Triton X-100 behandelt, anschließend durch Zentrifugation abgetrennt und die Überstände aufgetragen (B.). Proteinproben wurden auf 12 % SDS-PAA-Gele aufgetragen; die Analyse der Western Blots erfolgte mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen myc. Als positive Kontrolle wurden unbehandelte Membranen (M) von transfizierten Zellen in PBS aufgenommen.

einem nächsten Schritt ausgehend von mit Art-27myc transient transfizierten CHO-K1 Zellen lösliche Proteine und Membranfraktionen gewonnen und im Western Blot analysiert (Abb. 4.6. A). Überraschenderweise zeigte sich eindeutig eine Bande in der Membranfraktion der Zellen, jedoch gar keine in der löslichen Fraktion.

Eine Analyse der Proteinsequenz mit dem Programm DNASTar im Hinblick auf hydrophobe Sequenzbereiche lieferte keinen Hinweis auf eine mögliche

A.

```

1  M A T P P K R R A V   E A T G E K V L R Y   E T F I S D V L Q R   30
31 D L R K V L D H R D   K V Y E Q L A K Y L   Q L R N V I E R L Q   60
61 E A K H S E L Y M Q   V D L G C N F F V D   T V V P D T S R I Y   90
91 V A L G Y G F F L E   L T L A E A L K F I   D R K S S L L T E L   120
121 S N S L T K D S M N   I K A H I H M L L E   G L R E L Q G L Q N   150
151 F P E K P H H

```

B.

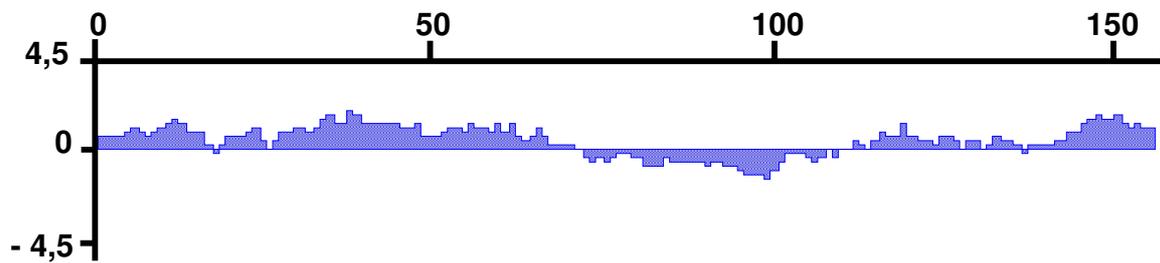


Abb. 4.7.: Sequenzanalyse von Art-27. Proteinsequenz (A.) und Hydrophobizitätsplot (B.) von Art-27.

Transmembrandomäne von Art-27 (Abb. 4.7.). Um die Möglichkeit zu klären, ob es sich bei Art-27 um ein peripher an der Membran anliegendes Protein handeln könnte, wurden Art-27myc enthaltende zelluläre Membranen gewonnen und diese anschließend mit Na_2CO_3 behandelt. Mit dieser Methode können an Membranen assoziierte Proteine abgelöst werden. Abb. 4.6. B zeigt eine Western Blot-Analyse von Membranüberständen nach Behandlung mit Na_2CO_3 , Triton X-100 und NaCl. Eine deutliche Bande erscheint nach Behandlung mit Na_2CO_3 . Auch nach Solubilisierung der Membranen in Triton X-100 ist eine schwache Bande erkennbar. Bei Zugabe von NaCl ist wie erwartet keine Art-27myc-Reaktivität gegeben. Diese Ergebnisse deuten gemeinsam daraufhin, dass Art-27myc peripher an zellulären Membranen anliegt. Um erste Hinweise zu erhalten, in welchem membranösen Zellkompartiment sich Art-27myc anreichert, wurden im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 bevorzugt Kompartimente getestet, welche für SorLA/LR11 von Bedeutung sind. Co-Immunfärbungen mit anti-EEA1 für Endosomen, anti-PDI für Endoplasmatisches Retikulum und anti-58k für Golgi-Apparat zeigten keine Kollokalisierung mit Art-27myc und ergaben somit keinen Hinweis für eine Anreicherung von Art-27myc an diesen Zellkompartimenten (Abb. 4.8.).

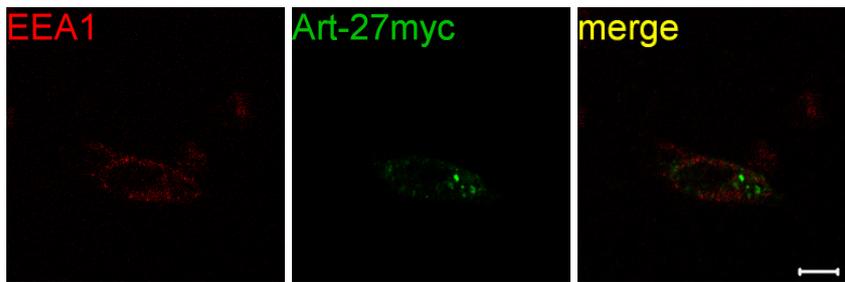
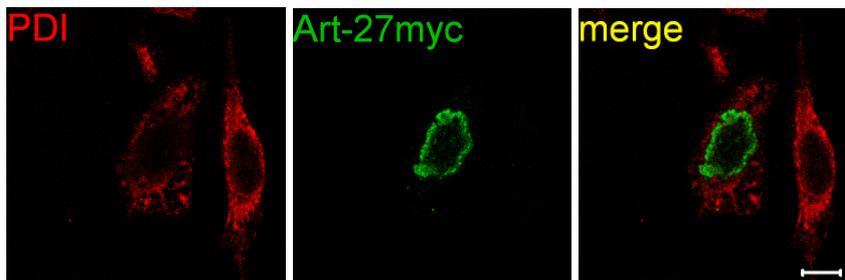
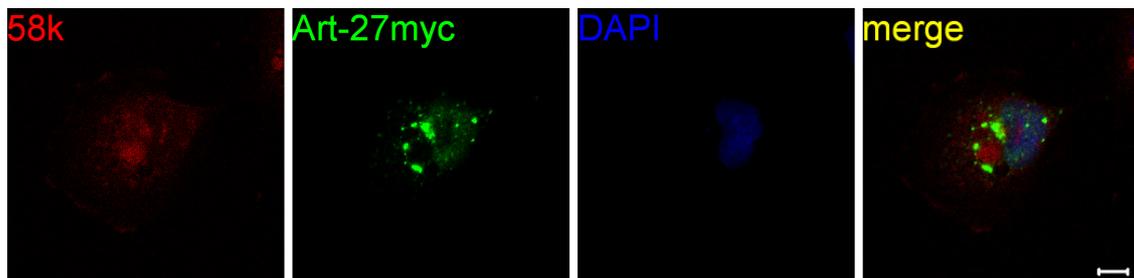
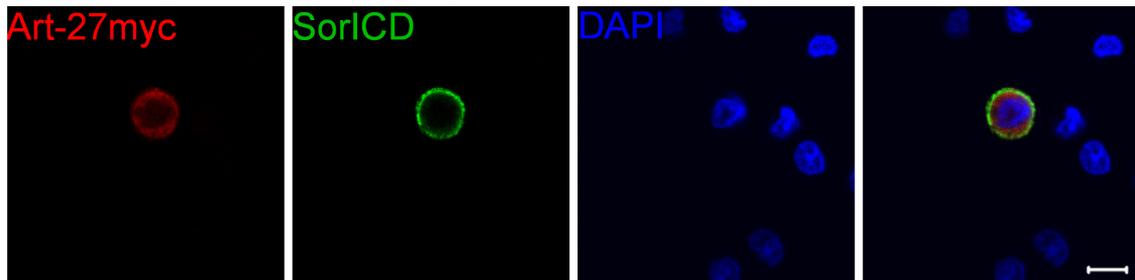
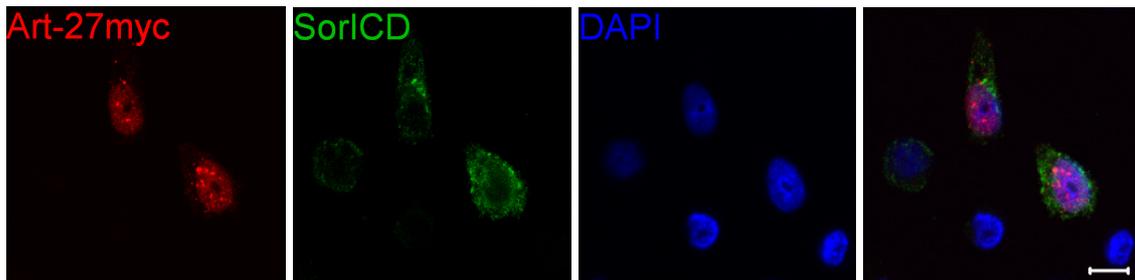
A. Endosomen**B. Endoplasmatisches Retikulum****C. Golgi-Apparat**

Abb. 4.8.: Lokalisierung von Art-27myc mit Markerproteinen für Endosomen, Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat. Zellen wurden mittels Elektroporation mit Art-27myc transfiziert und immunocytochemisch dargestellt. Die Detektion von Art-27myc erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper gegen das myc-Epitop und entsprechendem AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün). Zusätzlich wurden Markerproteine der Zellkompartimente Endosomen (EEA1), Endoplasmatisches Retikulum (PDI) und Golgi-Apparat (58k) mittels AlexaFluor546-gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert (rot). Die konfokalen Aufnahmen zeigen Schichtdicken von 1-1,1 μ m; Skalierungsbalken: 10 μ m. A, B. CHO-K1 Zellen. C. COS-Zellen. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau).

A.



B.



C.

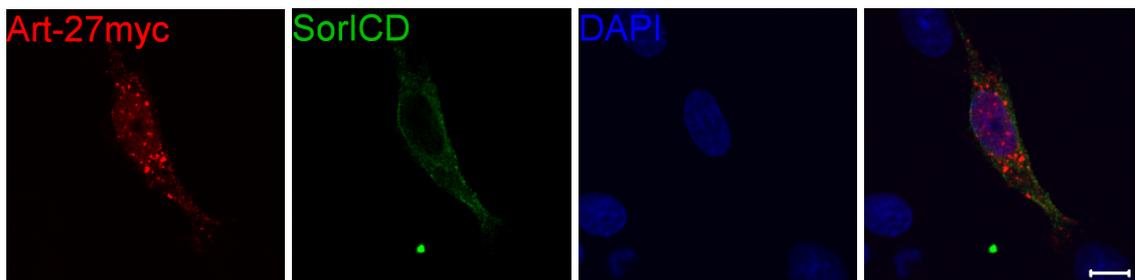


Abb. 4.9.: Kolokalisierung von Art-27myc und SorLA/LR11 in CHO-K1. Art-27myc und SorLA/LR11 cotransfizierte CHO-K1 Zellen sind in der Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Art-27myc wurde mit einem monoklonalen, primären Antikörper gegen das myc-Epitop und einem sekundären AlexaFluor546-gekoppelten Antikörper (rot) detektiert. SorLA/LR11 wurde mit einem Antikörper gegen SorICD und einem AlexaFluor488-gekoppelten Antikörper (grün) detektiert. Eine Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Die konfokalen Aufnahmen zeigen Schichtdicken von 1-1,1 μm ; Skalierungsbalken 10 μm .

Zur Aufklärung einer möglichen physiologischen Interaktion von SorLA/LR11 mit seinem putativen Interaktionspartner Art-27 wurden CHO-K1 Zellen transient mit SorLA/LR11 und Art-27myc transfiziert und immunocytochemisch dargestellt (Abb. 4.9.). Die zelluläre Verteilung von SorLA/LR11 zeigt eine membranständige bis intrazelluläre Verteilung, mit dabei deutlich extranukleärer Anreicherung. Diese

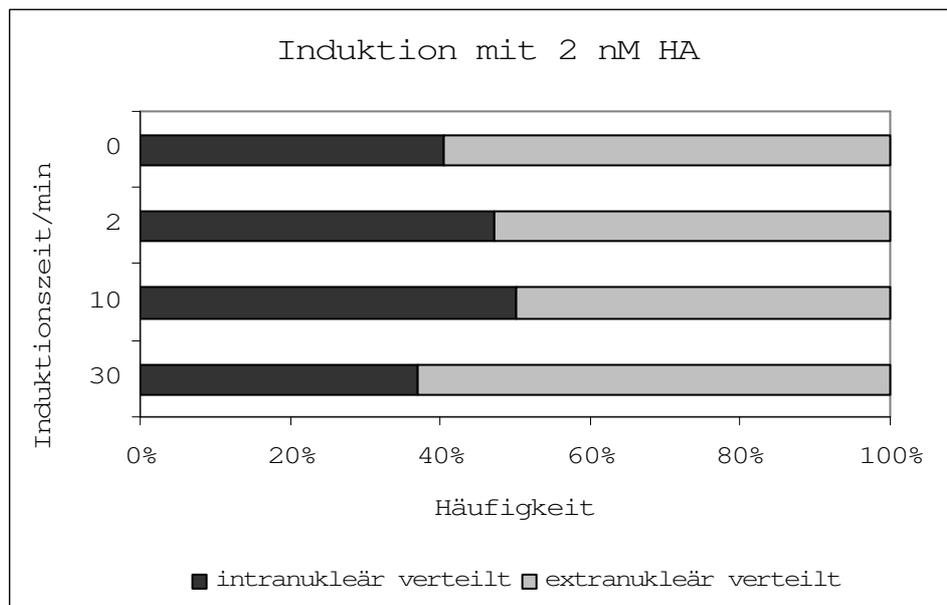


Abb. 4.10.: Häufigkeit von Art-27myc im Zellkern nach Induktion mit HA. Art-27myc und SorLA/LR11 wurden mittels Elektroporation in CHO-K1 Zellen transfiziert. Nach eintägiger Wachstumsperiode wurden Liganden-Induktionen mit 2 nM HA für t=0, 2, 10 und 30 min eingeleitet. Die Zellen wurden mit primären Antikörpern gegen das myc-Epitop und SorICD und entsprechenden Sekundärantikörpern immunocytochemisch angefärbt und anschließend mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Alle Aufnahmen wurden bezüglich des Vorhandenseins einer Kernlokalisation von Art-27myc beurteilt und ausgezählt. Insgesamt wurden n=188 cotransfizierte Zellen aus 4 Experimenten analysiert (n=52 bei 0 min, n=55 bei 2 min, n=54 bei 10 min und n=27 bei 30 min HA-Inkubation). Die Induktionsdauer in min ist gegen die Häufigkeit vorhandener Kernlokalisation von Art-27myc in Prozent aufgetragen.

zelluläre Verteilung ist unabhängig von der des Art-27myc. Hier erscheinen weiterhin die drei bereits beschriebenen Lokalisationsmuster: Art-27myc ist vorwiegend um den Zellkern herum verteilt, erreicht dabei jedoch nicht die Zelloberfläche (Abb. 4.9. A), oder es weist eine überwiegend homogene Verteilung im Zellkern selbst auf (Abb. 4.9. B), oder es verteilt sich homogen über den gesamten Zellkern und darüber hinaus in vesikulären, um den Zellkern sich häufenden Ansammlungen (Abb. 4.9. C). Damit ist eine Änderung der Lokalisation von Art-27myc durch das bloße Vorhandensein von SorLA/LR11 nicht gegeben. Auch zeigen Induktionsversuche mit dem proliferativ wirkenden Liganden HA in der Endkonzentration 2 nM für 0, 2, 10 und 30 min an Art-27myc und SorLA/LR11 co-transfizierten CHO-K1 Zellen weder eine Änderung im

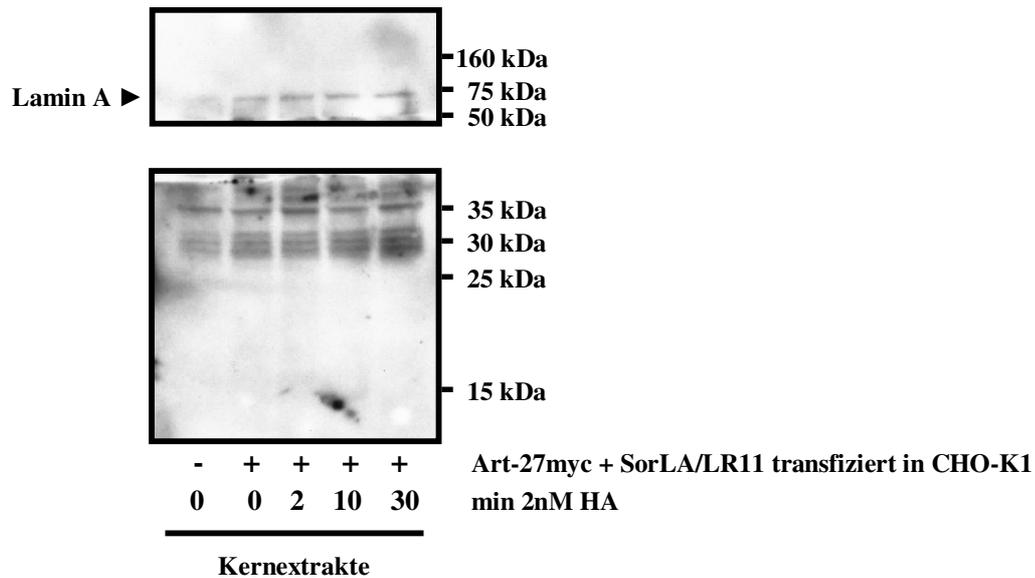
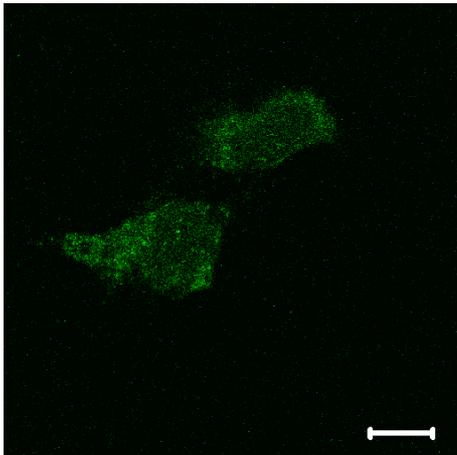


Abb. 4.11.: Kernextraktion nach HA-Stimulation von Art-27myc und SorLA/LR11 transfizierten CHO-K1 Zellen. CHO-K1 Zellen wurden mit Art-27myc und SorLA/LR11 per Elektroporation transient transfiziert bzw. untransfiziert belassen, für 10-12 h in definiertem Medium inkubiert und anschließend zu aufsteigenden Zeiten mit dem Liganden HA inkubiert. Nach Zellaufschluss wurden die Zellkerne abzentrifugiert und daraus mit hypotonem Puffer Kernextrakte gewonnen. Diese wurden auf einem 12 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Western Blot wurde horizontal durchgeschnitten und mit einem monoklonalen, primären Antikörper gegen myc (unten) bzw. gegen Lamin A (oben) und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

zellulären Verteilungsmuster eines der beiden Proteine noch eine aufkommende Kolokalisierung im Vergleich zu fehlender Induktion an.

Wegen der vermuteten Funktion von Art-27 als Transkriptionsfaktor wurde auch die Frage einer vermehrten Kernlokalisierung unter Einwirkung des Liganden HA untersucht. Abb. 4.10. zeigt die relative Häufigkeit einer Kernlokalisierung von Art-27myc unter HA-Einfluss in co-transfizierten CHO-K1-Zellen. Es ist keine signifikante Veränderung der relativen Häufigkeit zu beobachten. Weitere Induktionsversuche mit einem zweiten, vermutlich proliferativ wirkenden Liganden von SorLA/LR11, dem humanen GDNF (*glial derived neurotrophic factor*), zeigten ebenfalls keinen Effekt auf die zelluläre Lokalisation von Art-27myc oder SorLA/LR11. Induktionen mit humanem GDNF wurden in Endkonzentrationen von 20, 50 und 100 ng/mL für 0, 2, 10, 30 und 60 min durchgeführt (nicht gezeigt). Es ist zu beachten, dass alle immuncytochemischen Untersuchungen unter Verwendung des anti-SorICD-

A.



B.

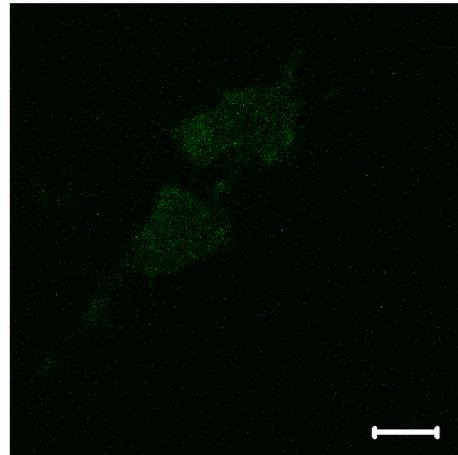


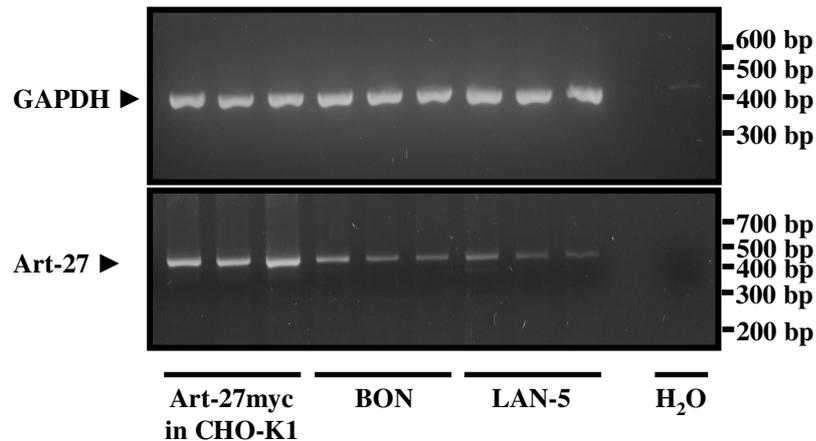
Abb. 4.12.: Endogene Expression von SorLA/LR11 in LAN-5. A. Endogenes SorLA/LR11 untransfizierter LAN-5 Zellen wurde in der Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen Primärantikörper gegen SorICD und einem AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. B. Als Kontrolle sind untransfizierte LAN-5 Zellen unspezifisch mit dem AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Die konfokalen Aufnahmen zeigen jeweils eine Schichtdicke von 1 μm ; Skalierungsbalken: 10 μm .

Antikörpers in erster Linie SorLA/LR11 mit der großen Ektodomäne darstellen und nicht bzw. kaum SorICD als Fragment. Die rasche Degradierung des 4 kDa großen SorICD in der Zelle erschwert die Darstellung dieses nativen Proteinfragments erheblich.

Zur Untersuchung eines möglichen transkriptionsaktivierenden Effektes und einer damit eventuell einhergehenden vermehrten Kernlokalisierung von Art-27myc bei Anwesenheit von SorLA/LR11 unter Einfluss von HA wurden Kernextrakte von CHO-K1 Zellen transfiziert mit Art-27myc und SorLA/LR11 gewonnen und mittels Western Blot auf Art-27myc analysiert (Abb. 4.11.). Eine Anreicherung von Art-27myc in Kernextrakten induzierter Zellen war nicht feststellbar. Als Kontrolle für eine gelungene Kernextraktion wurde Lamin A als peripheres Membranprotein der inneren Kernmembran in den gewonnenen Kernextrakten detektiert.

Für überexprimiertes Art-27myc ließ sich in allen geschilderten Experimenten kein Anhalt für eine Interaktion mit SorLA/LR11 aufzeigen. Alle in dieser Arbeit bisher angeführten Ergebnisse zu Art-27 sind unter den Bedingungen der transienten Transfektion entstanden. In derartigen Zellmodellen wird das untersuchte Protein stets

A.



B.

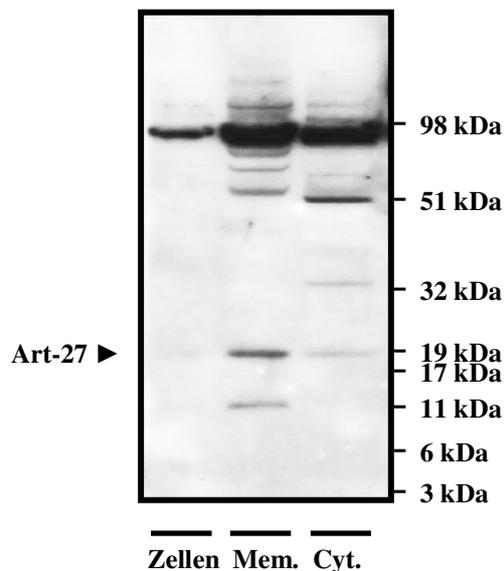


Abb. 4.13.: Endogene Expression von Art-27. A. RT-PCR aus Art-27myc transfizierten CHO-K1 und unbehandelten BON und LAN-5 Zellen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Kontrolle wurde GAPDH amplifiziert. B. In einer Membranpräparation von LAN-5 Zellen wurden lösliche (Cyt.) und Membranfraktionen (Mem.) gewonnen. Die Western Blot Analyse erfolgte mit einem primären, polyklonalen Antikörper gegen Art-27 und entsprechendem Sekundärantikörper.

überexprimiert und unterliegt daher nicht den physiologischen Regulationen durch die Zelle wie bei endogener Expression. Um diesen Mangel und den der geringen Transfektionsrate zu beheben, soll im Folgenden ein alternatives Zellmodell aufgezeigt werden.

Es ist bekannt, dass SorLA/LR11 unter anderem sowohl in neuroendokrinen BON-Zellen als auch in der humanen Neuroblastom-Zelllinie LAN-5 exprimiert wird. Abb. 4.12. A zeigt untransfizierte und unbehandelte LAN-5 Zellen, welche zur Detektion von endogen exprimiertem SorLA/LR11 immunocytochemisch mit anti-SorICD untersucht wurden. Zur Kontrolle wurden LAN-5 Zellen ohne den primären anti-SorICD-Antikörper zur Analyse der unspezifischen Reaktivität des Sekundärantikörpers in Abb. 4.12. B dargestellt. Die Kontrolle zeigt zwar Hintergrundsignale an, die für SorLA/LR11 spezifische, vesikuläre Verteilung ist jedoch nur in Abb. 4.12. A erkennbar.

Zur Testung einer vorhandenen endogenen Expression von Art-27 in verschiedenen Zelllinien wurden zunächst Untersuchungen auf RNA-Ebene durchgeführt. Es wurde RNA aus Art-27myc transfizierten CHO-K1 Zellen sowie unbehandelten BON und LAN-5 Zellen isoliert, daraus cDNA synthetisiert und zur DNA-Amplifikation in eine PCR eingesetzt (Abb. 4.13. A). Sowohl bei BON- als auch bei LAN-5 Zellen zeigt sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein etwa 480 bp großes PCR-Produkt als Hinweis für ein Transkript von Art-27. Quantitative Aussagen über den Umfang der Transkription in diesen Zelllinien können mit dieser Methode nicht getroffen werden. Als Kontrolle bei der RT-PCR wurde die Amplifikation des *house keeping genes* Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Als weiteres erfolgten Untersuchungen über eine tatsächlich erfolgende Expression des Proteins Art-27. LAN-5 Zellen wurden nach mechanischem Zellaufschluß in eine Membran- und eine lösliche Fraktion aufgearbeitet. Die Detektion des Western Blots zeigt eine stärkere Bande in der Membranfraktion und eine schwächere Bande in der löslichen Fraktion auf Höhe zwischen 17 und 19 kDa (Abb. 4.13. B). Das berechnete Molekulargewicht für Art-27 beträgt 18 kDa. Damit zeigen endogenes Art-27 wie auch überexprimiertes Art-27myc beide eine deutliche Anreicherung in der Membranfraktion der jeweils verwendeten Zellen. Immunocytochemische Untersuchungen zu endogen exprimiertem Art-27 konnten aufgrund der geringen Spezifität des vorhandenen Primärantikörpers nicht durchgeführt werden.

5. Diskussion

5.1. Hu-K4

Das humane Homologe Hu-K4 des Virusproteins K4L wird aufgrund der zwei HKD-Motive in seinem C-terminalen Bereich in die Gruppe der Phospholipase D-Familie eingeteilt. Zwei bislang näher charakterisierte Phospholipasen PID1 und PID2 sind für ihre Signal übermittelnden Eigenschaften durch hydrolytische Spaltung zum Teil selbst wieder als Signal wirksamer Substrate bekannt. PID1 und PID2 sind beide über Palmitoylierung an der cytoplasmatischen Seite von Zellmembranen verankert (Munck et al., 2005).

Bisher durchgeführte Untersuchungen zu Hu-K4 zeigen eine zelluläre Verteilung des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Durch Annahme einer durch das Programm DNASTar vorhergesagten Transmembrandomäne wird Hu-K4 in einen 38 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Bereich mit mehreren basischen Aminosäuren und einen großen C-terminalen Bereich mit den bereits erwähnten HKD-Motiven unterteilt (Abb. 5.1.). Sequenzanalysen ergeben weiterhin sieben mögliche Glykosylierungsstellen innerhalb des C-terminal liegenden Bereiches von Hu-K4. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Behandlung zellulärer Membranen mit Peptid-N-Glykosidase F eine Verminderung des Molekulargewichtes und damit eine N-Glykosylierung von Hu-K4 in COS-Zellen nachgewiesen werden. Experimente mit COS-Zellen unter Einfluss des Glykosylierungshemmstoffes Tunicamycin bestätigten diese Ergebnisse. N-Glykosylierungen sind posttranslationale Modifikationen, wie sie nur im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) stattfinden. Sie erklären die Abweichung des berechneten Molekulargewichtes von 55 kDa von dem etwa 65 kDa großen, unter *in-vivo*-Bedingungen in COS-Zellen entstandenen Hu-K4.

Bei der in Abb. 5.1. gezeigten Orientierung liegen beide HKD-Motive im Lumen des ER. Da sie für die katalytische Aktivität der Phospholipase D-Familie verantwortlich gemacht werden, wären Substrate für Hu-K4 im Gegensatz zu denen anderer Phospholipasen nicht im Cytosol, sondern auf der luminalen Seite der ER-Membran zu suchen. Ob Hu-K4 überhaupt eine katalytische Aktivität besitzt, bleibt weiterhin fraglich. Für das murine Homologe sam-9 jedenfalls wird derzeit keine Aktivität angenommen (Pedersen et al., 1998).

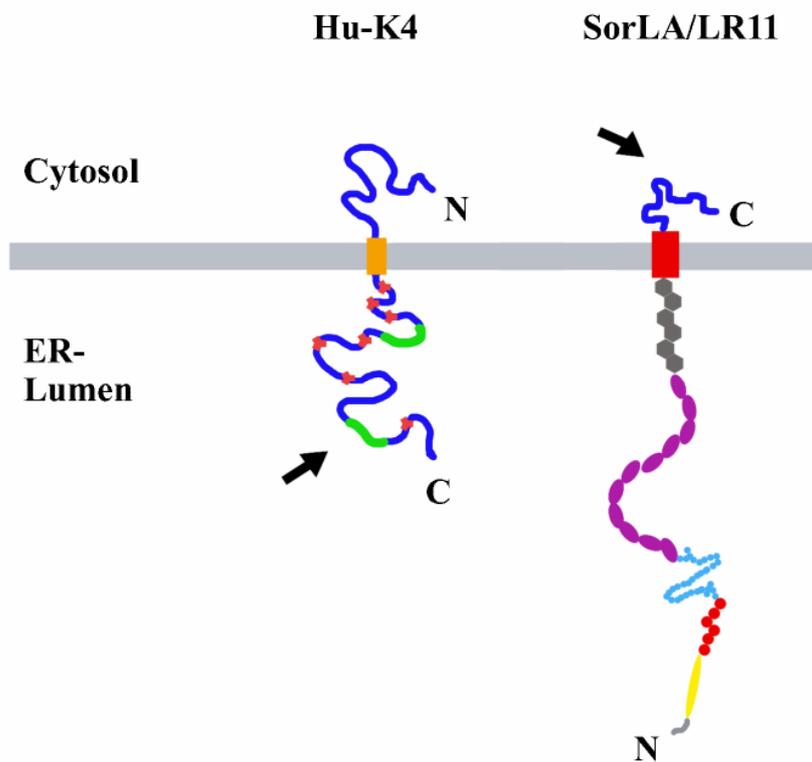


Abb. 5.1.: Orientierung von SorLA/LR11 und Hu-K4 in der Membran des ER (Schema). Darstellung von Hu-K4 mit Glykosylierungsstellen (rot) und HKD-Motiven (grün) und Darstellung von SorLA wie bereits in Abb. 1.1. erläutert. Die durch Pfeile markierten Protein-domänen sind durch die ER-Membran getrennt und können daher *in vivo* nicht interagieren. N/C – N- bzw. C-Terminus.

Mit der Aufklärung der Orientierung von Hu-K4 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums ist auch die Frage nach einer Interaktion zwischen Hu-K4 und SorICD beantwortet. Die ursprünglich durchgeführte Hefedoppelhybridanalyse wies auf eine Interaktion zwischen der C-terminalen Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 und dem C-Terminus von Hu-K4 hin (Munck, 2004). Diese beiden Proteinbereiche liegen nach topologischer Aufklärung nicht in demselben zellulären Kompartiment (Abb. 5.1.). Eine Interaktion unter *in vivo*-Bedingungen ist ausgeschlossen.

5.2. THG-1a und THG-1

Humanes THG-1 gehört zu einer Proteinfamilie, welche bislang wenig erforscht ist. Kennzeichnend für alle Mitglieder sind eine TSC-Box und eine *Leucine-zipper*-Domäne. Erste Untersuchungen über die Funktion von THG-1 zeigen transkriptionshemmende Aktivitäten eines heterodimeren Komplexes mit TSC-22 (Kester et al., 1999). Bei Untersuchungen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 wurde eine hirnspezifische Spleißvariante von THG-1 beschrieben, das THG-1a (Munck, 2004). Ob auch THG-1a mit sich selbst

```

1  I R G R V D A P A R   P C S A R G A L S P   P G I P F T A S L S   30
31  I G G V S K D P F P   L G M A Q P G V S V   K S L V S S Y E T R   60
61  V V G M A P G L P R   K R G C A S S P C S   T R R G M D K T L L   90
91  S L I L Y C H S G S   G S L V G I D N K I   E Q A M D L V K S H   120
121 L M F A V R E E V E   V (L) K E Q I R E (L) A   E R N A A (L) E Q E N   150
151 G L (L) R A L A S P E   Q L A Q L P S S G V   P R L G P P A P N G   180
181 P S V

```

Abb. 5.2.: Proteinsequenz von THG-1a. Das mögliche Kernlokalisierungssignal ist rosa, mit THG-1 identische Sequenzbereiche sind grau unterlegt. Unterstrichene Bereiche markieren die TSC-Box, an der *Leucine-Zipper*-Struktur beteiligte Aminosäuren sind eingekreist dargestellt.

oder auch zu einem Komplex mit TSC-22 dimerisieren und eventuell ebenso einen inhibierenden Einfluss auf die Transkription bisher unbekannter Zielgene ausüben kann, ist bislang nicht untersucht worden. Da eine Bindung von SorICD an TSC-22 durch *in vitro*-Experimente bereits ausgeschlossen wurde (Munck, 2004), sind in der vorliegenden Arbeit Induktionsversuche mit HA an CHO-K1 Zellen durchgeführt worden, welche lediglich mit SorLA/LR11 und THG-1a cotransfiziert wurden, nicht jedoch mit TSC-22. In diesen Experimenten wurde keinerlei Effekt durch HA auf die zelluläre Verteilung von THG-1a gesehen. Da eine Dimerisierung von THG-1 mit TSC-22 die Repressoraktivität zu verstärken scheint, ist eine ähnliche Wirkung auf THG-1a nicht auszuschließen. Eine solche Dimerisierung als Voraussetzung zur Wirkung von THG-1a in der Signalkaskade von SorLA/LR11 ist aufgrund der möglichen Bindung zwischen SorICD und THG-1a in den genannten *in vitro*-Experimenten nicht anzunehmen.

In Übereinstimmung mit der vermuteten Funktion als Transkriptionsregulator sind in bisherigen Arbeiten Anreicherungen im Zellkern von COS-Zellen sowohl für THG-1 wie auch für THG-1a beschrieben (Kester et al., 1999; Munck, 2004). THG-1a verfügt zudem noch über das mögliche Kernlokalisierungssignal PRKR (Abb. 5.2.). Die beschriebene nukleäre Lokalisation von THG-1a kann durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Zelllinien nicht bestätigt werden. Im Gegensatz sind in den untersuchten Zelllinien COS, CHO-K1 und HT-22 nach transienter Transfektion mit THG-1a*myc* stets stärkere Ansammlungen zum Zellrandbereich hin beobachtet worden. Als mögliche Ursache ist eine Störung der physiologischen intrazellulären Lokalisation durch das myc-tag denkbar.

THG-1 BC001486	MSGGKKKSSFQITSVTTDYEGPGSPGASDPPTPQPPTGPP	40
THG-1pit AF315352	MSGGKKKSSFQITSVTTDYEGPGSPGASDSEVPPALAGPP	40
THG-1 BC001486	PRLPNGEPPSPDPGGKGTPRNGSPPPGAPSSRFRVVKLPHG	80
THG-1pit AF315352	PRLPNGDPNPDPGGGRGTPRNGSPPPGAPASRFRVVKLPQG	80
THG-1 BC001486	LGEFYRRGRWTCVDVYERDLEPHSFGGLLEGIRGASGGAG	120
THG-1pit AF315352	LGEFYRRGRWTCVDVYKRDLEPPSFGRLLEGIRGASGGTG	120
THG-1 BC001486	GRSLDSRLELASLGLGAPTTPPSGLSQGPTSWLRPPPTSPG	160
THG-1pit AF315352	GRSLDSRLELASLGIPTPIQPGLSQGPTSWLRPPPTSPG	160
THG-1 BC001486	PQARSFTGGLGQLVVPKAKAEKPPLSASSPQQRPEPET	200
THG-1pit AF315352	PQARSFTGGLGQLAGPGKAKVETPPLSASPQQRPPGPGT	200
THG-1 BC001486	GESAGTSRAATPLPSLRVEAEAGGSGARTPPLSRRKAVDM	240
THG-1pit AF315352	GDSAQT-----LPSLRVEVESGGSAARNPSTVTEKRWSS	234
THG-1 BC001486	RLRMELGAPEEMGQVPPLDSRPSSPALYFTHDASLVHKSP	280
THG-1pit AF315352	SAEDGVSCSSGDRKGTSTDSRPNSPALYF--DASLVHKSP	272
THG-1 BC001486	DPFGAVAAQKFSLAHSMLAISGHLSDDDSGSGSLVGIDN	320
THG-1pit AF315352	DPFGAAAAQSLSLARSMLAISGHLSDDDSGSGSLVGIDN	312
THG-1 BC001486	KIEQAMDVLKSHLMFAVREEVEVLKEQIRELAERNAALEQ	360
THG-1pit AF315352	KIEQAMDVLKSHLMFAVREEVEVLKEQIRDLAERNAALEQ	352
THG-1 BC001486	ENGLLRALASPEQLAQLPSSGVPRLGPPAPNGPSV	395
THG-1pit AF315352	ENGLLRALASPEQLAQLPSSGLPRLGPSAPNGPSI	387

Abb. 5.3.: Homologe Sequenzbereiche von THG-1 und THG-1pit. Proteinsequenzen von humanem THG-1 und murinem THG-1pit im Vergleich. Identische Sequenzbereiche sind rosa unterlegt.

Da es sich weiterhin sowohl in der vorliegenden wie auch in den genannten Arbeiten um transient transfizierte Zellen handelt, könnten immuncytochemische Untersuchungen an stabil transfizierten oder besser noch an endogen THG-1a exprimierenden Zellen Aufschluss über die zelluläre Verteilung von THG-1a unter physiologischen Bedingungen geben. Bislang mangelt es hierfür jedoch an einem Primärantikörper gegen Mitglieder der THG-1 Gruppe.

Eine zelluläre Interaktion zwischen SorICD und THG-1a konnte durch Ligandeninduktion mittels HA in der vorliegenden Arbeit nicht aufgezeigt werden. Zwar zeigen SorLA/LR11 und THG-1*myc* in der neuronalen Hippocampus-Zelllinie HT-22 eine starke Kolokalisierung, ein Induktionseffekt durch HA lässt sich jedoch weder in transfizierten HT-22 noch CHO-K1 Zellen ausmachen. Problematisch für eine Aussage zu Änderungen der subzellulären Lokalisation von SorLA/LR11 ist die Tatsache, dass etwa 90 % der Gesamtmenge an SorLA/LR11 intrazellulär vorliegen und die restlichen 10 % auch nach Ligandeninduktion nur zu einem geringen Anteil das cytosolisch lösliche SorICD freisetzen. Es liegt also eine hohe Konzentration an nicht

prozessiertem SorLA/LR11 vor, welches eine möglicherweise variable Lokalisation von SorICD und damit auch seinem putativen Interaktionspartner THG-1a maskieren kann. Wie bereits erwähnt wird aber für THG-1a eine gliale Expression angenommen, so dass eine intrazelluläre Interaktion mit dem überwiegend neuronal exprimierten SorLA/LR11 unwahrscheinlicher wird.

Die Bedeutung von Proteinen der THG-1 Gruppe ist weiterhin ungeklärt. *In situ* Hybridisierungen zeigen für das murine Homologe THG-1pit eine verstärkte Expression während der pränatalen Entwicklung des Hypophysenvorderlappens und des Riechhirns bis ins Erwachsenenalter der Tiere (Canterini et al., 2005). Da murines THG-1pit und humanes THG-1 weitestgehend homolog sind, sollte man annehmen, dass auch THG-1 im Gehirn exprimiert wird (Abb. 5.3.). Frühere Arbeiten schließen dies anhand von mRNA-Studien bereits aus und weisen dafür dem THG-1a eine ausschließliche Lokalisierung im zentralen Nervensystem zu (Munck, 2004). Ob THG-1 ähnlich wie THG-1pit während der embryonalen Entwicklung in einzelnen Hirnarealen exprimiert wird, können erst weiterführende Untersuchungen beantworten.

5.3. Art-27

Bisherige Daten konnten die Funktion von Art-27, früher UXT genannt, nicht aufklären. Gemeinsam beschreiben sie in erster Linie zwei funktionelle Aspekte dieses Proteins: zum einen seine mögliche Rolle in der Entwicklung von Tumoren, zum anderen als transkriptionsregulierender Bindungspartner des Androgen-Rezeptors (Schroer et al., 1999; Markus et al., 2002). Erst nach Abschluss der hier angeführten Untersuchungen ist es Zhao et al. gelungen, Art-27 als zentrosomales Protein zu identifizieren und damit seine Bezeichnung wieder auf UXT (*ubiquitously expressed transcript*) zurückzuführen (Zhao et al., 2005).

Zentrosomen werden häufig als Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC), bezeichnet. Sie bestehen in Säugetierzellen aus zwei rechtwinklig zueinander angeordneten Zentriolen und einer umgebenden amorphen Proteinmatrix, der perizentriolären Matrix (Zoglmeier, 2001). Die Zentriolen sind zylinderförmig und aus neunmal drei Mikrotubuli zusammengesetzt. Alle in der Zelle befindlichen Mikrotubuli bilden ein Netzwerk ähnlich einem Rohrsystem und werden beispielsweise für gerichtete, intrazelluläre Transportvorgänge genutzt (Junqueira et al., 1996). Das mikrotubuläre Netzwerk geht strahlenförmig aus einem Keimungsprozess in der perizentriolären Matrix hervor. Bei diesem Vorgang bewirkt γ -TuRC (*γ -Tubulin Ring*

Complex), ein Multiproteinkomplex mit γ -Tubulin als Hauptkomponente, die Ausbildung von Mikrotubuli aus α - und β -Tubulin (Zoglmeier, 2001). Eine besondere Aufgabe kommt dem Zentrosom während der Zellteilung zu. Nachdem sich in der Synthesephase das Zentrosom zweigeteilt hat, wandern beide nun zu den entgegengesetzten Zellpolen und bilden einen Spindelapparat aus Mikrotubuli aus, an welchem sich während der Mitose die Chromosomen in der Äquatorialebene orientieren und anschließend in die Chromatiden auftrennen (Junqueira et al., 1996). Damit ist die intakte Funktion des Zentrosoms Bedingung für eine erfolgreiche Zellteilung.

Eine exakte Funktion für UXT ist bisher nicht beschrieben worden, doch es scheint, dass UXT auf eine Vielzahl zentrosomaler Prozesse Einfluss nimmt. UXT kann sowohl an γ -Tubulin wie auch an die zentrosomale Proteinphosphatase Cdc14A binden, welche für die Teilung der Zentrosomen verantwortlich gemacht wird (Zhao et al., 2005; Paulsen et al., 2006). Passend dazu ist immunocytochemisch in stabil transfizierten und auch endogen exprimierenden Zellen eine Kolo-kalisation von UXT mit dem zentrosomalen Markerprotein γ -Tubulin als einzelnes, punktförmiges Signal in der Nähe des Zellkerns beschrieben worden (Zhao et al., 2005). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich UXT (bisher als Art-27 bezeichnet) in über- und endogen exprimierenden Zellen an Membranen nachweisen lässt. Die Extraktion von überexprimiertem UXT von zellulären Membranen mittels Natriumbikarbonat weist auf eine periphere Anlagerung an Membranoberflächen hin. Die verwendete Methode überführt unter anderem auch Membranen ummantelter Zellorganellen in Membranlamellen und löst anliegende Proteine ab. Integrale oder in Membranen verankerte Proteine werden dagegen nicht abgelöst (Fujiki et al., 1982). Da Zentrosomen nicht von Membranen umgeben sind (Drenckhahn und Zencker, 1994), ist zu vermuten, dass UXT zwar wegen seiner vereinzelt Lokalisation in der Zelle nur in Verbindung mit dem Zentrosom auftritt, jedoch selbst an ein membranöses Zellkompartiment assoziiert ist. Es wurden einige wenige Kompartimente auf eine mögliche Kolo-kalisation mit überexprimiertem UXT getestet, jedoch zeigten Zhao et al. für UXT überexprimierende Zellen ein deutlich abweichendes Verteilungsmuster: zu über 95 % liegt UXT hier wahrscheinlich in Form von Proteinaggregaten vor (Zhao et al., 2005). Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Untersuchungen zu Art-27, jetzt UXT bezeichnet, wurden an überexprimierenden Zellsystemen durchgeführt und ergeben das bereits ausführlich beschriebene, sehr uneinheitliche Verteilungsmuster. Zhao et al. nehmen als Erklärung eine Störung der zentrosomalen Funktion an. Eine mit

der Überexpression an UXT einhergehende Reduktion an γ -Tubulin in Zentrosomen sowie eine vermutlich daraus resultierende Verminderung der Mikrotubuli konnten gezeigt werden (Zhao et al., 2005). Die durch Überexpression hervorgerufene Verteilung ähnelt mikroskopisch in der Tat Proteinaggregaten, bevor sie sich innerhalb der Zelle in der Umgebung der perizentriolären Matrix zu membranfreien Aggregaten organisieren und zu einer Verzerrung der Kernmembran führen (Johnston et al., 1998). Veränderungen der zellulären Lokalisation von UXT in überexprimierenden Zellen erklären jedoch nicht seine Anreicherung an Membranen innerhalb der Zelle, da diese auch für endogene Expression gezeigt werden konnte. Zukünftige Untersuchungen zur Lokalisation von endogenem UXT werden seine Membranassoziation näher charakterisieren und zur Identifizierung des beteiligten Zellkompartimentes beitragen können.

Eine Analyse der Proteinstruktur in funktioneller Hinsicht zeigt, dass UXT eine coiled-coil-Domäne und fünf α -Helices beherbergt, beides Merkmale der Prefoldin-Familie (Zhao et al., 2005). Prefoldine sind Kofaktoren der so genannten Chaperone. Diese dienen als Hilfsproteine der korrekten Faltung neu synthetisierter Proteine. Dazu bilden die Prefoldine hexamere Proteinkomplexe aus, welche beispielsweise Filamente des Zytoskeletts, darunter Tubulin und Aktin, in ihrer Faltung zum nativen Protein unterstützen und so eine Aggregation verhindern (Buchner, 2002; Hansen et al., 1999). So wird die Auslieferung von γ -Tubulin während seiner Reifung an sein Chaperon TCP-1 (*tailless complex polypeptide-1*) durch Prefoldin vermittelt. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Prefoldin und seiner Fähigkeit, sowohl selbst Hexamere zu bilden als auch die Prefoldin Untereinheit 2 zu binden, ist für UXT eine Funktion als Chaperon denkbar (Zhao et al., 2005). Damit würde UXT indirekt über seine Wirkung auf γ -Tubulin und andere zentrosomale Proteine die Funktion der Zentrosomen und damit möglicherweise auch die Zellteilung beeinflussen. Die Rolle von UXT bei der Entstehung von Tumoren ist in der bisherigen Literatur mehrfach, aber bislang eher widersprüchlich beschrieben worden. Übereinstimmend ist bisher, dass eine Veränderung der UXT-mRNA- und Proteinkonzentrationen den Zellzyklus stören, möglicherweise ein Ausfall von UXT sogar zum Zelltod führen kann (Schroer et al., 1999; Taneja et al., 2004; Zhao et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit untersucht eine mögliche Interaktion zwischen der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 und UXT. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Eine Induktion von Zellen durch Liganden wie

HA und GDNF zeigte keinerlei Effekt auf die zelluläre Verteilung von überexprimiertem UXT oder auch SorLA/LR11. Aus den bereits erläuterten Gründen ist die Aussagefähigkeit des verwendeten überexprimierenden Zellsystems gering. Voraussetzung für weitergehende Untersuchungen zu UXT ist die Generierung eines primären Antikörpers gegen endogenes UXT, so dass es nicht zu einer Beeinträchtigung der subzellulären Lokalisation durch Überexpression kommt. Aufgrund der Lokalisation von UXT in Zentrosomen und seiner vermeintlichen Funktion als Chaperon für Proteine des Zytoskeletts ist eine Beteiligung von UXT in der Signalkaskade von SorLA/LR11 eher auszuschließen. Ob überhaupt eine Beteiligung von UXT an intrazellulären Signalkaskaden besteht, sei Gegenstand zukünftiger Fragestellungen.

5.4. Proteine der Signalkaskade von SorLA/LR11

Die Prozessierung der Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11 mit der daran anschließenden Anreicherung von SorICD im Zellkern lässt im Hinblick auf die vielfältigen Funktionen von SorLA/LR11 die Beteiligung an einer Signalkaskade annehmen. Die vorliegende Arbeit charakterisiert die intrazellulären Proteine Hu-K4, THG-1a und UXT. Eine Beteiligung an dieser Signalkaskade konnte für keines der genannten Proteine bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

Der Membranrezeptor SorLA/LR11 zeigt Merkmale sowohl der LDL-Rezeptor-Familie wie auch der Vps10p-Familie von Neurorezeptoren. Die Vielzahl der verschiedenen Liganden deutet bereits auf eine Multifunktionalität, wie sie mit der Beteiligung an physiologischen und pathologischen Prozessen wie Proliferation, Atherosklerose und Alzheimer Demenz beschrieben worden ist. Am besten charakterisiert ist die Bindung des Neuropeptids *head activator* (HA), die zur Abspaltung der Ektodomäne durch die Metalloprotease TACE und in einem zweiten Schritt zur Freisetzung einer intrazellulären Domäne (SorICD) durch den γ -Sekretase-Komplex führt. Vermutlich unter Beteiligung weiterer Bindungspartner bzw. Koaktivatoren wandert SorICD in den Zellkern und kann dort die Transkription bislang unbekannter Zielgene einleiten. Vorherige Arbeiten haben für eine Interaktion mit SorICD die drei Kandidaten Hu-K4, THG-1a und Art-27 in einer Hefedoppelhybridanalyse identifiziert. Das funktionell bislang nicht näher charakterisierte Hu-K4 kolokalisiert immunocytochemisch in transfizierten Zellen mit SorLA/LR11 im Endoplasmatischen Retikulum. Aufgrund der durch eine Analyse der N-Glykosylierung gezeigten gegensätzlichen Orientierung der vermeintlichen Bindungsdomänen kann eine physiologische Interaktion mit SorLA/LR11 jedoch ausgeschlossen werden. THG-1a ist eine hirnspezifische Spleißvariante des inhibitorischen Transkriptionsregulators THG-1. Mit SorLA/LR11 und THG-1a kotransfizierte CHO-K1 Zellen zeigen immunocytochemisch unter Induktion mit HA keine Kolokalisierung. Somit ergibt sich kein Hinweis auf eine Beteiligung von THG-1a an der Signalkaskade von SorLA/LR11. Art-27, auch UXT genannt, wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit als Transkriptionsfaktor mit proliferationsinduzierenden Eigenschaften in der Signaltransduktion des Androgen-Rezeptors diskutiert. Zhao et al. zeigten kürzlich seine Bedeutung für eine intakte Struktur des Zentrosoms. Passend zu dieser nachträglich beschriebenen Funktion konnten immunocytochemisch in kotransfizierten CHO-K1 Zellen unter Induktion mit den SorLA/LR11-Liganden HA und GDNF keine zellulären Effekte beobachtet werden. Es gelang jedoch, überexprimiertes Art-27 als ein peripher an Membranoberflächen anliegendes Protein zu charakterisieren. Somit gelang es für keines der drei Kandidatenproteine eine Beteiligung an der Signalkaskade von SorLA/LR11 nachzuweisen, für Hu-K4 konnte eine solche ausgeschlossen werden.

7. Literaturverzeichnis

Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE. (2005) Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(38):13461-6.

Andersen OM, Schmidt V, Spoelgen R, Gliemann J, Behlke J, Galatis D, McKinstry WJ, Parker MW, Masters CL, Hyman BT, Cappai R, Willnow TE. (2006) Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry*. 45(8):2618-28.

Blasco R, Moss B. (1991) Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J Virol*. 65(11):5910-20.

Boels K, Glassmeier G, Herrmann D, Riedel IB, Hampe W, Kojima I, Schwarz JR, Schaller HC. (2001) The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca(2+)-permeable channel GRC. *J Cell Sci*. 114(Pt 20):3599-606.

Böhm C, Seibel NM, Henkel B, Steiner H, Haass C, Hampe W. (2006) SorLA Signaling by Regulated Intramembrane Proteolysis. *J Biol Chem*. 281(21):14547-53.

Boman AL. (2001) GGA proteins: new players in the sorting game. *J Cell Sci*. 114(Pt 19):3413-8. Review.

Buchner J. (2002) Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell Mol Life Sci*. 59(10):1587-8.

Cam JA, Bu G (2006) Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. *Mol Neurodegener*. 1(1):8.

Canterini S, Mangia F, Fiorenza MT. (2005) Thg-1 pit gene expression in granule cells of the developing mouse brain and in their synaptic targets, mature Purkinje, and mitral cells. *Dev Dyn.* 234(3):689-97.

Cao JX, Koop BF, Upton C. (1997) A human homolog of the vaccinia virus HindIII K4L gene is a member of the phospholipase D superfamily. *Virus Res.* 48(1):11-8.

Chazaud B, Bonavaud S, Plonquet A, Pouchelet M, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G. (2000) Involvement of the [uPAR:uPA:PAI-1:LRP] complex in human myogenic cell motility. *Exp Cell Res.* 258(2):237-44.

Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, Nykjaer A, Hempstead BL, Lee FS. (2005) Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci.* 25(26):6156-66.

Choi SJ, Moon JH, Ahn YW, Ahn JH, Kim DU, Han TH. (2005) Tsc-22 enhances TGF-beta signaling by associating with Smad4 and induces erythroid cell differentiation. *Mol Cell Biochem.* 271(1-2):23-8.

Dicou E, Vincent JP, Mazella J. (2004) Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J Neurosci Res.* 78(1):92-9.

Drenckhahn D, Zenker W (1994) Beninghoff: Anatomie, 15. Aufl., Bd 1: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban & Schwarzenberg München - Wien – Baltimore.

Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C. (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem.* 277(16):13389-93.

Fiorenza MT, Mukhopadhyay M, Westphal H (2001) Expression screening for Lhx3 downstream genes identifies Thg-1pit as a novel mouse gene involved in pituitary development. *Gene* 278(1-2):125-30.

Foster DA, Xu L (2003) Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res.* 1(11):789-800. Review.

Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 93(1):97-102.

Gliemann J, Hermey G, Nykjaer A, Petersen CM, Jacobsen C, Andreasen PA. (2004) The mosaic receptor sorLA/LR11 binds components of the plasminogen-activating system and platelet-derived growth factor-BB similarly to LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), but mediates slow internalization of bound ligand. *Biochem J.* 381(Pt 1):203-12.

Gupta RA, Sarraf P, Brockman JA, Shappell SB, Raftery LA, Willson TM, DuBois RN. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and transforming growth factor-beta pathways inhibit intestinal epithelial cell growth by regulating levels of TSC-22. *J Biol Chem.* 278(9):7431-8.

Gutekunst CA, Torre ER, Sheng Z, Yi H, Coleman SH, Riedel IB, Bujo H. (2003) Stigmoid bodies contain type I receptor proteins SorLA/LR11 and sortilin: new perspectives on their function. *J Histochem Cytochem.* 51(6):841-52.

Hampe W, Hermans-Borgmeyer I, Schaller HC. (1999a) Function of the neuropeptide head activator for early neural and neuroendocrine development. *Results Probl Cell Differ.* 26:323-37. Review.

Hampe W, Urny J, Franke I, Hoffmeister-Ullerich SA, Herrmann D, Petersen CM, Lohmann J, Schaller HC. (1999b) A head-activator binding protein is present in hydra in a soluble and a membrane-anchored form. *Development* 126(18):4077-86.

Hampe W, Riedel IB, Lintzel J, Bader CO, Franke I, Schaller HC. (2000) Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4475-85.

Hansen WJ, Cowan NJ, Welch WJ. (1999) Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J Cell Biol.* 145(2):265-77.

He X, Li F, Chang WP, Tang J (2005) GGA protein mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem.* 280(12):11696-703.

Hermans-Borgmeyer I, Hampe W, Schinke B, Methner A, Nykjaer A, Susens U, Fenger U, Herbarth B, Schaller HC. (1998) Unique expression pattern of a novel mosaic receptor in the developing cerebral cortex. *Mech Dev.* 70(1-2):65-76.

Hermey G, Sjogaard SS, Petersen CM, Nykjaer A, Gliemann J. (2006) Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J.* 395(2):285-93.

Herz J, Beffert U (2000) Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 1(1):51-8.

Hirayama S, Bujo H, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Kobayashi J, Schneider WJ, Saito Y. (2000) Differential expression of LR11 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 275(2):365-73.

Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, Petersen CM. (2001) Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem.* 276(25):22788-96.

Jacobsen L, Madsen P, Moestrup SK, Lund AH, Tommerup N, Nykjaer A, Sottrup-Jensen L, Gliemann J, Petersen CM. (1996) Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *J Biol Chem.* 271(49):31379-83.

Jacobsen L, Madsen P, Nielsen MS, Geraerts WP, Gliemann J, Smit AB, Petersen CM. (2002) The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding. *FEBS Lett.* 511(1-3):155-8.

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 143(7):1883-98.

Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH (1996) Histologie, 4. Aufl., Springer, Berlin Heidelberg New York.

Kanaki T, Bujo H, Hirayama S, Ishii I, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y. (1999) Expression of LR11, a mosaic LDL receptor family member, is markedly increased in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(11):2687-95.

Kaplan DR, Miller FD. (2004) Neurobiology: a move to sort life from death. *Nature.* 427(6977):798-9.

Kester HA, Blanchetot C, den Hertog J, van der Saag PT, van der Burg B. (1999) Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J Biol Chem.* 274(39):27439-47.

Kopan R, Ilagan MX. (2004) Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(6):499-504.

Li W, Cavasotto CN, Cardozo T, Ha S, Dang T, Taneja SS, Logan SK, Garabedian MJ. (2005) Androgen receptor mutations identified in prostate cancer and androgen insensitivity syndrome display aberrant ART-27 coactivator function. *Mol Endocrinol.* 19(9):2273-82.

Lintzel J, Franke I, Riedel IB, Schaller HC, Hampe W. (2002) Characterization of the VPS10 domain of SorLA/LR11 as binding site for the neuropeptide HA. *Biol Chem.* 383(11):1727-33.

Liu L, McKeehan WL. (2002a) Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytoplasmic shuttling, and chromosome activity. *Genomics.* 79(1):124-36.

Liu L, Amy V, Liu G, McKeehan WL. (2002b) Novel complex integrating mitochondria and the microtubular cytoskeleton with chromosome remodeling and tumor suppressor RASSF1 deduced by in silico homology analysis, interaction cloning

in yeast, and colocalization in cultured cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 38(10):582-94.

Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, Ulery PG, Mikhailenko I, Lawrence DA, Strickland DK. (2002) Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem.* 277(18):15499-506.

Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E, Emr SD. (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell.* 77(4):579-86.

Markus SM, Taneja SS, Logan SK, Li W, Ha S, Hittelman AB, Rogatsky I, Garabedian MJ. (2002) Identification and characterization of ART-27, a novel coactivator for the androgen receptor N terminus. *Mol Biol Cell.* 13(2):670-82.

Mazella J, Zsurger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D, Ferrara P, Vita N, Gully D, Maffrand JP, Vincent JP. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* 273(41):26273-6.

Morwald S, Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Kanaki T, Seimiya K, Morisaki N, Nimpf J, Schneider WJ, Saito Y. (1997) A novel mosaic protein containing LDL receptor elements is highly conserved in humans and chickens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(5):996-1002.

Motoi Y, Aizawa T, Haga S, Nakamura S, Namba Y, Ikeda K. (1999) Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res.* 833(2):209-15.

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

Munck A (2004) Identifizierung und Charakterisierung intrazellulärer Bindungspartner des Transmembranrezeptors SorLA. Dissertation. Universität Hamburg.

Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM. (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20(9):2180-90.

Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427(6977):843-8.

Offe K, Dodson SE, Shoemaker JT, Fritz JJ, Gearing M, Levey AI, Lah JJ. (2006) The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci.* 26(5):1596-603.

Ohta S, Shimekake Y, Nagata K. (1996) Molecular cloning and characterization of a transcription factor for the C-type natriuretic peptide gene promoter. *Eur J Biochem.* 242(3):460-6.

Okano K, Schnaper HW, Bomsztyk K, Hayashida T. (2006) RACK1 Binds to Smad3 to Modulate Transforming Growth Factor-beta1-stimulated α 2(I) Collagen Transcription in Renal Tubular Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 281(36):26196-204.

Paulsen MT, Starks AM, Derheimer FA, Hanasoge S, Li L, Dixon JE, Ljungman M. (2006) The p53-targeting human phosphatase hCdc14A interacts with the Cdk1/cyclin B complex and is differentially expressed in human cancers. *Mol Cancer.* 5:25.

Pedersen KM, Finsen B, Celis JE, Jensen NA. (1998) Expression of a novel murine phospholipase D homolog coincides with late neuronal development in the forebrain. *J Biol Chem.* 273(47):31494-504.

Posse De Chaves EI, Vance DE, Campenot RB, Kiss RS, Vance JE. (2000) Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *J Biol Chem.* 275(26):19883-90.

Riedel IB, Hermans-Borgmeyer I, Hubner CA. (2002) SorLA, a member of the LDL receptor family, is expressed in the collecting duct of the murine kidney. *Histochem Cell Biol.* 118(3):183-91.

Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI, Lah JJ. (2004) Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 61(8):1200-5.

Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17(15):6419.

Schroer A, Schneider S, Ropers H, Nothwang H. (1999) Cloning and characterization of UXT, a novel gene in human Xp11, which is widely and abundantly expressed in tumor tissue. *Genomics.* 56(3):340-3.

Seidel G, Adermann K, Schindler T, Ejchart A, Jaenicke R, Forssmann WG, Rosch P (1997) Solution structure of porcine delta sleep-inducing peptide immunoreactive peptide A homolog of the shortsighted gene product. *J Biol Chem.* 272(49):30918-27.

Shibanuma M, Kuroki T, Nose K. (1992) Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors. *J Biol Chem.* 267(15):10219-24.

Spoelgen R, von Arnim CA, Thomas AV, Peltan ID, Koker M, Deng A, Irizarry MC, Andersen OM, Willnow TE, Hyman BT. (2006) Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J Neurosci.* 26(2):418-28.

Taira K, Bujo H, Hirayama S, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Ishii I, Miida T, Schneider WJ, Saito Y. (2001) LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(9):1501-6.

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.* 276(30):28541-5.

Tandon A, Fraser P. (2002) The presenilins. *Genome Biol.* 3(11):reviews3014. Review.

Taneja SS, Ha S, Swenson NK, Torra IP, Rome S, Walden PD, Huang HY, Shapiro E, Garabedian MJ, Logan SK. (2004) ART-27, an androgen receptor coactivator regulated in prostate development and cancer. *J Biol Chem.* 279(14):13944-52.

Tang J, He X, Huang X, Hong L. (2005) Recent developments on the studies of human memapsin 2 (beta-secretase). *Curr Alzheimer Res.* 2(2):261-4.

Treisman JE, Lai ZC, Rubin GM. (1995) Short sighted acts in the decapentaplegic pathway in *Drosophila* eye development and has homology to a mouse TGF-beta-responsive gene. *Development.* 121(9):2835-45.

Westergaard UB, Kirkegaard K, Sorensen ES, Jacobsen C, Nielsen MS, Petersen CM, Madsen P. (2005) SorCS3 does not require propeptide cleavage to bind nerve growth factor. *FEBS Lett.* 579(5):1172-6.

Westergaard UB, Sorensen ES, Hermey G, Nielsen MS, Nykjaer A, Kirkegaard K, Jacobsen C, Gliemann J, Madsen P, Petersen CM. (2004) Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J Biol Chem.* 279(48):50221-9.

Wolfe MS, Kopan R. (2004) Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science.* 305(5687):1119-23. Review.

Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y. (1996) Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem.* 271(40):24761-8.

Zhao H, Wang Q, Zhang H, Liu Q, Du X, Richter M, Greene MI. (2005) UXT is a novel centrosomal protein essential for cell viability. *Mol Biol Cell.* 16(12):5857-65.

Zhu Y, Bujo H, Yamazaki H, Hirayama S, Kanaki T, Takahashi K, Shibasaki M, Schneider WJ, Saito Y. (2002) Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells in vitro. *Circulation* 105(15):1830-6.

Zhu Y, Bujo H, Yamazaki H, Ohwaki K, Jiang M, Hirayama S, Kanaki T, Shibasaki M, Takahashi K, Schneider WJ, Saito Y. (2004) LR11, an LDL receptor gene family member, is a novel regulator of smooth muscle cell migration. *Circ Res.* 94(6):752-8.

Zoglmeier, C (2001) Characterizing Components of the Dictyostelium Centrosome. Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität München.

8. Abkürzungsverzeichnis

58k	58 kDa Golgi Protein
AACL	Acidic-cluster dileucine
AICD	Intrazellulärdomäne von APP
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
Art-27	Androgen receptor trapped clone-27
A β	β -Peptid von APP
BACE	β -site APP cleaving enzyme
CTF	C-terminales Fragment
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EEA1	Early endosome antigen 1
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GGA-1, GGA-2	Golgi-localizing γ -adaptin ear homologous ADP-ribosylation factor binding protein-1, -2
HA	Head activator
HDL	High-density lipoprotein
Hu-K4	Human K4 homologue
ICD	Intracellular domain
LDL	Low-density lipoprotein
LDLR-A/B	LDL-receptor class A/B repeats
LRP-1	Low-density lipoprotein receptor related protein-1
NLS	Nuclear localization signal
PDGF	Platelet derived growth factor
PDI	Protein disulfide isomerase
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
SorICD	Intrazellulärdomäne von SorLA/LR11
SorLA/LR11	Sorting-receptor related protein containing low-density lipoprotein receptor class A repeats / low-density lipoprotein-receptor relative with 11 binding repeats
Sor β	β -Peptid von SorLA/LR11
TACE	Tumor-necrosis factor α -converting enzyme
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
THG-1	TGF β stimulated clone 22 homologous gene-1
TSC-22	Transforming Growth Factor β stimulated clone 22
UXT	Ubiquitously expressed transcript
VLDL	Very low-density lipoprotein
Vps10p	Vacuolar protein sorting 10 protein

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel und Herrn PD Dr. Wolfgang Hampe für die Bereitstellung des Themas und der zur Verfügung gestellten Sachmittel.

Ganz besonders herzlich danke ich Herrn PD Dr. Wolfgang Hampe für seinen Einsatz beim Zustandekommen und Gelingen dieser Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft und sein wissenschaftlicher wie auch persönlicher Rat bei verschiedenen Problemen werden mir in sehr guter Erinnerung bleiben.

Allen Angehörigen des Instituts für Molekulare Zellbiologie danke ich für die herzliche Aufnahme und für zahlreiche fachliche Diskussionen und Anregungen.

Ich danke meinen Eltern, Lars d'Hedouville, Constanze Oberlercher und Rabia Tayyeb für ihre zu keiner Zeit endende, persönliche Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: