

**Analyse eines neuen
Sorting Nexins und seiner Funktion
in der β APP-Prozessierung**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften



vorgelegt von
Susanne Schöbel aus Nürnberg
März 2007

Erklärung und ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 16.03.2007

Diese Arbeit wurde im Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität unter Anleitung von Dr. Stefan Lichtenthaler und Prof. Dr. Christian Haass durchgeführt, eine Vertretung der Arbeit vor der Fakultät für Biologie erfolgte durch Prof. Dr. Thomas Cremer.

Promotionsgesuch eingereicht: 16.03.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2007

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Sondergutachter: Prof. Dr. Christian Haass

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein

Neumann S, **Schobel S**, Jager S, Trautwein A, Haass C, Pietrzik CU, Lichtenthaler SF.
J Biol. Chemistry, 2006 Mar 17;281(11):7583-94

Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding

Schobel S, Neumann S, Seed B, Lichtenthaler SF.
Int J Dev Neurosci. 2006 Apr-May;24(2-3):141-8

Die Publikationen befinden sich im Anhang.

Abkürzungsverzeichnis

AAP-1	ABL-associated Protein
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer's Disease <i>Alzheimer Krankheit</i>
β APP _x	β- Amyloid Precursor Protein β -Amyloid Vorläufer Protein; <i>x</i> bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Isoform
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease <i>Disintegrinmetalloprotease</i>
AICD	βAPP Intracellular Domain <i>Intrazelluläre Domäne des βAPP</i>
AK	Antikörper
Akt	Akt-Kinase (Proteinkinase B)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Amp	Ampizillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-APP	β APP, das N-terminal an alkalische Phosphatase gekoppelt ist
APH1	Anterior pharynx-defective phenotype 1 Protein
APLP	Amyloid Precursor Like Protein <i>Amyloid ähnliches Protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ApoE4	Apolipoprotein E4
Arp2/3	Actin-related Protein complex 2/3
AS	Aminosäure
A β _x	Amyloid β-Peptid <i>x</i> bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren. Die Nummerierung der Aminosäuren ist bezogen auf die allgemein gebräuchliche Nummerierung der A β -Domäne, wobei D597, bezogen auf β APP695, Aminosäure 1 entspricht.
ATP	Adenosyltriphosphat
ATTC	American Tissue Culture Collection <i>Amerikanische Zellkulturkollektion</i>
BACE	Beta-site APP Cleaving Enzyme
BAR	Bin/Amphiphysin/RVS-Domäne
Bp	Basenpaare
BCA	Bicinchonic Acid Assay Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin <i>Rinderserumalbumin</i>
C89	C-terminales βAPP-Fragment (89 Aminosäuren) entstanden durch α -Sekretase-Spaltung
C99	C-terminales βAPP-Fragment (99 Aminosäuren) entstanden durch β -Sekretase-Spaltung
cDNA	complementary DNA <i>komplementäre DNA</i>
<i>C.e.</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie

Cpm	counts per minute <i>Zerfälle pro Minute</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DAPT	<i>N</i> -[<i>N</i> -(3,5- difluorophenacetyl)- <i>L</i> - alanyl]- <i>S</i> - phenylglycine t-butyl ester
<i>D.m.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothieitol
Dyn	Dynamin 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	Early endosomal Antigen 1
ECL	Enhanced Chemoluminescence Chemolumineszenz zur Detektion HRP-konjugierter Sekundärantikörper
EGF	epidermal growth factor <i>Epidermaler Wachstumsfaktor</i>
EGFR	epidermal growth factor receptor <i>Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familial Alzheimer's Disease erbliche Form der Alzheimer Krankheit
FCS	Fetal calf serum <i>Fötale Kälberserum</i>
FKHR	Transkriptionsfaktor „ forkhead in rhabdomyosarcoma “
FLD	Frontal Lobe Dementia <i>Frontotemporale Demenz</i>
GFP	Green Fluorescent Protein <i>Grün-fluoreszierendes Protein</i>
Glut4	Glukosetransporter 4
Grb2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
GSK 3β	Glykogen Synthase Kinase 3β
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanidyltriphosphat
HEK	Human Embryonic Kidney <i>Humane embryonale Nierenzelllinie</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
HRP	horseradish peroxidase <i>Meerrettichperoxidase</i>
ICD	Intracellular Domain <i>Intrazelluläre Domäne</i>
IDE	Insulin Degrading Enzyme <i>Insulin-abbauendes Enzym</i>
IGF-1	Insulin Like Growth Factor 1 <i>Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation

IPTG	I sopropyl- β -D-Thiogalaktosid
IR	I nsulinrezeptor
IRS	I nsulinrezeptorsubstrat
kDa	Kilodalton
KLH	k eyhole limpet h emocyanin Blutfarbstoff der Meeresschnecke <i>Megathura crenulata</i>
LB	L ysogeny B roth Nährlösung zur Anzucht von Bakterien von Giuseppe Bertani (1951)
M	M embran
LRP	l ow density lipoprotein receptor-related p rotein
MF	M embranfraktion
mRNA	m essenger- R ibonucleicacid <i>Boten-Ribonukleinsäure</i>
MTN Blot	M ultiple T issue Northern Blot <i>Multipler Gewebe Northern Blot</i>
NP-40	N onidet P-40
N-Terminus	Aminotermius eines Proteins
p3	Spaltprodukt des β APP nach α - und γ -Sekretase Spaltung
PAGE	P olyacrylamidgelelektrophorese
PAS	P roteinA Sepharose
PBS	P hosphate B uffered S aline <i>Phosphat gepufferte Kochsalzlösung</i>
PBST	P hosphate B uffered S aline containing T ween 20 Phosphat gepufferte Kochsalzlösung supplementiert mit Tween 20
PCR	P olymerase C hain R eaction <i>Polymerasekettenreaktion</i>
PDK-1	P hosphoinositid D ependent K inase 1 <i>Phosphoinositid-abhängige Kinase 1</i>
Pen2	P resenilin E nhancer 2
PGS	P rotein G Sepharose
Phox	p hagocytotischer NADPH- O xidase Komplex
pI	P rotease i nhibitor
PI	P hosphatidyl- I nositol
PI3K	P hosphatidyl- I nositol 3 - K inase
PKA	P rotei k inase A
PKC	P rotei k inase C
PMA	P horbol-12- M yristat- A zetat
pNPP	p ara- N itrophenyl- P hosphat
PP	P olypropylen
PRD	P roline rich domain <i>Prolinreiche Domäne</i>
PSGL-1	P - S elektin G lykoprotein L igand-1
PS	P resenilin
PS CTF	C-terminales Fragment des Presenilins
PS NTF	N-terminales Fragment des Presenilins
PtdInsP	P hosphatidyl- I nositol p hosphat
PVDF	P olyvinylidenedifluorid
PX	P hox-Homologie-Domäne
RA	R as association domain <i>Ras-assoziierte Domäne</i>
Ras	r at sarcoma

RNA	R ibonucleicacid <i>Ribonukleinsäure</i>
RT	R aum t emperatur
SAP	s hrimp a lkaline P hosphatase <i>Alkalische Phosphatase aus Krabben</i>
sAPP α	lösliches β APP entstanden durch α -Sekretase Spaltung
sAPP β	lösliches β APP entstanden durch β -Sekretase Spaltung
sAPP β'	lösliches β APP entstanden durch β' (Glu11) Spaltung
SDS	S odium d odecylsulfate <i>Natriumdodecylsulfat</i>
SEAP	s ecretory a lkaline p hosphatase <i>Sekretorische alkalische Phosphatase</i>
SH3	S rc H omologie 3 Domäne
SMART	s imple m odular a rchitecture r esearch t ool Programm verwendet zur Identifizierung der SNX-Familienmitglieder
SNX	S orting N exin
siRNA	s mall i nterfering RNA <i>kleine inhibierende RNA</i>
SOB	S uper O ptimal B roth reichhaltiges Medium zur Vermehrung von <i>E. coli</i>
TACE	T umor N ecrosis F actor- α C onvertase
TEMED	N,N,N',N' - T etramethylethylendi a min
TfR	T ransferrin r ezeptor
TGF β	T ransforming G rowth F actor β
TGN	T rans G olgi N etzwerk
TM	T rans m embran d omäne
TNF α	t umor n ecrosis f actor α <i>Tumornekrosisfaktor α</i>
TNFR2	T umor N ecrosis f actor r eceptor 2 <i>Tumornekrosisfaktor-Rezeptor 2</i>
TTP	T hiamin t ris p hosphate
upm	U mdrehungen p ro M inute
UTR	u n t ranslated r egion <i>nicht-translatierte Region</i>
UV	U ltraviolett
UZ	U ltrazentrifuge
vps5p	v acuolar p rotein- s orting 5 p rotein
WASP	W iskott- A ldrich- S yndrom- P rotein
WB	W estern B lot
Wt	W ild t yp-Form eines Proteins
ZF	Z ytosol f raktion

Bezeichnung	Abkürzung	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	9
1. Einleitung	14
<i>1.1 Erscheinungsbild und Charakteristika der Alzheimer Krankheit</i>	14
<i>1.2 Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit</i>	17
1.2.1 Struktur und Eigenschaften des β -Amyloid-Vorläuferproteins.....	17
1.2.2 Proteolytische Prozessierung des β -Amyloid-Vorläuferproteins.....	19
1.2.3 Sekretasen.....	21
1.2.3.1 Die α -Sekretase.....	21
1.2.3.2 Die β -Sekretase.....	21
1.2.3.3 Die γ -Sekretase.....	22
<i>1.3 Risikofaktoren der Alzheimer Krankheit</i>	24
1.3.1 Familiäre Alzheimer Krankheit.....	24
1.3.2 Sporadische Alzheimer Demenz.....	26
1.3.3 Alzheimer Demenz und Insulin-Signaltransduktion.....	26
<i>1.4 Die Bedeutung der Endozytose für die Alzheimer Krankheit</i>	29
<i>1.5 Identifizierung neuer Modulatoren der βAPP-Proteolyse</i>	30
<i>1.6 Die Sorting Nexin Proteinfamilie</i>	31
1.6.1 Generelle Eigenschaften der Sorting Nexine.....	31
1.6.2 Funktion der Sorting Nexine.....	34
2. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	35

3. Material und Methoden	37
3.1 <i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	37
3.1.1 Molekularbiologie.....	37
3.1.2 Zellkultur.....	37
3.1.3 Proteinbiochemie.....	38
3.2 <i>Chemikalien und Lösungen</i>	38
3.2.1 Molekularbiologie.....	38
3.2.2 Zellkultur.....	40
3.2.3 Proteinbiochemie.....	41
3.3 <i>Antikörper</i>	45
3.3.1 Monoklonale Antikörper.....	45
3.3.2 Polyklonale Antikörper.....	46
3.3.3 Sekundärantikörper.....	47
3.4 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	47
3.4.1 Konstrukte und Klonierungen.....	47
3.4.1.1 Vektoren.....	47
3.4.1.2 DNA-Konstrukte.....	48
3.4.2 Rekombinante DNA-Techniken.....	48
3.4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
3.4.2.2 Verwendete Oligonukleotide.....	49
3.4.2.3 Reinigung und Analyse der DNA.....	50
3.4.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	50
3.4.2.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	50
3.4.2.3.3 Sequenzierung der DNA-Konstrukte.....	50
3.4.2.4 Enzymatische Modifikation der DNA.....	51
3.4.2.4.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	51
3.4.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA.....	51
3.4.2.4.3 Ligation von DNA.....	51
3.4.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> und Plasmidpräparation.....	52
3.4.2.5.1 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5 α	52
3.4.2.5.2 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms BL21.....	52

3.4.2.5.3	Transformation des Ligationsproduktes in <i>E. coli</i>	53
3.4.2.5.4	Glyzerinkulturen von Bakterienklonen.....	53
3.4.2.5.5	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab.....	53
3.4.2.5.6	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab.....	53
3.4.3	Expressionsanalyse von SNX33 und β -Aktin.....	54
3.5	<i>Zellkultur und Zelllinien</i>	56
3.5.1	Beschichtung von Kulturschalen mit Poly-L-Lysin.....	56
3.5.2	Kultivierung von Zellen.....	56
3.5.3	Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA.....	57
3.5.4	Stabile Transfektion von HEK293- und COS7-Zellen.....	57
3.5.5	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung).....	57
3.5.6	Nachweis der exogenen Proteinexpression in transfizierten Zellen.....	58
3.5.7	Übersicht über die genetisch veränderten Zelllinien.....	58
3.5.8	Transienter Knock-Down von SNX33 mittels siRNA.....	58
3.5.9	PMA-Stimulierung von Zellen.....	59
3.6	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	59
3.6.1	Gewinnung von Gesamtproteinextrakten.....	59
3.6.2	Durchführung von Membranpräparationen.....	60
3.6.3	Ermittlung der Proteinkonzentration.....	60
3.6.3.1	Proteinkonzentration nach Bradford.....	60
3.6.3.2	Proteinkonzentration nach dem Bicinchonic Acid Assay.....	60
3.6.4	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	61
3.6.5	SNX33-Antikörper-Generierung.....	62
3.6.6	Nachweis von Proteinen.....	63
3.6.6.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	63
3.6.6.2	Tris-Tricine-Gele zur Trennung von Peptiden mit geringem Molekulargewicht.....	64
3.6.6.3	Coomassie-Blue-Färbung und Entfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	65
3.6.6.4	Transfer und immunochemischer Nachweis von Proteinen.....	65
3.6.6.4.1	Standardprotokoll zur Proteinanalyse im Western Blot.....	65
3.6.6.4.2	Transfer und immunochemischer Nachweis von A β	66
3.6.6.5	Immunpräzipitation von Proteinen.....	67

3.6.6.6 Immunpräzipitation von A β	67
3.6.7 Analyse zellulärer Transportmechanismen.....	68
3.6.7.1 β APP-Antikörper-Endozytose-Experiment.....	68
3.6.7.2 Transferrin-Internalisierungs-Experiment.....	68
3.6.7.3 Biotinylierung von Oberflächenproteinen.....	69
3.6.8 Herstellung und Auswertung eines Immunfluoreszenz-Präparates.....	69
3.6.9 Funktionelle Analyse von SNX33.....	70
3.6.9.1 SEAP-Assay.....	70
3.6.9.2 Dephosphorylierung von SNX33.....	71
3.6.9.3 Insulin-Stimulierung und Akt-Phosphorylierung.....	72
3.6.9.4 Phosphatidyl-Inositol 3-(PI3)Kinase-Experiment.....	72
3.7 <i>Caenorhabditis elegans</i> -Experimente.....	73
4. Ergebnisse.....	75
4.1 <i>Untersuchung der βAPP-Sekretion mit der AP-APP-Reporterzelllinie.....</i>	<i>75</i>
4.2 <i>Identifizierung, Sequenzanalyse und Nachweis eines neuen Sorting Nexins.....</i>	<i>77</i>
4.3 <i>Analyse der Funktion von SNX33 in der βAPP-Prozessierung.....</i>	<i>87</i>
4.3.1 SNX33, SNX9 und SNX18 führen zu einer Zunahme der β APP-Spaltung.....	87
4.3.2 Western Blot Analyse des Spaltungs-induzierenden Effekts von SNX33-HA auf endogenes β APP.....	90
4.3.3 Western Blot Analyse des Spaltungs-induzierenden Effekts von SNX33-HA auf überexprimiertes β APP.....	92
4.4 <i>SNX33-Expression beeinflusst Endozytosevorgänge in der Zelle.....</i>	<i>94</i>
4.4.1 SNX33-GFP inhibiert die Endozytose von β APP695.....	94
4.4.2 SNX33-GFP inhibiert die Transferrinrezeptor-Endozytose.....	97
4.5 <i>SNX33 interagiert mit Dynamin.....</i>	<i>99</i>
4.5.1 SNX33-HA koimmunopräzipitiert mit Dynamin.....	100
4.5.2 Dynamin-Expression reduziert den von SNX33 induzierten Effekt auf die β APP-Spaltung.....	101

4.6 Analyse der endogenen SNX33-Funktion.....	105
4.6.1 SNX33-Knock-Down hat keinen Einfluss auf die β APP-Proteolyse.....	106
4.7 Funktion von SNX33.....	111
5. Diskussion.....	116
5.1 Die Rolle der Endozytose bei der β APP-Proteolyse.....	116
5.2 Funktion von SNX33 bei der Endozytose.....	123
5.3 Knock-Down von SNX33 hat keinen Einfluss auf die β APP-Proteolyse.....	127
5.4 SNX33 beeinflusst die Insulin-Signaltransduktion.....	129
5.6 Darstellung eines SNX33-Funktionsmechanismus.....	132
6. Zusammenfassung.....	138
7. Literaturverzeichnis.....	140
Danksagung.....	156
Lebenslauf	
Publikationen	

1. Einleitung

1.1 Erscheinungsbild und Charakteristika der Alzheimer Krankheit

„Eine Frau von 51 Jahren zeigte als erste auffällige Krankheitserscheinung Eifersuchtsideen gegen den Mann. Bald machte sich eine rasch zunehmende Gedächtnisschwäche bemerkbar, sie fand sich in ihrer Wohnung nicht mehr zurecht (...) und zuweilen glaubte sie, man wolle sie umbringen und begann laut zu schreien“. Mit diesen Worten beschrieb der Neurologe und Psychiater Alois Alzheimer (Abb. 1A) 1906 erstmals Symptome „über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ auf einer Ärzteversammlung in Tübingen (Alzheimer, 1907). Was damals als neuartige Krankheit beschrieben wurde, ist heute nahezu Alltag im Leben eines Neurologen. Von allen Demenzformen ist die Alzheimer Krankheit die Häufigste (Selkoe, 2001), allein in Deutschland sind etwa 1,2 Millionen Menschen betroffen (<http://www.alzheimerinfo.de/alzheimer/zahlen/>).

A)



B)

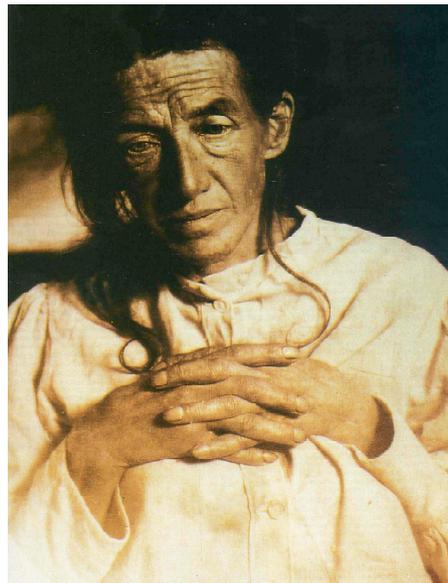


Abbildung 1: Dr. Alois Alzheimer und seine Patientin Auguste D.

A) Fotografie von Dr. Alois Alzheimer (1864 – 1915).

B) Aufnahme von Auguste D., Patientin von Alois Alzheimer und erster dokumentierter Alzheimer-Fall.

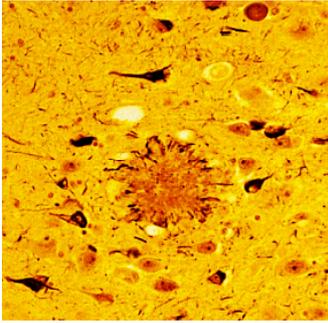
Zerstreutheit, Vergesslichkeit, Teilnahmslosigkeit sowie ein labiles Gefühlsleben sind frühe Symptome der Alzheimer Krankheit, die in ihrem Verlauf zu zunehmendem geistigen Verfall, Sprachschwierigkeiten, Aggressivität und einem eingeschränktem Urteilsvermögen führt. Im Endstadium der Krankheit besitzen Patienten oft keine Kontrolle mehr über ihren Geist und

ihren Körper und sind infolge dessen ein Pflegefall, der „rund-um-die-Uhr“-Betreuung in Anspruch nimmt.

Auf molekularbiologischer Ebene lässt sich die Alzheimer Krankheit durch zwei charakteristische Merkmale beschreiben, die bislang nur *post mortem* mit endgültiger Sicherheit nachgewiesen werden können: das Auftreten von Neurofibrillenbündel sowie die Entstehung von neuritischen Plaques (Abb. 2), die vor allem im Hippokampus sowie im Neokortex der Patienten nachzuweisen sind (Braak *et al.*, 1996).

Bei den neurofibrillären Bündeln („tangles“) handelt es sich um Aggregate gepaarter helikaler Filamente, die vor allem aus Tau-Protein bestehen (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Sie entstehen ausschließlich intrazellulär im somadentritischen Kompartiment sowie in Axonen. Im Alzheimer-Patient liegt das Tau-Protein hochgradig phosphoryliert vor. Diese Hyperphosphorylierung führt zu einer Aggregation des Tau-Proteins, so dass es seine natürliche Funktion, eine Stabilisierung des aus Mikrotubuli bestehenden Zellskeletts, nicht mehr erfüllen kann (Friedhoff *et al.*, 2000). Dies führt zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli und in Folge dessen zu einem reduzierten Stofftransport und einer gestörten Reizweiterleitung in den Nervenzellen. Die Ursache für eine nicht-physiologische Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins ist noch nicht komplett verstanden, man geht aber davon aus, dass ein Ungleichgewicht unterschiedlicher Kinasen und Phosphatasen Ursache dafür ist (Mandelkow and Mandelkow, 1998). Neurofibrilläre Bündel treten im Gegensatz zu den neuritischen β -Amyloid-Plaques auch im Rahmen weiterer Erkrankungen, wie z.B. Frontal Lobe Demenz (FLD)(Morris *et al.*, 2001), auf. Da jedoch keine Mutationen im Tau-Gen bekannt sind, die im Rahmen der familiären Alzheimer Krankheit dokumentiert sind, und auch im Verlauf der FLD keine A β -Plaques nachweisbar sind, kann man folgern, dass das Auftreten von Neurofibrillenbündeln alleine nicht Ursache für die Bildung neuritischer Plaques sein kann (Haass and Selkoe, 2007).

A)



B)

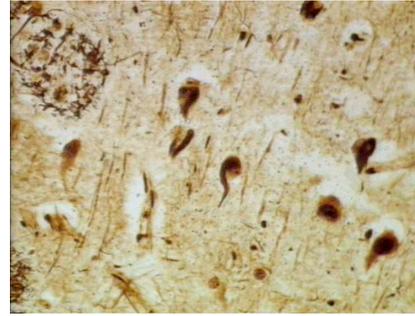


Abbildung 2: Histopathologische Charakteristika der Alzheimer Krankheit

A) Hochauflösende Aufnahme eines silbergefärbten A β -Plaques. Der kompakte, neuritische Plaque ist von dystrophen Neuriten umgeben (Selkoe, 1998).

B) Abbildung neurofibrillärer Bündel, die aus gepaarten helikalen Filamenten bestehen [Quelle: (<http://www.neuroanatomy.hpg.ig.com.br/nhp2.htm>)].

Zweites histopathologisches Charakteristikum der Alzheimer Krankheit ist das Auftreten von neuritischen Plaques („A β -Plaques“), die ausschließlich im extrazellulären Raum sowie im zerebralen Blutgefäßsystem des Gehirns nachweisbar sind (Selkoe, 1999). Sie können einen Durchmesser von bis zu 0,2 mm erreichen, besitzen einen dichten Amyloidkern - das sogenannte „amyloid-core“- und sind meist von veränderten Neuriten, degenerierten Nervenzellkörpern (Braak *et al.*, 1996) und aktivierten Mikrogliazellen umgeben (Pike C.J., 1994). Neben den neuritischen Plaques treten des Weiteren diffuse Amyloidplaques auf, die jedoch auch im Gehirn nicht erkrankter, alter Menschen nachweisbar sind (Hardy and Selkoe, 2002). Man geht davon aus, dass es sich bei den diffusen Plaques um eine Vorstufe der neuritischen Plaques handelt (Giaccone *et al.*, 1989).

Sowohl senile Plaques als auch neurofibrilläre Bündel sind charakteristische Kennzeichen der Alzheimer Krankheit, jedoch wird die Bedeutung dieser beiden Erscheinungen kontrovers diskutiert. Die Menge an senilen Plaques und auftretenden Neurofibrillenbündeln im Gehirn von Alzheimer-Patienten korreliert nicht immer mit dem Grad der Demenz (Armstrong, 2006). Ein häufig diskutierter Mechanismus der AD wird in der sogenannten „amyloiden Kaskade-Theorie“ („amyloid cascade hypothesis“; Abb. 6; Hardy and Selkoe, 2002) dargestellt. Laut dieser Hypothese ist die Akkumulation sowie die Ablagerung von A β initiales Ereignis für die in der AD auftretenden Symptome (Hardy and Higgins, 1992; Selkoe, 1991). Die Aggregation von A β ist der Auslöser für eine langsam fortschreitende, tödliche Kaskade, die zu Änderungen synaptischer Funktion, Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten sowie zu einer Modifizierung des normal löslichen Tau-Proteins in unlösliche gepaarte, helikale Filamente und letztendlich zu fortschreitendem

Verlust neuronaler Aktivität führt (Hardy and Selkoe, 2002). Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft geht man davon aus, dass nicht die unlöslichen A β -Aggregate, sondern die löslichen A β -Oligomere synaptische Fehlfunktionen und Toxizität verursachen (Haass and Selkoe, 2007).

1.2 Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit

1.2.1 Struktur und Eigenschaften des β -Amyloid-Vorläuferproteins

1984 konnte erstmals β -Amyloid (A β), ein sehr kurzes Protein mit beta-Faltblattstruktur, als Hauptbestandteil der amyloiden Plaques nachgewiesen werden (Glennner *et al.*, 1984; Masters *et al.*, 1985). Man unterscheidet dabei A β 1-40 und A β 1-42, die sich nur durch zwei Aminosäuren (AS) unterscheiden, aber dennoch unterschiedliche chemische Eigenschaften besitzen. A β 1-42 ist durch die zusätzlichen Aminosäuren Isoleucin und Alanin wesentlich hydrophober und zeigt *in vitro* eine deutlich höhere Aggregationsbereitschaft als A β 1-40 (Selkoe, 1999). Darüber hinaus erwies sich konzentriertes A β 1-42 in Experimenten als widerstandsfähiger gegen A β -abbauende Enzyme als A β 1-40 (Glabbe, 2001). Neuritische Plaques bestehen hauptsächlich aus A β 1-42, jedoch konnten neben A β 1-40 und verschiedenen N- und C-terminal verkürzten und verlängerten Formen des A β -Peptids (Wang *et al.*, 1996) auch weitere Proteine - wie zum Beispiel das Apolipoprotein E und Proteoglykane - nachgewiesen werden (Dickson, 1997).

1987 konnte das zugehörige Protein identifiziert werden, dessen Prozessierung durch Sekretasen zur Bildung von A β führt: das β -Amyloid-Vorläuferprotein (β APP) (Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987). Das zugehörige Gen ist auf Chromosom 21 codiert, weshalb Menschen, die an Trisomie 21 leiden, nahezu ausnahmslos an Alzheimer Krankheit erkranken (Gendosiseffekt). β APP ist ein TypI-Transmembranprotein mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne sowie einer großen aminoterminalen Ektodomäne mit komplexer Domänenstruktur (Abb. 3). Sie beinhaltet neben einer sauren Domäne, einer Cystein-reichen Domäne sowie einer Glykosylierungsdomäne eine 17 AS lange Signalsequenz, welche für den Einbau des Proteins in die Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) verantwortlich ist (Kang *et al.*, 1987).

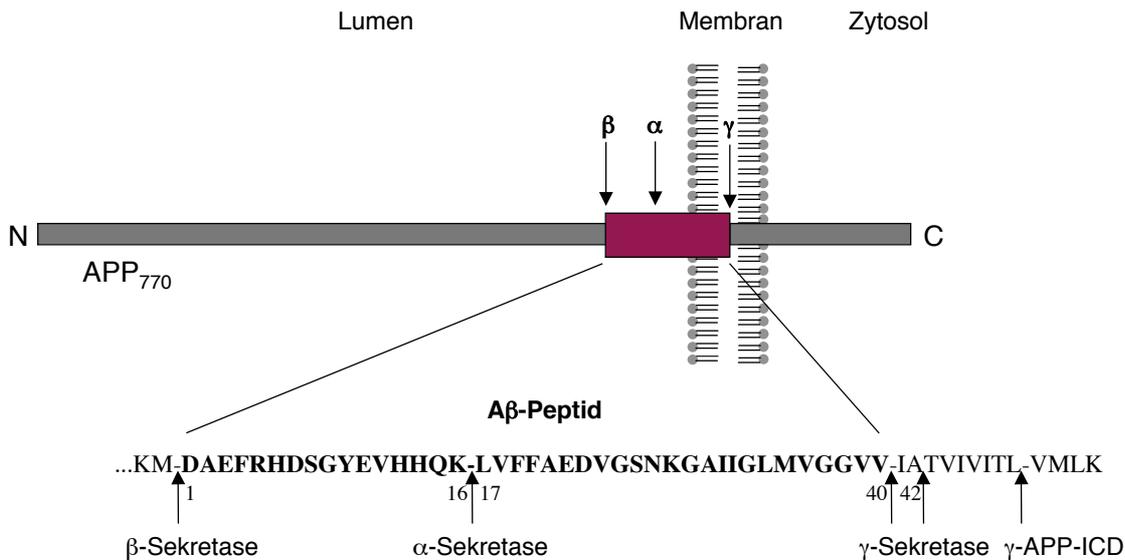


Abbildung 3: Schematische Darstellung von β APP770 und den Hauptschnittstellen der Sekretasen

Die A β -Peptidregion ist vergrößert im Einbuchstaben-Code dargestellt und zeigt die wichtigsten Schnittstellen von α -, β - und γ -Sekretase (modifiziert nach Allinson *et al.*, 2003).

β APP ist Mitglied einer Genfamilie, die zudem zwei Homologe – Amyloid-Precursor-like-Protein 1 (APLP1) und Amyloid-Precursor-like-Protein 2 (APLP2) - beinhaltet (Sprecher *et al.*, 1993; Wasco *et al.*, 1992). Das β -Amyloid-Vorläuferprotein wird nahezu ubiquitär exprimiert (Selkoe *et al.*, 1988) und tritt vor allem in drei unterschiedlichen Isoformen auf, die durch alternatives Spleißen der messenger-RNA (mRNA) entstehen (Selkoe, 1994). β APP751 ist die häufigste Isoform, die vor allem in nicht-neuronalem Gewebe vorkommt (Wertkin *et al.*, 1993). Bei β APP770 handelt es sich um eine periphere und gliale Isoform, dagegen wird β APP695 überwiegend in neuronalem Gewebe exprimiert.

Auf dem sekretorischen Transportweg vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran wird β APP zahlreichen post-translationalen Modifikationen unterzogen: N- und O-Glykosylierung, Phosphorylierung sowie Tyrosin-Sulfatierung (Selkoe, 1999; Weidemann *et al.*, 1989). Nur etwa 30% der synthetisierten β APP-Moleküle werden erfolgreich zur Plasmamembran geliefert, wo es eine kurze Halbwertszeit besitzt und sehr schnell umgesetzt wird (Herreman *et al.*, 2003; Knops *et al.*, 1992; Weidemann *et al.*, 1989). Matures β APP an der Plasmamembran kann durch Sekretasen prozessiert werden oder den Weg des endosomalen Recyclings einschlagen und nach Aufnahme in endozytotische Vesikel zurück an die Plasmamembran geliefert werden (Koo and Squazzo, 1994; Koo *et al.*, 1996).

Es gibt wenige Proteine, die so gut untersucht sind wie β APP, dennoch ist die physiologische Funktion dieses Proteins noch nicht geklärt. Zahlreiche Tiermodelle, Domänen-Strukturanalysen und detaillierte zellbiologische Untersuchungen führten zu einer Vielzahl möglicher Funktionen des β APP. So könnte das Protein für synaptische Transmission von großer Bedeutung sein (Kamenetz *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass in Nervenzellen, die β APP-defizient sind, eine höhere Anzahl an Synapsen pro Nervenzelle und somit eine gesteigerte synaptische Aktivität vorliegt (Priller *et al.*, 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei diesem Vorgang A β eine wichtige physiologische Rolle in der Modulation der synaptischen Bildung und Funktion ausübt (Priller *et al.*, 2006). β APP könnte aber auch als Zelloberflächenrezeptor Funktionen im Zusammenhang mit Zelladhäsion und Neuritenwachstum besitzen (Milward *et al.*, 1992; Saitoh *et al.*, 1989). In Analogie zum Notch-Rezeptor ist eine Funktion von β APP in der Transkriptionsregulation nicht auszuschließen (Cao and Sudhof, 2001), es konnte bislang jedoch kein eindeutiger Nachweis erbracht werden, dass β APP in diesen Prozess involviert ist. Auch eine Funktion in der Signaltransduktion wurde bereits postuliert (Nishimoto *et al.*, 1993). Interessanterweise besitzen β APP-Knockout-Mäuse keinen auffälligen Phänotyp, wohingegen APP/APLP2 bzw. APLP1/APLP2-Doppelknockout-Mäuse nicht lebensfähig sind (Müller U., 1998). APP/APLP-Tripplknockout-Mäuse sterben nach der Geburt. Jedoch zeigen Untersuchungen des Gehirns dieser Tiere auffällige Veränderungen, die unter anderem darauf hinweisen, dass die Mitglieder der APP/APLP-Familie in Zelladhäsion verwickelt sind (Herms *et al.*, 2004).

1.2.2 Proteolytische Prozessierung des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins

Im Rahmen der sekretorischen Prozessierung kann β APP auf zwei unterschiedlichen Wegen durch Proteasen gespalten werden (Haass and Steiner, 2002). Der Großteil des prozessierten β APP wird im sogenannten „nicht-amyloidogenem“ Weg gespalten. In diesem Fall erfolgt zunächst eine Prozessierung durch eine sogenannte α -Sekretase innerhalb der Ektodomäne, was zur Sezernierung eines löslichen Fragmentes führt, das sogenannte „sAPP α “. sAPP α besitzt neuroprotektive Eigenschaften (Furukawa *et al.*, 1996; Meziane *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 2004). In einer zweiten Reaktion wird der verbleibende, membranständige Rest von der γ -Sekretase geschnitten, was zur Freisetzung einer intrazellulären Domäne AICD („ β APP intracellular domain“;(Sastre *et al.*, 2001)) sowie eines löslichen Peptides p3 (Haass *et al.*, 1993) führt (Abb. 4). Da α -Sekretasen innerhalb der A β -Domäne schneiden wird durch diesen Prozess eine Bildung von A β unterbunden.

Alternativ kann β APP auch im amyloidogenem Weg prozessiert werden. In diesem Fall erfolgt zunächst eine Spaltung durch die β -Sekretase, die innerhalb der β APP-Ektodomäne am N-Terminus der $A\beta$ -Domäne schneidet und so zur Freisetzung eines löslichen Fragments, dem sogenannten "sAPP β " führt. In einem zweiten Schritt erfolgt in Analogie zur nicht-amyloidogenen Prozessierung ein Nachschneiden des C-terminalen, membranständigen Restes durch die γ -Sekretase, was zur Generierung einer löslichen intrazellulären Domäne AICD („ β APP intracellular domain“) sowie zur Freisetzung von $A\beta$ 1-40/42 in den extrazellulären Raum führt (Abb. 4; Haass and Steiner, 2002).

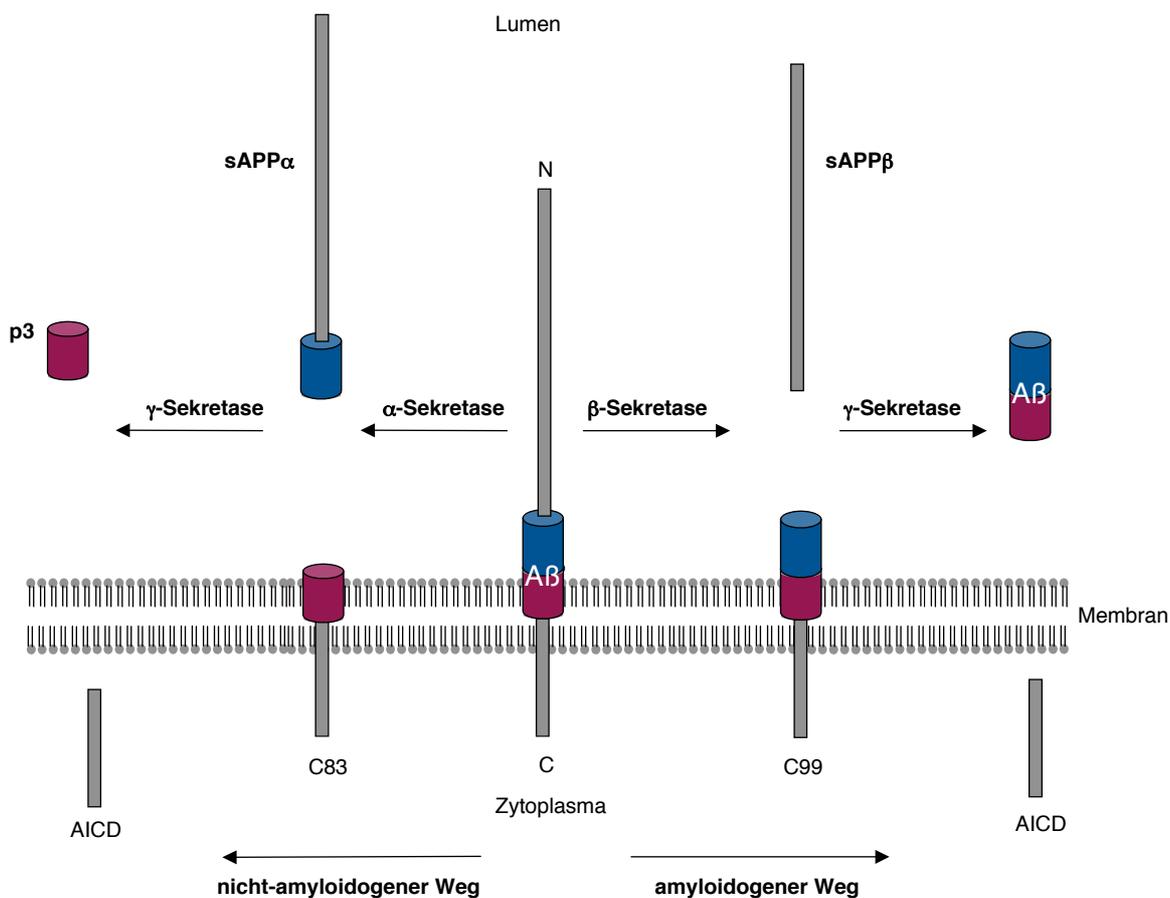


Abbildung 4: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung von β APP

(modifiziert nach Haass and Steiner, 2002). AICD: intrazelluläre Domäne von β APP („APP intracellular domain“).

Die Freisetzung von $A\beta$ 1-40/42 aus β APP ist ein physiologischer Prozess, der nicht nur in Alzheimer-Patienten stattfindet, sondern auch in jedem gesunden Menschen auftritt (Busciglio *et al.*, 1993; Golde *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992b; Seubert *et al.*, 1992). Lediglich die relative Menge an gebildetem $A\beta$ 42 im Vergleich zu $A\beta$ 40 unterscheidet zwischen „gesund“ und „krank“.

1.2.3 Sekretasen

1.2.3.1 Die α -Sekretase

α -Sekretase ist der Name für eine anfänglich unbekannte proteolytische Aktivität, die das β -Amyloid-Vorläuferprotein innerhalb der A β -Domäne zwischen den Aminosäuren Lys 16 und Leu 17 (Esch *et al.*, 1990; Sisodia *et al.*, 1990) schneidet und somit den ersten Schritt im nicht-amyloidogenen Weg durchführt, der eine Freisetzung von A β verhindert. Bekannte Proteasen mit α -Sekretase-Aktivität sind ADAM10 („a disintegrin and metalloprotease“; (Lammich *et al.*, 1999)), ADAM17 (TACE: „tumor necrosis factor- α convertase“; Buxbaum *et al.*, 1998; Hung *et al.*, 1993), ADAM9 (Allinson *et al.*, 2003) sowie BACE2, das β APP ebenfalls innerhalb der A β -Domäne schneidet (Farzan *et al.*, 2000). Es ist bislang unklar, ob alle drei identifizierten α -Sekretasen für eine physiologisch-relevante β APP-Spaltung verantwortlich sind. ADAM-Proteasen sind Metalloproteasen, die ein Zink-Ion in ihrem aktiven Zentrum besitzen. In der Regel sind ADAM-Proteasen konstitutiv aktiv, jedoch kann ihre Aktivität durch Zugabe von Phorbolestern oder über eine Aktivierung der Proteinkinase C erhöht werden (Felsenstein *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 1993; Jacobsen *et al.*, 1994). Eine Erhöhung der α -Sekretase-Aktivität führt zu einer verstärkten sAPP α -Produktion und geht in verschiedenen Fällen auf Kosten des β -Sekretase-Weges, d.h. eine Aktivierung des nicht-amyloidogenen Weges führt zu einer reduzierten A β -Bildung (Skovronsky *et al.*, 2000).

1.2.3.2 Die β -Sekretase

BACE 1 („ β -site-APP cleaving enzyme“) konnte im Jahr 1999 als zugehörige β -Sekretase identifiziert werden (Sinha *et al.*, 1999; Vassar, 2001; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Das 60 kDa große Protein ist eine Aspartylprotease der Pepsin-Familie und hat seine maximale proteolytische Aktivität bei pH 4,5 (Vassar, 2001). BACE1, ein TypI-Transmembranprotein, ist das Schlüsselenzym in der Entstehung von A β , da es den initialen Schritt der β APP-Prozessierung im amyloidogenen Weg katalysiert. Der Schnitt erfolgt zwischen den Aminosäuren Methionin und Aspartat (entsprechend der Position Asp+1 der A β -Sequenz, vgl. Abb. 3) und führt zur Bildung von sAPP β , der sekretierten Ektodomäne von β APP sowie zu einem membranständigen Fragment, dem sogenannten C99, das die 99 C-terminalen Aminosäure-Reste von β APP umfasst. C99 kann dann in einer zweiten Reaktion durch die γ -Sekretase geschnitten werden, was die Freisetzung von A β zur Folge hat. Mittels BACE1-Überexpression konnte neben dem Schnitt an Position Asp+1 eine weitere Schnittstelle an Position Glu+11 nachgewiesen werden (Gouras *et al.*, 1998).

Noch bevor BACE-1 als die eigentliche β -Sekretase identifiziert werden konnte, erfolgte eine Analyse der β APP-Proteolyseprodukte und in Folge dessen eine Beschreibung der Eigenschaften der β -Sekretase. Die β -Sekretase wird in den meisten Gewebetypen exprimiert, jedoch besitzt sie in neuronalem Gewebe besonders hohe Expression (Haass *et al.*, 1992b; Seubert *et al.*, 1993). Auch im Gehirn von Patienten mit sporadischer Alzheimer Krankheit konnte eine bis zu 2,7x erhöhte BACE1-Expression bei gleich bleibender BACE1-mRNA-Menge nachgewiesen werden (Holsinger *et al.*, 2002). Zahlreiche Studien belegen, dass die BACE1-Expression auf transkriptioneller, aber auch auf translationeller Ebene kontrolliert wird (Grilli *et al.*, 1995; Lammich *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2004; Sastre *et al.*, 2006; Toliver-Kinsky *et al.*, 2000).

Die physiologische Funktion von BACE1 ist nicht vollständig geklärt, man geht aber davon aus, dass β APP nicht das Hauptsubstrat dieses Enzyms ist. Neben β APP konnten mit P-Selektin-Glykoprotein Ligand-I (PSGL-I) und der Sialyltransferase ST6 Gall zwei weitere Substrate von BACE1 identifiziert werden (Kitazume *et al.*, 2001; Lichtenthaler *et al.*, 2003). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass BACE1 für die Prozessierung von Neuregulin und in Folge dessen für eine regulierte Myelinisierung des peripheren Nervensystems verantwortlich ist (Hu *et al.*, 2006; Willem *et al.*, 2006). BACE1 *-/-* Knock-out Mäuse sind lebensfähig (Luo *et al.*, 2001; Roberds *et al.*, 2001) und weisen eine Hypomyelinisierung des peripheren Nervensystems auf (Hu *et al.*, 2006; Willem *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass BACE1 *-/-* Knockout Mäuse keine nachweisbaren Mengen an A β und C99 produzieren, zeigt, dass BACE1 die verantwortliche β -Sekretase ist (Roberds *et al.*, 2001).

1.2.3.3 Die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist sowohl für die amyloidogene, als auch für die nicht-amyloidogene β APP-Prozessierung von Bedeutung. Es handelt sich um einen sehr außergewöhnlichen, membranständigen Proteinkomplex (Abb. 5), der in der Lage ist, Intramembranproteolyse zu katalysieren. Um volle Funktionalität zu erlangen, werden vier Proteine zur Komplexbildung benötigt: Presenilin1 (PS1) oder das homologe Protein Presenilin 2 (PS2), Aph1, Nicastrin und Pen2 (Edbauer *et al.*, 2003). Preseniline sind GXGD-Aspartylproteasen, die zwei hochkonservierte Aspartatreste in der Transmembrandomäne 6 und 7 besitzen (Steiner *et al.*, 2000; Wolfe *et al.*, 1999). Um volle Aktivität zu erlangen, muss Presenilin autoproteolytisch gespalten werden, was die Bildung eines C- und N-terminalen Fragments zur Folge hat, die jedoch miteinander in Kontakt stehen (Capell *et al.*, 1998).

Es sind heute mehr als 100 PS-Mutationen bekannt, die zu einer verstärkten A β 42-Produktion und in Folge dessen zu einer erhöhten A β 42-Oligomerisierung führen und somit eine Form der Familiären Alzheimer Krankheit (FAD) darstellen (Hardy and Selkoe, 2002). Typische γ -Sekretase-Substrate sind TypI-Transmembranproteine wie zum Beispiel der Notchrezeptor und β APP, aber auch LRP („low density lipoprotein receptor-related protein“), die Notch-Liganden Delta und Jagged, das Zelloberflächenadhäsionsmolekül CD44 und die Zelladhäsionsmoleküle N- und E-Cadherin (Strooper, 2003). Eine Proteolyse durch γ -Sekretase erfolgt nach dem Schneiden der Ektodomäne der Substrate und ist nicht sequenzspezifisch (Struhl and Adachi, 2000). Man geht davon aus, dass Nicastrin, welches eine große Ektodomäne besitzt, in der Lage ist, die Länge potentieller γ -Sekretase-Substrate zu messen. Aph1 („anterior pharynx-defective phenotype“; (Francis *et al.*, 2002; Goutte, 2002; Strooper, 2003)) wird für die Stabilität des γ -Sekretase-Komplexes benötigt, Pen2 („Presenilin Enhancer 2“) ist für eine effektive Presenilin-Endoproteolyse erforderlich, indem es die entstandenen C- und N-terminalen Fragmente nach der Presenilin-Endoproteolyse stabilisiert (Prokop *et al.*, 2005; Prokop *et al.*, 2004).

Neben der γ -Sekretase-Schnittstelle im β APP, die sich relativ mittig in der Transmembrandomäne befindet, konnte eine weitere Schnittstelle identifiziert werden, die ebenfalls durch die γ -Sekretase katalysiert wird: die sogenannte ϵ -Schnittstelle (Haass, 2004; Sastre *et al.*, 2001). Diese zusätzliche Proteolyse-Möglichkeit befindet sich nahe dem Übergang von Membran zum Zytosol und ist für die Freisetzung der intrazellulären Domäne aus der Membran von großer Wichtigkeit. Beide Schnitte - der γ - und der ϵ -Schnitt - können parallel verlaufen und werden von der γ -Sekretase katalysiert.

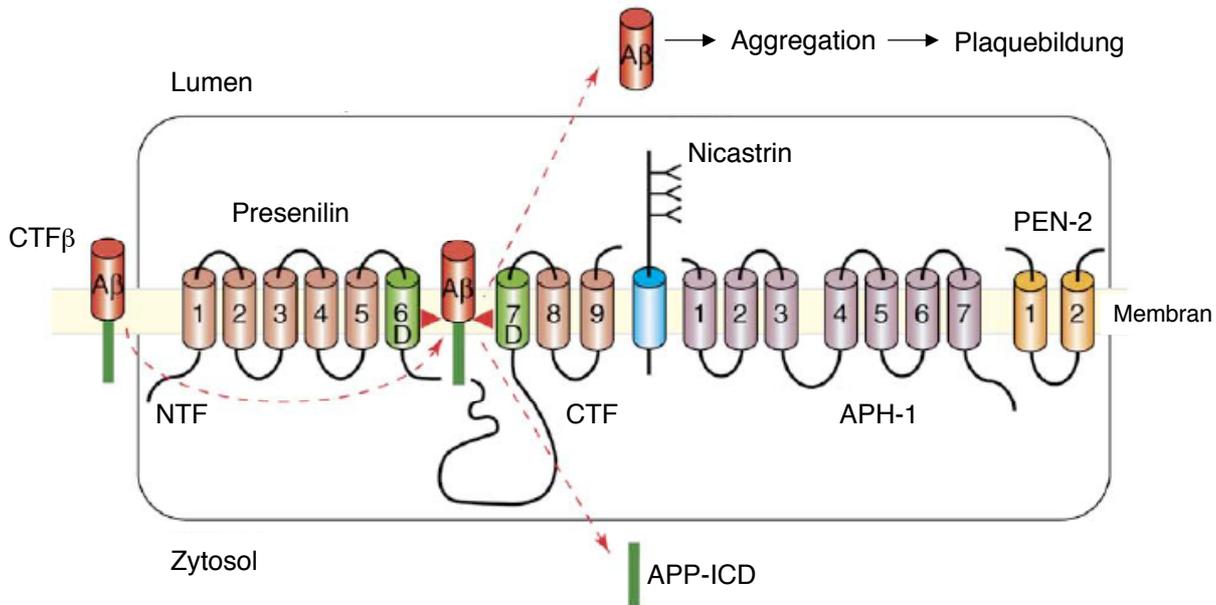


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des γ -Sekretase-Komplexes

Presenilin, Nicastrin, PEN2 und Aph1 bilden den katalytisch aktiven Komplex. Durch die Intramembranproteolyse von β APP-C99 durch die γ -Sekretase wird A β freigesetzt, das eine hohe Tendenz zur Aggregation zeigt. In Folge dessen kommt es zur Bildung amyloider Plaques (modifiziert nach Steiner *et al.*, 2006). ICD: Intrazelluläre Domäne, CTF: C-terminales Fragment, NTF: N-terminales Fragment.

1.3 Risikofaktoren der Alzheimer Krankheit

Man unterscheidet zwei unterschiedliche Formen der Alzheimer Demenz: die familiäre Form und die sporadische Form. Die familiäre, vererbare Variante der Krankheit ist auf einen genetischen Defekt zurückzuführen und tritt meist in einem Alter zwischen 25 und 65 Jahren auf, weshalb sie auch als „early onset“ bezeichnet wird. Der sporadischen Form liegen unterschiedliche Ursachen zu Grunde. Da sie meist ab einem Alter von 65 Jahren oder später eintritt, wird sie auch als „late onset“ Alzheimer Demenz bezeichnet.

1.3.1 Familiäre Alzheimer Krankheit

Nur etwa 0,1% bis 5% aller Alzheimer-Fälle sind familiärer Form, weltweit sind ca. 300 Familien bekannt, in denen eine autosomal-dominante Genmutation zu einer vererbaren Variante der Alzheimer Krankheit führt (Blennow *et al.*, 2006). Bislang konnten drei Gene identifiziert werden, deren Mutation zur familiären AD führt: β APP, Presenilin 1 und Presenilin 2.

Alle bislang bekannten Genmutationen, die zur Alzheimer Krankheit führen, fördern die Bildung von amyloiden Plaques im Gehirn der Patienten, es sind jedoch keine Gendefekte in

Alzheimer-Patienten bekannt, die zu einer verstärkten Bildung von Neurofibrillenbündeln führen. Dies lässt vermuten, dass tatsächlich ein Ungleichgewicht zwischen A β -Produktion und A β -Abbau im Gehirn das initiale Ereignis ist, dass zur neuronalen Degeneration und Demenz führt. Diese Hypothese bildet den Grundstein der sogenannten „amyloiden Kaskade-Theorie“ („amyloid cascade hypothesis“; Hardy and Selkoe, 2002), die in Abbildung 6 dargestellt ist.

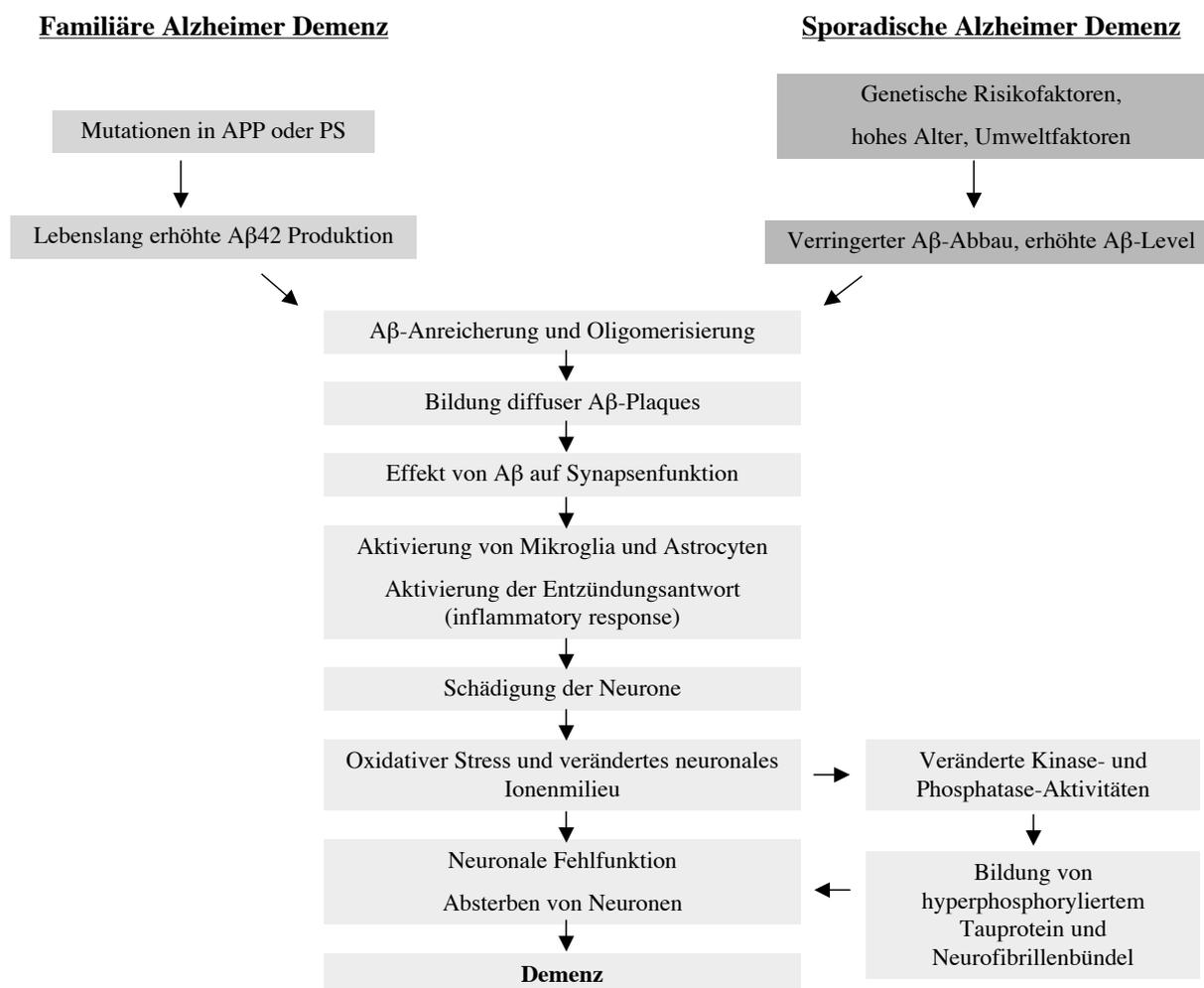


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Amyloidkaskade

Laut diesem Modell ist ein Ungleichgewicht zwischen A β -Produktion und A β -Abbau für das Eintreten der Demenz verantwortlich (modifiziert nach Hardy and Selkoe, 2002).

1.3.2 Sporadische Alzheimer Demenz

Bei der sporadischen Form der Alzheimer Krankheit führt oft ein Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren, wie zum Beispiel genetische Prädisposition und Umweltfaktoren zum Ausbruch der Krankheit. Dabei sind genetische Defekte nicht die Ursache der Krankheit, können jedoch das Risiko einer Erkrankung erhöhen oder deren Verlauf beeinflussen. Größter Risikofaktor für sporadische AD ist der natürliche Vorgang des Alterns. So erkranken weniger als 1% der Bevölkerung der westlichen Welt im Alter unter 60 Jahren an sporadischer AD, wohingegen das Risiko einer Erkrankung im Alter ab 85 Jahren auf ca. 30 -47% steigt (Ferri *et al.*, 2005).

Ebenfalls ein erhöhtes Alzheimer-Risiko haben Träger des Apolipoproteins E- ϵ 4-Allels (ApoE- ϵ 4; Corder *et al.*, 1993; Poirier *et al.*, 1993). Des Weiteren sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Fettleibigkeit, Artherosklerose, niedriger Bildungsstand sowie hoher Nikotinkonsum in unterschiedlichen Studien als Alzheimer-Risikofaktoren identifiziert worden (Mayeux *et al.*, 2003). Unklar ist, welche dieser Umweltfaktoren „echte“ Risikofaktoren sind oder den Verlauf der AD beschleunigen, indem eine zerebrovaskuläre Pathologie induziert wird. Auf einen weiteren Risikofaktor – Typ2-Diabetes – soll im nächsten Abschnitt detailliert eingegangen werden.

1.3.3 Alzheimer Demenz und Insulin-Signaltransduktion

Typ-2-Diabetiker haben ein 50% -ig erhöhtes Risiko, an Alzheimer Demenz zu erkranken (Arvanitakis *et al.*, 2004; Grodstein *et al.*, 2001; Leibson *et al.*, 1997; Ott *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004). Hauptfunktion in Typ-2-Diabetes spielen die beiden Hormone Insulin und Insulin like growth factor-1 (IGF-1). Diabetiker entwickeln im Verlauf ihrer Krankheit eine Resistenz gegenüber diesen Hormonen, was zu einer natürlichen Überproduktion von Insulin und IGF-1 im Körper der Patienten führt, um diese Insensitivität auszugleichen. Auch in Patienten mit sporadischer AD konnten veränderte Insulin- und IGF-1-Level nachgewiesen werden (Watson and Craft, 2003). Beiden Hormonen werden wichtige Gehirn-Funktionen zugeschrieben, wie zum Beispiel die Regulation des Energie- und Glukosestoffwechsels, Wachstum sowie die Modulation neuronaler und neuroendokriner Aktivität (Kern *et al.*, 2001; Torres-Aleman, 2000). Interessanterweise werden beide Hormone auch mit dem A β -Metabolismus in Verbindung gebracht. Insulin- und IGF-1-Verabreichung stimuliert die Freisetzung von A β in Neuronen (Gasparini *et al.*, 2001; Kamenetz *et al.*, 2003), zudem besitzt IGF-1 einen stimulatorischen Effekt auf den Abbau von A β , indem es Transport-

Proteine aktiviert, die A β binden und vom extrazellulären Raum in das Gehirn transportieren, wo es abgebaut werden kann („amyloid sink theory“;Carro and Torres-Aleman, 2004a; Carro and Torres-Aleman, 2004b). Solche A β -Transporter sind beispielsweise Transthyretin und Albumin (Carro *et al.*, 2002). Im extrazellulären Raum hingegen kann ein Abbau von A β durch das sogenannte Insulin-abbauende Enzym („Insulin degrading enzyme“; IDE) erfolgen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Insulin das Hauptsubstrat des IDE ist, jedoch konkurriert A β mit dem Hormon um den Abbau durch diese Metalloendopeptidase (Gasparini *et al.*, 2001). Hohe Insulin-Mengen aufgrund erworbener Insulin-Resistenz, wie es in Typ2-Diabetikern und in AD-Patienten der Fall ist, führen folglich zu einem verringerten Abbau von A β durch IDE.

Ein weiteres Indiz, dass eine Insulin/IGF-1-Fehlfunktion Ursache für AD sein kann, ist die Tatsache, dass transgene Mäuse mit einem Defekt in der Insulinsignalkaskade ein reduziertes Hirnvolumen sowie eine abnormale Tau-Phosphorylierung aufweisen (Schubert *et al.*, 2004). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Insulin und IGF-1 einen inhibitorischen Effekt auf die Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) ausüben, die als Tau-Kinase identifiziert werden konnte (Hong and Lee, 1997). Reduzierte Signaltransduktion durch diese Hormone führt zu einer Aktivierung von GSK-3 β und in Folge dessen zu einer verstärkten Tau-Phosphorylierung.

Im Vergleich mit gleichalten nicht-dementen Personen liegen in Patienten mit sporadischer Alzheimer Demenz – analog den Typ-2-Diabetikern – ebenfalls erhöhte Insulin- und IGF-1-Mengen vor, was möglicherweise auf eine Insulin-Resistenz zurückzuführen sein könnte. In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, dass die Menge an Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF α), ein Pro-Inflammatorisches Cytokin, in Alzheimer Patienten erhöht ist (Bruunsgaard *et al.*, 1999; Solerte *et al.*, 2000). Hohe TNF α -Level führen zu verringerter Insulin- und IGF-1-Sensitivität (Aguirre *et al.*, 2002), was Ursache einer eintretenden Insulin-Resistenz sein könnte.

So lässt sich für nahezu alle charakteristischen Merkmale der Alzheimer Krankheit eine Verbindung zu einer gestörten Insulin/IGF-1-Signaltransduktion finden: A β -Plaque-Bildung (induziert durch verringerten A β -Abbau und verstärkter Sekretion), die Bildung von Neurofibrillenbündeln (verursacht durch Tau-Hyperphosphorylierung), Gehirn-Atrophie (hervorgerufen durch einen gestörten Energie-Metabolismus und eingehendem Zelltod), etc.

Offen bleibt die Frage, ob ein gestörter Insulin-Haushalt „echte“ pathogene Ursache oder eine Folge dieser Merkmale ist – aber allein die Tatsache, dass Typ-2-Diabetes-Patienten viel häufiger an der Alzheimer Krankheit erkranken sowie die Beobachtung, dass in AD-Patienten ein gestörter Insulin/IGF-1-Stoffwechsel vorliegt (Craft *et al.*, 1998), unterstreicht die Wichtigkeit einer regulierten Insulin-Signaltransduktion für ein gesundes Gehirn. Abbildung 7 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Insulinsignalkaskade.

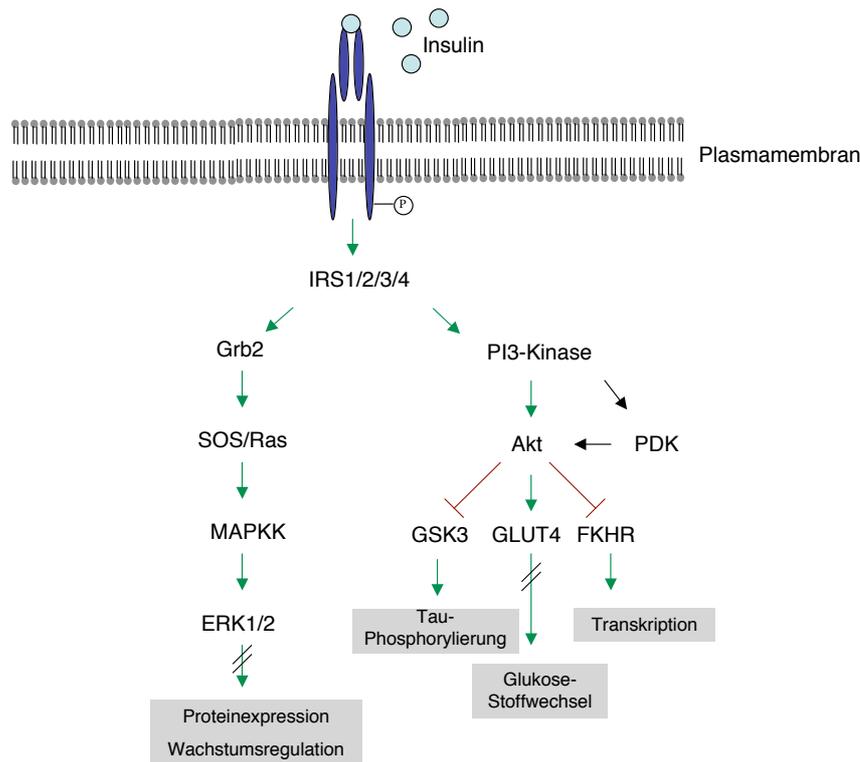


Abbildung 7: Schematische vereinfachte Darstellung Insulinsignalweges

Aktivierung des Insulinrezeptors führt zur Aktivierung zahlreicher Signalkaskaden. Eine Aktivierung eines Signalweges ist mit grünen Pfeilen dargestellt, eine Inhibition mit roten Strichen.

IRS: Insulinrezeptorsubstrat; Grb2: Growth factor receptor bound Protein 2, PI3-Kinase: Phosphatidylinositol 3-Kinase, PDK: Phosphatidylinositol-abhängige Proteinkinase, MAPKK: Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase, ERK: Extrazellulär regulierte Proteinkinase, GLUT4: Glukosetransporter 4, FKHR: Transkriptionsfaktor „forkhead in rhabdomyosarcoma“, GSK3: Glykogensynthase-Kinase 3, Akt: Serin-Threonin-Kinase (Proteinkinase B), SOS: Son of Sevenless, Ras: kleines G-Protein „rat sarcoma“.

1.4 Die Bedeutung der Endozytose für die Alzheimer Krankheit

Die Tatsache, dass nur etwa 5-10% aller Alzheimer Erkrankungen genetisch bedingt sind und die meisten Krankheitsfälle sporadisch auftreten, deutet darauf hin, dass die pathogene A β -Aggregation im Gehirn der Patienten von einer anderen Zell-Fehlfunktion herrührt. Dabei besitzen auch nicht alle Patienten mit sporadischer AD ein ApoE- ϵ 4-Allel oder haben Diabetes mellitus. Vermutlich gibt es weitere Risikofaktoren, die das Eintreten der Krankheit herbeiführen. Interessanterweise ist eine abnormale Endozytose eine der am frühesten beobachteten Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten (Cataldo *et al.*, 1997; Cataldo *et al.*, 2000). In Down-Syndrom-Patienten kann man beispielsweise schon lange vor dem typischen Alzheimer-Krankheitsbild eine Änderung der Endosomen-morphologie feststellen (Cataldo *et al.*, 1997; Cataldo *et al.*, 1996).

Während der Endozytose wird extrazelluläres Material sowie Bereiche der Plasmamembran und dort lokalisierte Proteine internalisiert und in einer Abfolge unterschiedlicher Schritte durch zahlreiche vesikuläre Kompartimente befördert (für eine ausführliche Übersicht siehe Katzmann *et al.*, 2002; Seto *et al.*, 2002; Sorkin and Von Zastrow, 2002).

Matures β APP gelangt vom Trans-Golgi-Network (TGN) zur Plasmamembran, wo es sehr rasch durch Ektodomänenspaltung der α -Sekretasen umgesetzt wird (Buxbaum *et al.*, 1998; Lopez-Perez *et al.*, 2001). Alternativ erfolgt eine Internalisierung in die sogenannten frühen Endosome („early endosomes“), wo eine Proteolyse durch die β -Sekretase erfolgt, die vor allem in den Endosomen aktiv ist (Capell *et al.*, 2000; Rajendran *et al.*, 2006; Vassar *et al.*, 1999). Eine Inhibition der Endozytose von β APP führt in Folge dessen zu einer verringerten A β -Bildung (Koo and Squazzo, 1994; Soriano *et al.*, 1999), wohingegen eine Aktivierung des endozytotischen Weges zu einer A β -Zunahme führt (Grbovic *et al.*, 2003). Eine regulierte Endozytose ist also von großer Bedeutung für das Schicksal der β APP-Prozessierung und in Folge dessen auch für die Menge an gebildetem A β .

Speziell in Neuronen ist die Endozytose ein bedeutender Prozess, der wichtige Aufgaben erfüllt. So ist sie beispielsweise unablässlich für die Kommunikation von Zellen mit dem peripherem Gewebe (Sofroniew *et al.*, 2001), aber auch das Sortieren von Rezeptoren in den Endosomen ist ein wichtiger Vorgang zur Regulation der Level an zellulären Neurotransmittern, Neurohormonen und Rezeptoren (Nixon, 2005). Da Neuronen polarisierte Zellen sind, befinden sich die Regionen, die für Signaltransduktion und Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich sind meist in großen Abständen von ihren Ziel- und

Effektormolekülen. Um diese große räumliche Trennung zu überwinden, ist eine geregelte Endozytose für Neuronen von besonderer Bedeutung (Nixon, 2005), um intra- und interzelluläre Kommunikation, Signaltransduktion und einen geregelten Stoffwechsel aufrecht erhalten zu können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine regulierte Endozytose in Neuronen von großer Bedeutung für die β APP-Prozessierung und A β -Bildung ist. Auch die Tatsache, dass eine abnormale Endozytosefunktion nicht nur in Alzheimer-Patienten, sondern auch in zahlreichen weiteren neurodegenerativen Krankheiten, wie zum Beispiel ALS (Amyotrophe Lateralsklerose), Huntington's Disease und Niemann-Pick-Krankheit nachgewiesen werden konnte (Nixon, 2005), unterstreicht die Wichtigkeit dieses Vorgangs für Nervenzellen.

1.5 Identifizierung neuer Modulatoren der β APP-Proteolyse

Um mögliche Regulationsmechanismen, zelluläre Vorgänge und neue Regulatoren im Rahmen der β APP-Spaltung zu identifizieren und besser zu verstehen, wurde bereits vor Beginn dieser Doktorarbeit von Dr. Stefan Lichtenthaler ein Expressionsklonierungs-Screen durchgeführt. Mit Hilfe dieses genetischen Screens wurden Proteine identifiziert, die einen Einfluss auf die Prozessierung von β APP nehmen (Neumann *et al.*, 2006; Schobel *et al.*, 2006). Zu diesem Zweck wurde eine humane Gehirn-cDNA-Bibliothek in eine klonale Reporterzelllinie transfiziert. Diese Reporterzelllinie, basierend auf humanen embryonalen Nierenzellen, exprimiert stabil β APP, das N-terminal an sekretorische alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist (Abb. 8). Um Zellen vor einem möglichen Zelltod zu schützen, der durch die Transfektion proapoptotischer Gene, die in der cDNA-Bibliothek enthalten sind, ausgelöst werden kann, wurde die Reporterzelllinie zusätzlich mit der DNA der anti-apoptotischen Gene Bcl-Xl und CrmA transfiziert. Klon SABC70 exprimierte AP-APP und erwies sich als Apoptose-resistent und wurde deshalb zur Durchführung des Expressionsklonierungs-Screens herangezogen (Schobel *et al.*, 2006). Die SABC70-Zelllinie wird in folgenden Experimenten als AP-APP-Zelllinie bezeichnet.

Nach Transfektion der cDNA-Bibliothek in die AP-APP-Reporterzelllinie ist es möglich, Aktivatoren der β APP-Spaltung durch eine alkalische Phosphatase-Aktivitätsbestimmung im Überstand der Zellen nachzuweisen.

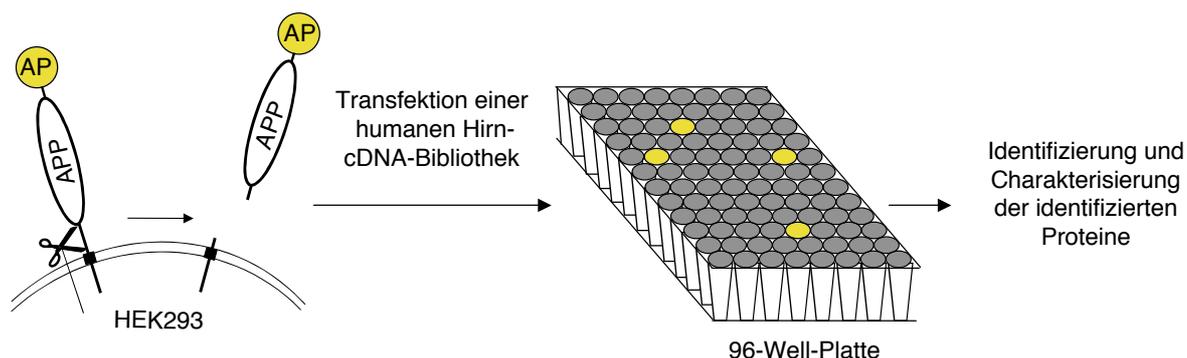


Abbildung 8: Prinzip des Expressionklonierungs-Screens

HEK293-Zellen exprimieren stabil ein Fusionsprotein (AP-APP), bestehend aus β APP, an dessen Ektodomäne N-terminal Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Nach Transfektion der cDNA-Bibliothek kann die AP-Aktivität im Überstand bestimmt werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten sieben cDNAs identifiziert werden, die zu einer Aktivierung der β APP-Spaltung führen (Schobel *et al.*, 2006). Unter anderem konnte die katalytische α -Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) als Aktivator der β APP-Spaltung identifiziert werden, was in Übereinstimmung mit vorangegangenen Publikationen ist (Marambaud *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte ein bislang unbekanntes Protein, ein neues Mitglied der Sorting Nexin-Familie, identifiziert werden.

1.6 Die Sorting Nexin Proteinfamilie

1.6.1 Generelle Eigenschaften der Sorting Nexine

Der Endozytose- und Sortierapparat der Zelle ist wichtig, um die Lokalisierung von Proteinen und die damit verbundene Funktion zu bestimmen. Von besonderer Bedeutung hierfür ist die Plasmamembran. Von dort aus werden Proteine der Plasmamembran in die frühen und sortierenden Endosomen („sorting endosomes“; Abb. 9) internalisiert, wo eine Entscheidung über den weiteren Weg des Proteins getroffen wird. Das Schicksal der endozytierten Rezeptoren und Proteine wird oft von weiteren Proteinen oder Proteinkomplexen beeinflusst, die mit diesen interagieren können und so eine regulatorische Funktion übernehmen.

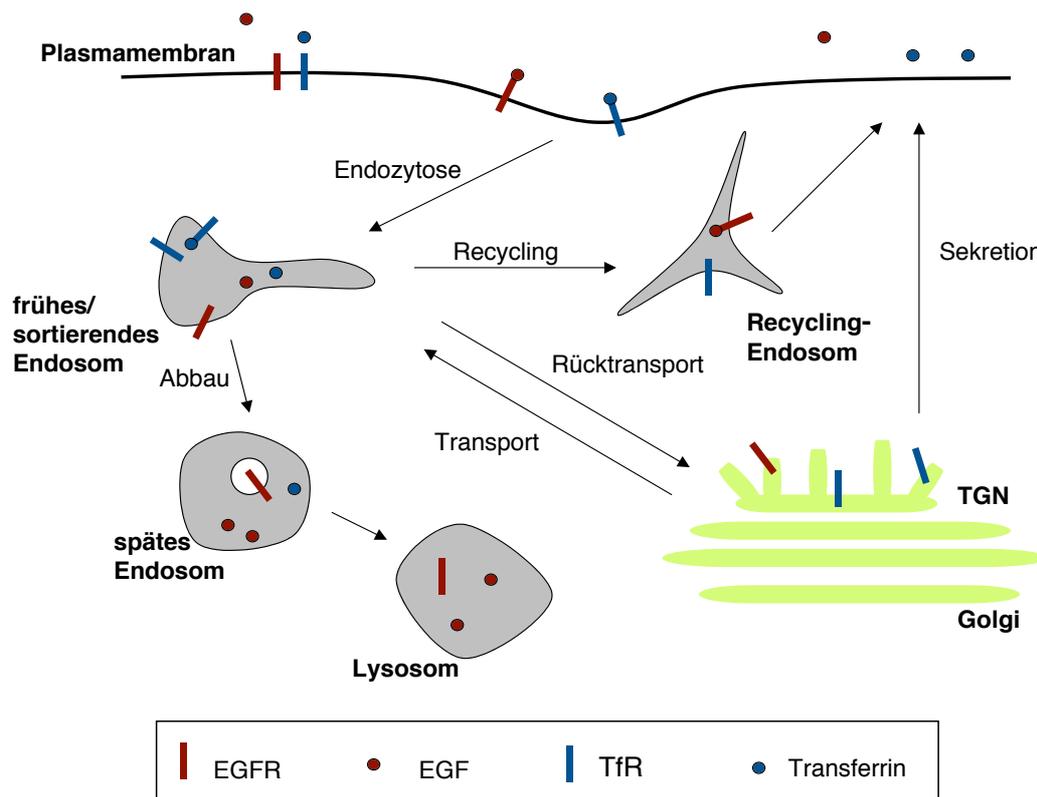


Abbildung 9: Endosomale Sortierung von Rezeptoren

Rezeptoren der Plasmamembran können nach Endozytose in das sortierende/frühe Endosom in späte Endosomen transportiert werden, um dann im Lysosom abgebaut zu werden. Auch ein Rücktransport der Proteine vom sortierenden Endosom zur Plasmamembran ist über die Recycling-Endosomen möglich. Zellkompartimente sind mit Fettschrift gekennzeichnet, Pfeile markieren mögliche Transportprozesse. EGF: epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor), EGFR: EGF Rezeptor, TfR: Transferrinrezeptor, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk (modifiziert nach Maxfield and McGraw, 2004).

Die Proteine der Sorting Nexin (SNX) Familie sind Modulatoren, die einen Einfluss auf eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse in der Endozytose, der Proteinsortierung und dem Protein-Transport nehmen (Worby and Dixon, 2002). Sorting Nexine sind hydrophile, zytoplasmatische Proteine, die auch membranassoziiert vorliegen können und ca. 400 bis 700 Aminosäuren groß sind (Worby and Dixon, 2002). Hauptcharakteristikum der Sorting Nexine ist das Vorhandensein eines Phosphoinositol (PI)-Bindungsmotivs, einer sogenannten Phox-Homologie (PX)-Domäne, die meist in der Mitte oder der amino-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert ist. Die PX-Domäne der Sorting Nexine verleiht diesen Proteinen ein Membranbindungspotential. Mit Hilfe des SMART-Suchprogramms („simple modular architecture research tool“) konnten bislang 33 Säuger-Sorting Nexine identifiziert werden, aber auch einige Homologe in den unterschiedlichsten Spezies – von *Saccharomyces cerevisiae* bis zu *Arabidopsis thaliana* – konnten dieser Proteinfamilie zugeordnet werden

(Carlton *et al.*, 2005; Carlton and Cullen, 2005). Abbildung 10 zeigt 29 der bislang 33 bekannten Sorting Nexine.

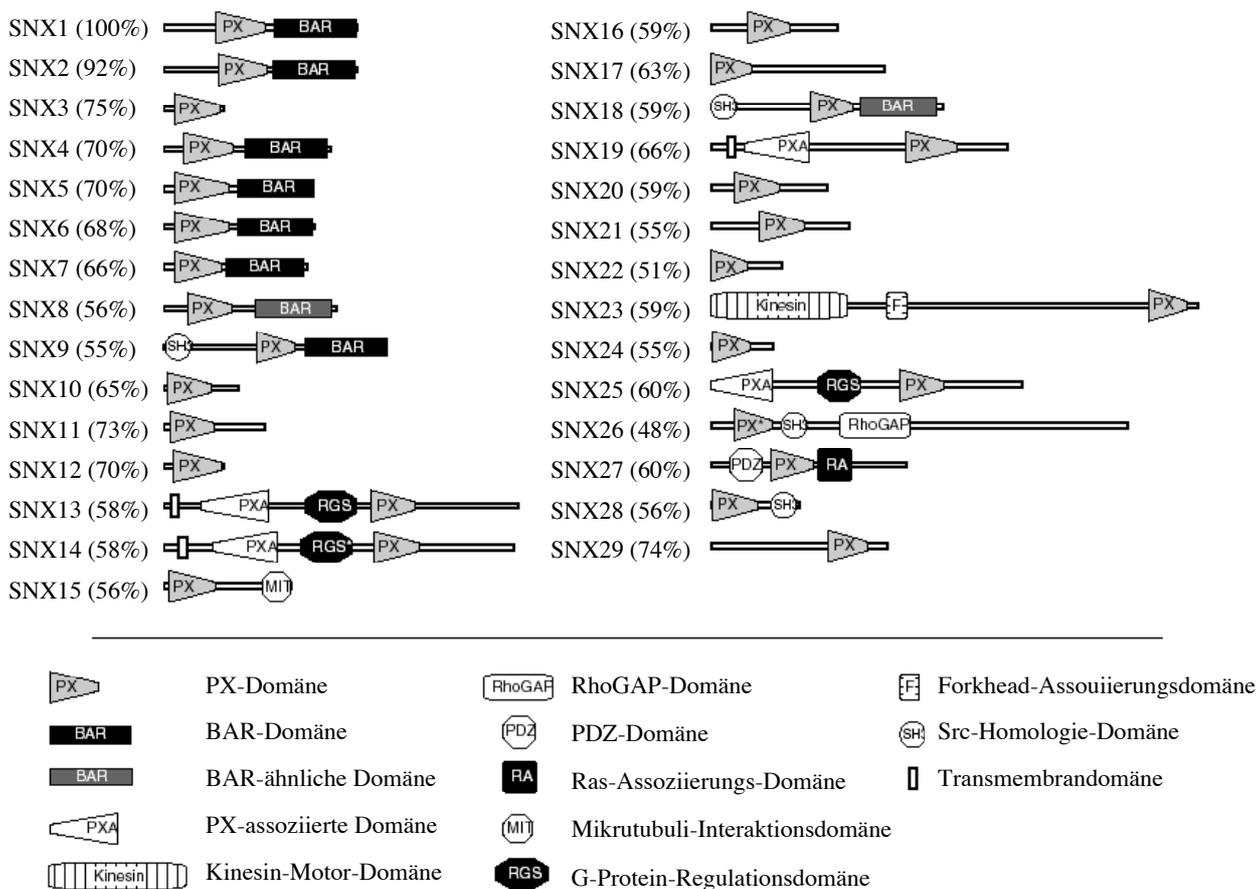


Abbildung 10: Übersicht der in Säugern bekannten Sorting Nexine

Gezeigt sind die unterschiedlichen Domänen von 29 Sorting Nexinen. In Klammern angegeben ist die Homologie zwischen der SNX1-PX-Domäne und der entsprechenden SNX-PX-Domäne (ClustalW Alignment). Abbildung modifiziert nach (Carlton *et al.*, 2005).

Die Sorting-Nexin-Proteinfamilie kann in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 besitzt einen langen Carboxy-Terminus, der ein bis drei sogenannte „coiled-coil“-Domänen besitzt, die auch als Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR)-Domäne bezeichnet werden. Diese Domäne ermöglicht den Sorting Nexinen dieser Subgruppe eine Homo- oder Heterodimerisierung sowie mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen (Lupas, 1996). Des Weiteren vermitteln BAR-Domänen eine Membranassoziiierung (Habermann, 2004; Peter *et al.*, 2004). Mitglieder dieser Subgruppe sind beispielsweise SNX1 und SNX2. Gruppe 2 beinhaltet die Sorting Nexine, die – abgesehen von der PX-Domäne – keine weiteren vorhersagbaren funktionellen Domänen besitzen, wie zum Beispiel SNX3 und SNX10. Die dritte Gruppe enthält Proteine, die Protein-Protein-Interaktionsdomänen kodieren. Diese sind beispielsweise Src Homologie 3 (SH3)-Domänen (Mayer, 2001), G-Protein regulatorische

Domänen (Zheng *et al.*, 2001) oder hydrophobe Sequenzen, die eine Membranassoziiierung vermitteln (Worby and Dixon, 2002). Mitglieder dieser Subklasse sind beispielsweise SNX9 und SNX26.

Abgesehen von der Sequenz der PX-Domäne besitzen die unterschiedlichen Sorting Nexine teilweise eine sehr geringe Sequenzhomologie. Da das einzige Kriterium für ein Protein, als Sorting Nexin klassifiziert zu werden, das Vorhandensein einer PX-Domäne ist (die minimal 50% Homologie zur SNX1-PX-Domäne besitzen muss), ist es durchaus vorstellbar, dass einige Proteine fälschlicherweise in diese Familie eingereiht werden und somit keine Funktionen im endosomalen Recycling oder Sortieren erfüllen (Worby and Dixon, 2002).

1.6.2 Funktion der Sorting Nexine

Das erste bekannte Sorting Nexin aus Säugetieren, SNX1, wurde 1996 beschrieben (Kurten *et al.*, 1996). In einem Hefe-Two-Hybrid-Screen konnte eine Interaktion von SNX1 mit der Kinase-Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR; epidermal growth factor receptor) gezeigt werden (Kurten *et al.*, 1996). SNX1 besitzt große Homologie zu dem Hefe-Protein Vps5p („vacuolar protein-sorting“), das eine Komponente des Retromerkomplexes in diesem Organismus ist. Der Retromerkomplex hat die Aufgabe, Proteine des Golgi-Apparats vom endosomalen System zurückzuhalten.

Beinahe alle publizierten Studien über Sorting Nexine aus Säugern weisen diesen Proteinen eine Funktion in der Proteinsortierung - vor allem mit Schwerpunkt auf Plasmamembran-Rezeptorendozytose und Regulation der endosomalen Sortierung – nach (Worby and Dixon, 2002).

Da die PX-Domänen der Sorting Nexine eine Bindung an unterschiedliche Lipidgruppen vermitteln können, beschränkt sich die Funktion dieser Proteinfamilie nicht nur auf endosomale Membranen. Sorting Nexine agieren in einer Vielzahl unterschiedlicher Kompartimente in der Zelle. Auch ihre Domänenstruktur lässt vermuten, dass einige Sorting Nexine in weitere zelluläre Regulationsmechanismen verwickelt sind. Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie SH3, RGS („regulator of G-Protein signaling“), RA („Ras association“) und PDZ („PdD95/Dlg/Zo1“) deuten darauf hin, dass Sorting Nexine nicht nur Regulatoren der endosomalen Proteinsortierung sind, sondern eventuell auch in Signaltransduktion und –regulation involviert sind (Carlton *et al.*, 2005). Eine mögliche Funktion eines Sorting Nexins im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit ist bislang nicht beschrieben.

2. Zielsetzung

Die Spaltung des β -Amyloid Vorläuferproteins (β APP) durch α - und β -Sekretasen ist ein wichtiger Prozess in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit. Auf der Suche nach Proteinen, welche die Proteolyse des β -Amyloid Vorläuferproteins (β APP) beeinflussen, wurde ein Expressionsklonierungs-Screen durchgeführt (Schobel *et al.*, 2006). Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte unter anderem ein neues, bislang nicht beschriebenes Mitglied der Sorting Nexin Familie, Sorting Nexin 33 (SNX33), als Aktivator der β APP-Proteolyse identifiziert werden.

Folgende fünf Fragestellungen sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit bearbeitet werden:

- *Wie wirkt SNX33 auf die Ektodomänenspaltung von β APP?*

SNX33 konnte in einem Screen als Aktivator der β APP-Proteolyse identifiziert werden. Es soll geklärt werden, ob SNX33 einen Einfluss auf die pathogene β -Spaltung oder auf die neuroprotektive α -Spaltung ausübt. Des Weiteren soll analysiert werden, ob die homologen Proteine SNX9 und SNX18 ebenfalls einen Einfluss auf die Proteolyse von β APP besitzen, oder der Effekt nur durch SNX33 vermittelt werden kann. Außerdem soll untersucht werden, ob SNX33 spezifisch die β APP-Proteolyse beeinflusst oder aber die Spaltung weiterer Transmembranproteine modulieren kann. Ziel ist es, den Mechanismus aufzuklären, durch welchen das neu identifizierte Protein zu einer Zunahme der β APP-Proteolyse führt.

- *Welche generellen Eigenschaften besitzt das neu identifizierte Protein SNX33?*

Um Aufschluss über die Funktion des Proteins zu bekommen, soll eine ausführliche Charakterisierung von SNX33 durchgeführt werden. Mit Hilfe eines multiplen Gewebe-Northern Blot-Experiments sowie durch Immunpräzipitationen soll untersucht werden, in welchen Geweben und in welchen Zelltypen SNX33 exprimiert wird. SNX33 besitzt eine Phox-Homologie (PX)-Domäne sowie eine BAR-Domäne, die in der Literatur als Membran-assoziiierende Domänen beschrieben sind. Aufgrund dieser Beobachtung soll die Lokalisierung von SNX33 in der Zelle überprüft werden. Es ist möglich, dass SNX33 ein zytosolisches Protein ist, es könnte aufgrund seiner Domänenstruktur jedoch auch Membran-assoziiert vorliegen. Im Rahmen einer generellen Charakterisierung soll das Protein auf post-translationale Modifikationen untersucht werden sowie mögliche Interaktionspartner ausfindig gemacht werden.

- *Ist SNX33 in endozytotische Prozesse involviert?*

Da beinahe alle bislang beschriebenen Mitglieder der Sorting Nexin-Familie in Protein-Sortierung und -Weiterleitung involviert sind, soll untersucht werden, ob SNX33 einen Effekt auf die Endozytose von β APP und möglicherweise auf weitere Zelloberflächenproteine ausübt. Des Weiteren soll der Funktionsmechanismus von SNX33 aufgeklärt werden, der zu einer Zunahme der β APP-Spaltung führt. Da eine veränderte Endozytoserate und deren Einfluss auf die β APP-Prozessierung in der Literatur mit widersprüchlichen Resultaten beschrieben sind (Chyung and Selkoe, 2003; Koo and Squazzo, 1994; Soriano *et al.*, 1999), soll untersucht werden, welchen Effekt eine Endozytose-Inhibition auf die Bildung von sAPP α und sAPP β ausübt.

- *Welche Auswirkung besitzt ein SNX33-Knock-Down auf β APP in humanen Zellen?*

Es soll überprüft werden, ob ein Knock-Down von SNX33 - in Analogie zu Überexpressionsbedingungen - einen Einfluss auf zelluläre Vorgänge besitzt, die zu einer veränderten β APP-Prozessierung führen. Die Menge an gebildetem sAPP α und sAPP β sowie die β APP-Endozytoserate sollen unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen untersucht werden. Des Weiteren soll analysiert werden, ob ein Verlust des Proteins durch die homologen Proteine SNX9 und SNX18 kompensiert werden kann.

- *Welche in vivo Funktion besitzt SNX33?*

In Kooperation mit Dr. Maren Hertweck der Universität Freiburg soll im Rahmen dieser Doktorarbeit eine Analyse der *in vivo* Funktion von SNX33 im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* durchgeführt werden. Da SNX33 in *C. elegans* - im Gegensatz zum humanen Zellkultursystem - keine homologen Proteine besitzt, ist es möglich, dass ein beobachteter Phänotyp nach SNX33-Knock-Down in *C. elegans* dramatischer ausfällt, da eine mögliche Funktionsübernahme durch homologe Proteine nicht erfolgen kann. Der Phänotyp eines SNX33-Knock-Downs in *C. elegans* soll im Rahmen dieser Doktorarbeit eingehend analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Molekularbiologie

<i>Geräte/Materialien</i>	<i>Firma</i>
Dokumentation (Quickstore plus II)	MS Laborgeräte
Drucker Geldokumentationsanlage	Mitsubishi
Elektrophoresekammern	Owl Separation Systems, Inc.
37 °C-Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products
Kamera (CCD Video Camera Module)	MS Laborgeräte
Mikrowelle	Alaska
Humaner multiple tissue Northern Blot (MTN)	Clontech
PCR-Maschine (Mastercycler personal)	Eppendorf
Schüttelinkubator Certomat BS-1	B. Braun Biotech International
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
UV-Schirm	Intas

3.1.2 Zellkultur

<i>Geräte/Materialien</i>	<i>Firma</i>
Bunsenbrenner	Heraeus
Deckgläser	Menzel-Gläser
Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einweg-PP-Röhrchen steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Leica DMRB
-80 °C-Gefrierschrank	Heraeus
Glasplättchen (Ø 10 mm)	Marienfeld
Objektträger	Menzel-Gläser
Pasteurpipetten	Volac
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments
Wasserbad	GFL
Zell-Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zellkulturschalen (24 Well, 6 cm, 10 cm)	Nunc
Zellschaber	Corning Incorporated
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments

3. Material und Methoden

3.1.3 Proteinbiochemie

<i>Geräte/Materialien</i>	<i>Firma</i>
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Filme Super RX	Fuji
Gefrierschrank (Arktis)	AEG
Gel-Blottingpapier („Whatmanpapier“)	Schleicher & Schuell
Gelkammer	Biorad
Heizblöcke	Stuart Scientific, NeoLab
Kühlschrank (Santo)	AEG
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
PhosphoImager	Molecular Dynamics
96 Well Platten (Proteinbestimmung)	Nunc
Photometer	Tecom Spectra
PVDF Immobilon, Transfermembran	Milipore
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell
pH-Elektrode	Schott
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt
Röntgenfilme (Super RX)	Fuji
Scanner	Hewlett Packard
Sonifier (Cell Disruptor B 15)	Branson
Thermomixer kompakt	Eppendorf
Transferkammer	BioRad
Überkopfschüttler (Reax2)	Heidolph
Ultrazentrifuge Optima LE 80K (Rotor TLA-55)	Beckmann
Spannungsquelle	Biorad
Vortex VF2	IKA-Labortechnik
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann

3.2 Chemikalien und Lösungen

3.2.1 Molekularbiologie

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Angegeben ist der Name, die Zusammensetzung und der Hersteller.

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Agarose NA		Amersham Biosciences
Ampizillin		Roth
Ampizillin-Lösung (Stammlösung 1000x)	100 mg/ml Ampizillin gelöst in 70% Ethanol	
α - ³² P-dCTP	10 μ Ci/ μ l	Amersham Biosciences
4x DNA Probenpuffer	30% (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA, 0,05% Orange G in dH ₂ O	
DNA T4 Ligase (5U/ μ l)		Roche

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
DNA T4 Ligase Puffer		Roche
dNTP (10 mM)		Roche
Glycerinlösung	50% (w/v) Glycerin in dH ₂ O	
Hybridisierungslösung		Clontech
Hybridisierungs-ofen (Hybridiser HB-1D)		Techne Cambridge
Hybridisierungsröhrchen		Techne Cambridge
1 kB-DNA-Leiter		Gibco Invitrogen Corporation
LB-Medium (Lysogeny Broth Medium)	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl pH 7,0	
LB-Medium mit Ampizillin	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl pH 7,0, 100 µg/ml Ampizillin	
NucleoBond AX500 Kit		Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit		Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid		Macherey-Nagel
psi-Medium	30 mM Kaliumazetat KCH ₃ COO 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 50 mM MnCl ₂ x 4H ₂ O 15% Glycerin (v/v) pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen, steril filtrieren und bei 4 °C aufbewahren	
Pwo-Polymerase (1U/µl)		PeqLab
10x Pwo Polymerase Reaktionspuffer		PeqLab
Quick Spin Säulen		Roche
Random Primer DNA Labeling System		Invitrogen
SAP (1 U/µl) Shrimp alkaline phosphatase <i>Alkalische Phosphatase aus Krabben</i>		Roche
SOB-Medium (Super Optimal Broth)	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 2,5 mM KCl ad 1 l H ₂ O, (autoklavieren)	
TAE Puffer (50x)	2 M Tris 1 M CH ₃ COOH 50 mM EDTA	

3. Material und Methoden

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
TB Puffer	10 mM Hepes, 15 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 250 mM KCl, pH-Wert 6,7 mit KOH einstellen, 55 mM MnCl ₂ x 2H ₂ O steril filtrieren	
TBE Puffer	9 mM Tris-Borat 2 mM EDTA in dH ₂ O	
Tfb1-Lösung	30 mM Kaliumazetat KCH ₃ COO 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 50 mM MnCl ₂ x 4H ₂ O 15% Glyzerin (v/v) pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen, steril filtrieren und bei 4 °C aufbewahren.	
Tfb2-Lösung	10 mM MOPS (PIPES) 75 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 10 mM RbCl 15% Glyzerin pH 6,5 mit KOH einstellen, steril filtrieren und bei 4 °C lagern	
TYM-Medium	2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO ₄	

3.2.2 Zellkultur

Tabelle 2: Chemikalien und Lösungen für zellbiologischen Methoden

Angegeben ist der Name, die Zusammensetzung und der Hersteller.

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Roth
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose	Gibco
Einfriermedium	FCS mit 5% DMSO	
FCS (Fetal Calf Serum) Fötale Kälberserum		Gibco
Grundmedium	DMEM 10% FCS 50 U/ml Penizillin 50 µg/ml Streptomycin	
HEPES		Invitrogen
Hygromycin		Invitrogen
Lipofectamin 2000		Invitrogen
Minimalmedium	DMEM + 0,1% BSA	

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
PBS (Phosphate Buffered Saline) <i>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>	140 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,75 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit HCl eingestellt in dH ₂ O (autoklaviert)	
PBS-EDTA	PBS (steril), 25 mM EDTA	
Penizillin/Streptomycin (P/S)	5000 U/ml Penizillin 5 mg/ml Streptomycin	Gibco
PMA (Phorbol 12-Myristat 13- Azetat)		Sigma
Poly-L-Lysin-Lösung	100 µg/ml Poly-L-Lysin gelöst in PBS (steril)	Sigma
Puromycin (50 µg/ml)		Invitrogen
Puromycin/Hygromycin- Selektionsmedium für HEK293/APP695-Zellen	0,5 µg/ml Puromycin 100 µg/ml Hygromycin	
Puromycin/Hygromycin- Selektionsmedium für SABC70-Zellen (AP-APP)	0,3 µg/ml Puromycin 40 µg/ml Hygromycin	
Puromycin-Selektionsmedium	Grundmedium 1 µg/ml Puromycin	
siRNA Oligonukleotide		Dharmacon
Transformationsmedium	DMEM ohne Zusätze	Gibco
Trypsin-Lösung	0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA * 4Na in Hanks' B.S.S.	Gibco

3.2.3 Proteinbiochemie

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen für proteinbiochemischen Methoden

Angegeben ist der Name, die Zusammensetzung und der Hersteller.

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Alexa Fluor 555-Transferrin	50 µg/ml in DMEM	Molecular Probes
Acrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid-BIS- Acrylamid in dH ₂ O	Q-BioGene
Acrylamidlösung für Tris- Tricin-Gele	48 g Acrylamid 1,5 g Bisacrylamid ad 100 ml dH ₂ O	
Ammoniumchlorid-Lösung	50 mM NH ₄ Cl in PBS	
1 x Anodenpuffer	0,2 M Tris in dH ₂ O, pH mit HCl auf 8,9 eingestellt	
APS (Ammonium-Persulfat)	10% Stammlösung in H ₂ O	Roche
ATP (10 mM)		Roche
BCA Kit		Uptima, Interchim

3. Material und Methoden

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Alkalische Phosphatase-Substrat	1 Tablette in 1 ml H ₂ O lösen, 1:500 einsetzen	Roche
Biotinlösung (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin)	0,5 mg/ml in PBS-Puffer	Pierce
Blockpuffer für Western Blot (Blockierlösung)	5% Magermilchpulver in PBST	
Blockreagenz für Immunfluoreszenz	2% BSA 2% FCS 0,2% Gelatin gelöst in PBS	
BSA (Bovine Serum Albumin) <i>Rinder Serumalbumin</i>		Uptima, Interchim
BSA-Standardlösung		Uptima, Interchim
Coomassie-Blue-Färbelösung	50% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Eisessig 0,5% (w/v) Coomassie-Blue-R in dH ₂ O	
DABCO		Sigma
ECL Detektionsreagenz		Amersham Biosciences
ECL plus Detektionsreagenz	Chemiluminiszenzreagenz A und B (Verhältnis 1:40)	Amersham Biosciences
Eindeckellösung	15% Moviol 50 mg/ml DABCO in dH ₂ O	
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS in dH ₂ O	
Elutionspuffer	8 M Harnstoff in dH ₂ O	
Endozytosemedium	DMEM 25 mM Hepes pH 7,5, 1 mg/ml BSA 50 µg/ml Alexa Fluor 555-Transferrin	
Entfärbelösung	5% (v/v) Isopropanol 7% (v/v) Eisessig	
Equilibrierungslösung	50 mM Tris, pH 8,0	
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd, 4% Saccharose in PBS-Puffer	
Gelatin (Teleostean gelatin)		Sigma
Gelpuffer	3M Tris-HCl pH 8,45 0,3% SDS in dH ₂ O	
L-Glutathion, reduziert		Sigma
Glutathion-Puffer	1,54 g Glutathion, 0,53 g NaCl, 100 µl 1,25 M CaCl ₂ , 100 µl 1,25 M MgCl ₂ 0,2 g BSA mit NaOH auf pH 8,6 in dH ₂ O	
Glutathion Sepharose 4B (GSH-Sepharose)		Amersham Biosciences

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Glyzerollösung	32% (v/v) Glyzerol in dH ₂ O	
Glycinlösung	20 mM Glycin in PBS-Puffer	
Hybridisierungslösung		BD Biosciences
I-Block (Tropix Western Star Kit)	0,8 g I-Block gelöst in 400 ml PBS 400 µl Tween-20	Nalgene
Insulin, human		Sigma-Aldrich
Insulinlösung	5 mg/ml in 0,01M HCl (861 µM), steril filtriert, Lagerung bei -20 °C, Arbeits-Aliquot bei 4 °C aufbewahrt	
IPTG, dioxanfrei (Isopropyl-β-D-thiogalactosid)	0,1 M IPTG in dH ₂ O, steril filtriert	Roth
1 x Kathodenpuffer	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M Tricine und 0,1% (w/v) SDS in dH ₂ O	
KSHM-Puffer	100 mM Kaliumazetat 85 mM Saccharose 1 mM Magnesiumazetat 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4 Protease-Inhibitor 1:500	
Lysispuffer	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA	
Lysozymlösung	10 mg/ml Lysozym in 25 mM Tris, pH 8,0	Merck
Magermilchpulver (instant)		Frema
β-Mercaptoethanol		Merck
Moviol-Lösung	15% Moviol 50 mg/ml DABCO in dH ₂ O	Sigma Hoechst
NH ₄ Cl (50 mM)		Merck
Nitrocellulose Transfer- Membran		Schleicher & Schuell
NP-40 (Nonidet P-40)	10% (w/v) Stammlösung in dH ₂ O	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd		J.T. Baker
PBST	PBS -Puffer 0,05% Tween-20	
PCM	PBS-Puffer 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂	
Peroxidase-gekoppelte anti- Kaninchen IgG (1 mg/ml)		Promega
Peroxidase-gekoppelte anti- Maus IgG (1 mg/ml)		Promega

3. Material und Methoden

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Peroxidase-gekoppelte anti-rat IgG (1 mg/ml)		Jackson Immuno Research
PAS (Protein A Sepharose)	2 mg PAS in 1 ml 20% EtOH gelöst; vor Gebrauch 3x mit PBS waschen	Sigma-Aldrich
PGS (Protein G Sepharose)	2 mg PGS in 1 ml 20% EtOH gelöst; vor Gebrauch 3x mit PBS waschen	Amersham Biosciences
pNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat)	5 mg/ml pNPP in Substratpuffer	Sigma
Primärantikörper	0,25% (w/v) BSA 0,05% (w/v) Natriumazid Antikörper (vgl. Tab. 4/5) in PBST	
Proteaseinhibitor (pI) Complete	1 Tablette in 1 ml H ₂ O lösen, 1:500 einsetzen	Roche
Protein-Assay-Kit („Bradford-Reagenz“)		Biorad
Proteinmarker („See Blue Plus 2“)		Invitrogen
Saccharose		Merck
Sammelgel-Puffer („High Tris Buffer“)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O	
SAP (1 U/μl) Shrimp alkaline phosphatase <i>Alkalische Phosphatase aus Krabben</i>		Roche
SAP-Puffer (alkalischer Phosphatase-Puffer)		Roche
SDS	10% (w/v) Stammlösung in dH ₂ O	
4x SDS-Probenpuffer	<i>Für 10 ml:</i> 4 ml 20% (v/v) Glycerin, 4 ml 20% (w/v) SDS 1 ml β-Mercaptoethanol, 1,25 ml 1M Tris pH 6,8, 10 μl 10% Bromphenolblau	
Sekundärantikörper	0,25% (w/v) BSA Antikörper (vgl. Tab. 6) in PBST	
STEN		Biorad
STEN-NaCl		Invitrogen
STEN-SDS		Merck
Streptavidin Sepharose High Performance	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O	
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)		Merck
Transferpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin	

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Tricin (N-Tris-(Hydroxy-Methyl)-Methylglycin)		Biomol
Tris (Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan)		Biomol
Trenngel-Puffer („Low Tris Buffer“)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O	
Triton X-100		Merck
Triton-Lösung (Immunfluoreszenz)	0,2% Triton X-100 in PBS	
Tropix Western Star Detektions-kit		Nalgene
Tween-20		Merck

3.3 Antikörper

Alle folgenden beschriebenen monoklonalen Antikörper sind Maus- bzw. Ratten-IgG-Antikörper. Bei den polyklonalen Primärantikörpern handelt es sich ausschließlich um Kaninchen-IgG-Antikörper.

3.3.1 Monoklonale Antikörper

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten monoklonalen Primärantikörper

¹Angegeben ist die zur Immunpräzipitation von Proteinen (Kapitel 3.6.6.5) verwendete Verdünnung.

²Angegeben ist die zum immunchemischen Nachweis von Proteinen nach Western Blotting (Kapitel 3.6.6.4.1) verwendete Verdünnung.

³Angegeben ist die zum immunzytochemischen Nachweis von Proteinen (Kapitel 3.6.8) verwendete Verdünnung.

⁴Angegeben ist die Vertreiberfirma oder die Bezugsquelle des Antikörpers.

Bezeichnung	Zielprotein	IP ¹	WB ²	IF ³	IgG	Bezugsquelle ⁴
2A1	SH3-Domäne von SNX33	1:10	1:200	---	Ratte	Dr. E. Kremmer, München
β-Aktin	humanes β-Aktin	---	1:1000	---	Maus	Sigma
22C11	βAPP ₆₉₅	---	1:5000	---	Maus	Dr. Konrad Beyreuther
6C6	SNX9	---	1:100	---	Ratte	Dr. E. Kremmer, München
Dyn (Hudy 1)	Dynamamin 1	1 mg/ml	---	---	Maus	Upstate
6E10	Aβ (AS 1-17)	---	1:2000	---	Maus	Senetek Inc.
HA.11	HA-konjugiertes Protein	1:300	1:1000	---	Maus	Covance
W02	βAPP ₆₉₅	---	1 µg/ml	---	Maus	Dr. Konrad Beyreuther

3.3.2 Polyklonale Antikörper

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten polyklonalen Primärantikörper

¹Angegeben ist die zur Immunpräzipitation von Proteinen (Kapitel 3.6.6.5) verwendete Verdünnung.

²Angegeben ist die zum immunochemischen Nachweis von Proteinen nach Western Blotting (Kapitel 3.6.6.4.1) verwendete Verdünnung. AS: Aminosäure.

³Angegeben ist die zum immunzytochemischen Nachweis von Proteinen (Kapitel 3.6.8) verwendete Verdünnung.

⁴Angegeben ist die Vertreiberfirma oder die Bezugsquelle des Antikörpers.

Bezeichnung	Zielprotein	IP ¹	WB ²	IF ³	Bezugsquelle ⁴
67	SNX33	1:200	1:500	---	Eurogentec
3552	βAPP ₆₉₅	1:400	---	---	
5313	βAPP ₆₉₅ (AS 444-592)	---	---	1:300	Eurogentec (Walter <i>et al.</i> , 2000)
6687	βAPP ₆₉₅ (AS 676-695)	1:400	1:1000	---	Eurogentec (Walter <i>et al.</i> , 2000)
Akt	Akt/PKB	---	1:1000	---	Cell Signaling
Akt-P308	Phospho-Akt (Thr308)	---	1:1000	---	Cell Signaling
Akt-P473	Phospho-Akt (Ser473)	---	1:1000	---	Cell Signaling
Dyn	Dynamamin	---	1:1000	---	Cell Signaling
EEA1	Early endosomal antigen 1	---	---	1:300	BD Biosciences
IRS-1	Insulinrezeptor- Substrat 1	1:300	1:1000	---	Upstate
p85	PI3-Kinase p85- Untereinheit	---	1:1000	---	Upstate
192 wt	βAPP ₆₉₅ (AS 591-596)	---	1:100	---	Dr. D. Schenk (Seubert <i>et al.</i> , 1993)

3.3.3 Sekundärantikörper

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Angegeben ist der Name, Zielprotein und Wirtsspezies der verwendeten Sekundärantikörper. Außerdem ist die Verwendung mit entsprechender Verdünnung sowie die Bezugsquelle angegeben. AP: alkalische Phosphatase; HRP: Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“).

¹Angegeben ist die zum immunchemischen Nachweis von Proteinen nach Western Blotting (Kapitel 3.6.6.4.1) verwendete Verdünnung.

²Angegeben ist die zum immunzytochemischen Nachweis von Proteinen (Kapitel 3.6.8) verwendete Verdünnung.

Bezeichnung	Zielprotein	Wirtsspezies	Applikation	Verdünnung	Firma
Anti-mouse-AP	Maus IgG	Ziege	WB ¹	1:5000	Nalgene
Anti-mouse-HRP	Maus IgG	Ziege	WB ¹	1:10000	Promega
Anti-rabbit-Alexa488	Kaninchen IgG	Ziege	IF ²	1:1000	Invitrogen
Anti-rabbit-Alexa555	Kaninchen IgG	Ziege	IF ²	1:1000	Molecular Probes
Anti-rabbit-HRP	Kaninchen IgG	Ziege	WB ¹	1:10000	Promega
Anti-rat-HRP	Ratten IgG	Ziege	WB ¹	1:5000	Jackson Immuno Research

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Konstrukte und Klonierungen

3.4.1.1 Vektoren

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Angegeben ist die Bezeichnung der verwendeten Vektoren, sowie die Herstellerfirma bzw. Bezugsquelle und der Zielorganismus der Proteinexpression.

Bezeichnung	Firma/Quelle	Zielorganismus
L4440	Dr. Maren Hertweck	<i>E. coli</i>
peak 8	Edgebio	Säugerzellen
peak12	Edgebio	Säugerzellen
pGex 5X.1	Amersham Biosciences	<i>E. coli</i>

3.4.1.2 DNA-Konstrukte

Tabelle 8: Übersicht der hergestellten DNA-Konstrukte

Angegeben ist die Bezeichnung des Konstruktes, der Zielvektor sowie die Restriktionsenzyme, mit denen die gewünschte DNA-Sequenz in den Vektor eingefügt wurde bzw. die Herkunft des Plasmids. ATCC: American Type Culture Collection.

Bezeichnung	Vektor	Klonierungsenzyme
788-B8	peak8	cDNA-Bibliothek (Edgebio)
βAPP695	peak12	erhalten von S. Lichtenthaler
Dynamin	PCB1	erhalten von Marc Caron
Dyn-HA	peak12	HindIII; XbaI
GFP	peak12	HindIII; NotI
Linker (Kontrolle)	peak12	erhalten von Brian Seed
Ist-4	L4440	erhalten von Maren Hertweck
PKCα	peak12	HindIII; NotI
SNX1-HA	peak8	NcoI; XbaI
SNX9	pOTB	ATCC (ID 3832234)
SNX9-GST	pGex 5X.1	BamHI; NotI
SNX9-HA	peak12	HindIII; XbaI
SNX18-HA	peak12	EcoRI; XbaI
SNX33	peak12	HindIII; NotI
SNX33ΔSH3-GFP	peak12	HindIII; XbaI
SNX33ΔSH3-HA	peak12	HindIII; XbaI
SNX33-GFP	peak12	XbaI; NotI
SNX33-GST	pGex 5X.1	BamHI; NotI
SNX33-HA	peak12	HindIII; XbaI

3.4.2 Rekombinante DNA-Techniken

3.4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Reaktionsansatz:

1 µl der entsprechenden cDNA (ca. 1 µg/µl)

1 µl 5'-Oligonukleotid (fw; 100 µM)

1 µl 3'-Oligonukleotid (rw; 100 µM)

1 µl dNTP-Mix (10 mM)

1 µl Pwo-Polymerase (1U/µl)

5 µl Reaktionspuffer, komplett (10x)

mit dH₂O auf 50 µl Endvolumen auffüllen.

Die PCR-Ansätze wurden gemischt und in einem Thermocycler mit folgendem Programm prozessiert:

95 °C, 3 min

30 Zyklen:

95 °C, 30 sec

52 °C, 30 sec

72 °C, 2 min

72 °C, 10 min

Die Produkte der jeweiligen PCR wurden auf einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 3.4.2.3.1). Die gewünschten Fragmente wurden dann aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (Kapitel 3.4.2.3.2). Die so isolierte DNA wurde dann für die weitere Klonierung eingesetzt.

3.4.2.2 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 9: Beschreibung der klonierten Konstrukte

Angegeben ist der Name des neu klonierten Plasmids, die in der PCR verwendeten Oligonukleotide sowie die zur Klonierung verwendete cDNA.

Konstrukt	Oligonukleotid-Sequenzen	cDNA
p12-Dynamin-HA	<i>Dyn1 rattus HindIII fw lang</i> 5'- GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGG CAA CCG CGG CAT GGA AG-3' <i>DynK44A_XbaI_rev_Sue</i> 5'-GAG CTC TAG ACC GAG GTC GAA GGG GGG CCT GGG GCT C-3'	pCB1-Dynamin
p12-SNX1-HA	<i>SNX1-NcoI</i> 5'-GCT CCA CAA TGG CGT CGG GTG GTG GTG-3' <i>SNX1rev Xba neu</i> 5'-GTG CTC TAG AGA GAT GGC CTT TGC CTC AG-3'	pOTB-SNX1
p12-SNX18-HA	<i>SNX18_BamHI fw</i> 5'-GGA TCC CGT CAT GGA CCT ATT AGC-3' <i>SNX18 Xba rev new Sue</i> 5'-GAG CTC TAG ACC ATC ATA TCT AGC GGC TAA TG-3'	pCMV6XL4 SNAG1
p12-SNX33	<i>SNX788B8CTXba</i> 5'-GCT CTA GAC CGA GGT TGT CAT ACA TGC GCA G-3' <i>SNX788B8NTHind</i> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC ACT GAA AGG CCG-3'	p8-SNXB8
p12-SNX33-GFP	<i>GFPXbaI</i> 5'-CTA GTC TAG AGA TGG TGA GCA AGG GCG-3' <i>p12-Not</i> 5'-TGG ATG CAG GCT ACT CTA GGG-3'	p12-GFP
p12-SNX33-HA	<i>SNX788B8CTXba</i> 5'-GCT CTA GAC CGA GGT TGT CAT ACA TGC GCA G-3' <i>SNX788B8NTHind</i> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC ACT GAA AGG CCG-3'	p8-SNXB8

3. Material und Methoden

Konstrukt	Oligonukleotid-Sequenzen	cDNA
p12-SNX33-ΔSH3-HA	<i>SNX788B8ΔSH3-Hind-f</i> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC ACT GTC TGG CAT CAG CAC CAA CC-3' <i>SNX788B8CTXba</i> 5'-GCT CTA GAC CGA GGT TGT CAT ACA TGC GCA G-3'	p8-SNXB8
p12-SNX9-HA	<i>SNX9-Hind-F</i> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC CAC CAA GGC-3' <i>SNX9-Xba-R</i> 5'-TGC TCT AGA CCC ATC ACT GGA AAG CGG C-3'	pOTB7-SNX9
pGex-SNX9-GST	<i>SNX9_GST_BamHI_fw</i> 5'-GCA TCG GAT CCC CAT GGC CAC CAA GGC TCG G-3' <i>SNX9_GST_NotI_rev</i> 5'-TGC GGC CGG CCG CTC AAC ATC ACT GGA AAG C-3'	p12-SNX9-HA
pGex-SNX33-GST	<i>SNXB8_GST_BamHI_fw</i> 5'-GCA TCG GAT CCC CAT GGC ACT GAA AGG CGG <i>SNXB8_GST_NotI_rev</i> 5'-TGC GGC GGC CGC TCA GAG GTT GTC ATA CAT GC	p12-SNX33-HA

3.4.2.3 Reinigung und Analyse der DNA

3.4.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 1% -ige Agarosegele in TBE-Puffer und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/4 Volumen 4-fach DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1kb-DNA-Leiter (Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte bei 120V in TAE-Puffer in Agarosegelkammern.

3.4.2.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Agarosegel geschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem Nucleospin Extract Kit nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

3.4.2.3.3 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz). Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mit Hilfe des Programms „Blast 2 sequences“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) überprüft.

3.4.2.4 Enzymatische Modifikation der DNA**3.4.2.4.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen****Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme**

Angegeben ist der Name der verwendeten Enzyme, der Hersteller sowie die Aktivität der entsprechenden Restriktionsendonuklease.

Enzym	Hersteller	Aktivität
BamHI	MBI Fermentas	10U/ μ l
EcoRI	MBI Fermentas	10U/ μ l
HindIII	MBI Fermentas	10U/ μ l
NcoI	New England Biolabs	10U/ μ l
NotI	MBI Fermentas	10U/ μ l
SFII	New England Biolabs	20 U/ μ l
XbaI	MBI Fermentas	10 U/ μ l

Für analytische Ansätze nach Plasmidpräparationen wurden 0,5-1 μ g Plasmid-DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme in einem Endvolumen von 20 μ l für ca. 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Eine Analyse des DNA-Verdaus erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.4.2.3.1).

Für präparative Ansätze im Rahmen einer Klonierung wurden 1-2 μ g Plasmid-DNA oder ca. 5-10 μ g des entsprechenden PCR-Produktes in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Enzyme in einem Endvolumen von 30 μ l für 4 h inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter der Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits aufgereinigt (Kapitel 3.4.2.3.2).

3.4.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten DNA-Moleküle (Kapitel 3.4.2.4.1) wurden vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (SAP; 1 U/ μ l) entfernt, um intramolekulare Selbstligation zu verhindern (Sambrook J., 2001). Dafür wurden 1-2 μ g linearisierte Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 μ l für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte Plasmid-DNA unter der Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits aufgereinigt (Kapitel 3.4.2.3.2).

3.4.2.4.3 Ligation von DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments (Kapitel 3.4.2.4.1) in das linearisierte, dephosphorylierte Plasmid erfolgte unter der Verwendung der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4-Ligase, 5 U/ μ l). Ca. 200 ng

Plasmid, ca. 0,5 µg des entsprechenden DNA-Fragmentes, 5U T4-Ligase sowie der entsprechende Ligationspuffer wurden in einem Endvolumen von 20 µl 2-3 h bei RT inkubiert. Der komplette Ligationsansatz wurde zur Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen (Kapitel 3.4.2.5) verwendet.

3.4.2.5 Transformation von *E. coli* und Plasmidpräparation

3.4.2.5.1 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5α

100 ml SOB-Medium wurden mit einer *Escherichia coli* DH5α-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C/700 upm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur mit SOB-Medium in einem Volumen von 250 ml auf die OD 0,1 verdünnt und bei 18 °C/250 upm für 20-24 h inkubiert. Erreichte die Bakterienkultur eine OD von 0,6-0,8, wurde die Kultur auf fünf 50 ml-Falkon-Gefäßen aufgeteilt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C/3500 upm für 20 min. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 80 ml TB-Puffer resuspendiert (4 °C) und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C/3500 upm für 20 Minuten wurde das Pellet in 20 ml TB-Puffer (4 °C) gelöst und 1,5 ml DMSO (Endkonzentration: 7%) zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Aliquotierung der Bakteriensuspension in 200 µl-Aliquots bei 4 °C. Die Bakterienaliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.2.5.2 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms BL21

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21 wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml psi-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. 400 ml psi-Medium wurden mit ca. 3 ml der Übernachtskultur versetzt und bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Die Bakterienkultur wurde dann für 5 Minuten auf Eis gestellt, in 50 ml-Falkon-Röhrchen abgefüllt und bei 4 °C und 3000 upm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml Tfb1-Lösung resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 3000 upm für 5 min. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Tfb2-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension inkubierte 15 min auf Eis, wurde dann in 200 µl-Aliquots abgefüllt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der kompetenten BL21-Zellen erfolgte bei -80 °C.

3.4.2.5.3 Transformation des Ligationsproduktes in *E. coli*

20 µl des Ligationsansatzes sowie ein Ligations-Kontrollansatz ohne Insertion wurden mit je 100 µl DH5α bei 4 °C (auf Eis) 60 Minuten lang inkubiert. Die Bakterien wurden 1 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Es folgte eine 2-minütige Inkubation der Transformationsansätze auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium pro Ligationsansatz wurden die Bakterien 45 min bei 37 °C/700 upm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 min bei 8000 upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampizillin (LB/Amp) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Über Nacht wuchsen auf den Platten einzelne Kolonien, die am nächsten Tag für eine Minipräparation weiterverwendet wurden (Kapitel 3.4.2.5.5).

3.4.2.5.4 Glyzerinkulturen von Bakterienklonen

Einzelne Klone der LB/Amp-Platten wurden mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 3 ml LB-Medium + 100 µg/ml Amp über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 600 µl Bakteriensuspension mit 400 µl 50% -iger Glycerinlösung gemischt und bei -20 °C eingefroren. Alternativ wurden 600 µl Bakteriensuspension vor einer DNA-Maxipräparation aus dem Kolben entnommen und mit einer 50%-igen Glycerinlösung gemischt.

3.4.2.5.5 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präp)

5 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampizillin wurden mit einzelnen Bakterienklonen der ausgestrichenen LB/Amp-Platte (Kapitel 3.4.2.5.3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C/700 upm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine DNA-Mini-Präparation unter der Verwendung von Nucleospin-Säulen (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers.

Die aufgereinigte DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen auf positive Insertionen untersucht (Kapitel 3.4.2.4.1) und gegebenenfalls zur Sequenzierung geschickt (Kapitel 3.4.2.3.3).

3.4.2.5.6 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxi-Präp)

Eine 250 ml-Übernachtskultur eines *E. coli*-Klons wurde sedimentiert (7000 xg/15 min/4 °C). Die Lyse des Bakterienpellets sowie die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte unter der Verwendung des Nucleobond AX 500 Kits (Macherey-Nagel) nach den Angaben des

Herstellers. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab mit Restriktions-Endonukleasen verdaut (Kapitel 3.4.2.4.1).

3.4.3 Expressionsanalyse von SNX33 und β -Aktin

Für die Überprüfung des Expressionsmusters von SNX33 wurde ein Northern Blot-Experiment unter der Verwendung einer multiplen Gewebe Northern Blot Membran (MTN-Blot: „multiple tissue Northern Blot“) durchgeführt. Die dabei verwendete Membran ist kommerziell erhältlich (BD Biosciences).

Zur Durchführung des Experiments wurde zunächst eine SNX33-spezifische cDNA-Sonde hergestellt. Dafür wurden 9,6 μ g p12-SNX33-HA-Plasmid mit den Restriktionsenzymen SfiI und HindIII 90 min bei 37 °C und anschließend 30 min bei 50 °C verdaut. Die verdaute DNA wurde dann auf einem 1% -igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.4.2.3.1) und das SNX33-spezifische 660 bp-Fragment aus dem Gel eluiert (Kapitel 3.4.2.3.2). Die Menge der zu verdauenden DNA wurde so gewählt, dass letztlich eine Konzentration von ca. 25 ng/ μ l DNA im Eluat vorlag. Die so berechnete Konzentration der cDNA wurde dann mittels einer DNA bekannter Konzentration auf einem 1% Agarosegel überprüft. Das generierte SNX33-cDNA-Fragment repräsentiert den Bereich 1-648 der kodierenden Sequenz von SNX33 und wurde dann für die Herstellung einer SNX33-spezifischen Sonde für das MTN-Blot-Experiment eingesetzt.

Zu Beginn des Versuchs wurde die Hybridisierungslösung (BD Biosciences) in einem 60 °C-Wasserbad warm gestellt. Die Northern Blot-Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben, dabei zeigt die Oberfläche der Membran, welche die aufgetragene mRNA trägt, zur Innenseite des Hybridisierungsröhrchens. Der Hybridisierungsofen wurde auf 65 °C vorgeheizt, ein Heizblock wurde auf 95 °C vorgeheizt und die Radioaktivität α -[³²P]-dCTP (Amersham Biosciences) wurde bei RT aufgetaut. Es wurde ein Oligonukleotid-Mix und ein DNA-Mix vorbereitet, das Gesamtvolumen beider Ansätze betrug 50 μ l:

Oligonukleotid-Mix:

- 15 μ l Random Primer (Invitrogen)
- 2 μ l dGTP
- 2 μ l dATP
- 2 μ l dTTP

DNA-Mix:

1 µl cDNA (25 ng/µl)
22 µl dH₂O

Zum Start der Reaktion wurde der DNA-Mix 5 min bei 95 °C gekocht, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Oligonukleotid-Mix zum DNA-Mix pipettiert und 5 µl radioaktiv-markiertes α -[³²P]-dCTP zugegeben. Nach Zugabe von 1 µl Klenow-Polymerase (Random Primer DNA Labeling System) wurde der Reaktionsmix gevortext und abzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation der Reaktion bei 25 °C für 2 h. In der Zwischenzeit wurden 10 ml Hybridisierungslösung auf die MTN-Blot-Membran gegeben, die anschließend bei 65 °C im Hybridisierungsofen für 1-2 h inkubiert wurde. Nach Ablauf der zweistündigen Reaktion wurde der Reaktionsmix mit 5 µl Stopp-Puffer (Random Primer DNA Labeling System) versetzt, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Die so generierte radioaktiv-markierte Sonde wurde anschließend mit Hilfe von „Quick Spin Säulen“ (Roche) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die aufbereitete Sonde wurde dann 2 min bei 95 °C gekocht, kurz zentrifugiert und anschließend zur MTN-Blot-Membran in die Hybridisierungslösung pipettiert. Die Membran wurde über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungsofen mit der radioaktiv markierten Sonde inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran mit Hilfe einer Pinzette aus dem Hybridisierungsgefäß entfernt und in eine ca. 10 x 20 cm große Wanne gelegt. Die radioaktive Hybridisierungslösung des Hybridisierungsröhrchens wurde verworfen. Es folgte das Waschen der Membran mit 2x SSC + 0,1% SDS für 3 x 10 min bei RT, auch das Hybridisierungsgefäß wurde parallel mit 3 x 10 ml 2x SSC + 0,1% SDS bei 65 °C gewaschen. Die Membran wurde dann zurück in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und erneut 2 x mit 1x SSC + 0,1% SDS für je 20 min bei 65 °C gewaschen. Die Membran wurde in eine Folie gelegt und eingeschweißt, da ein Austrocknen des Blots unbedingt zu vermeiden ist, wenn man diesen häufiger verwenden möchte. Der Blot wurde in eine Filmkassette gegeben, ein sensitiver Röntgenfilm wurde aufgelegt und nach 24 h bzw. 5 Tagen Inkubation bei -80 °C entwickelt.

Die Durchführung des β -Aktin-MTN-Blot-Experiments wurde analog durchgeführt, jedoch wurde ein geeignetes β -Aktin-DNA-Fragment als Positivkontrolle mit dem kommerziellen MTN-Blot geliefert, so dass dessen Generierung nicht notwendig war. Ein β -Aktin-positives Signal konnte bereits 5 h nach dem Auflegen des Röntgenfilms detektiert werden.

3.5 Zellkultur und Zelllinien

3.5.1 Beschichtung von Kulturschalen mit Poly-L-Lysin

6 cm-Kulturschalen wurden vollständig mit Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt (3 ml) und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der Poly-L-Lysin-Lösung wurden die Schalen zweifach mit je 5 ml dH₂O (steril) gewaschen und getrocknet.

3.5.2 Kultivierung von Zellen

Es wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293E; human embryonic kidney), Affen-Nierenzellen (COS7) sowie humane Neuroblastomzellen des Zellklons SH-SY5Y bei 5% CO₂ und 37 °C in einem Inkubator kultiviert. Die unterschiedlichen Medien und Bedingungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Angegeben ist die Herkunft, die Bezugsquelle sowie verwendete Medien.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Firma
COS7	Affen-Nierenzellen	Grundmedium	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
HEK293E (stabil transfiziert mit EBNA1-Protein)	Humane embryonale Nierenzellen	Grundmedium	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzellen	Grundmedium	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion

Alle Zelllinien wurden in 10 cm-Zellkulturschalen in unterschiedlichen Verdünnungen ausgesät und im Inkubator gezüchtet. Wurden die Zellen konfluent, wurden sie mit 1,5 ml PBS (steril) gewaschen und anschließend mit 1,5 ml PBS/EDTA gelöst. Im Falle der SH-SY5Y-Zellen erfolgte eine Vereinzelnung der Zellen von der Kulturschale mittels 1,5 ml Trypsin-Lösung. Die so gelösten Zellen wurden dann in 5 ml Grundmedium aufgenommen und in ein 15 ml-Falkon-Gefäß gegeben. Diese Zellsuspension wurde dann in unterschiedlichen Verdünnungen mit Medium verdünnt und auf frische Zellkulturschalen für weitere Kultivierungen oder anstehende Experimente ausgesät.

3.5.3 Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA

Die entsprechenden Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten 24-Well-Platten bzw. in 6 cm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 60% kultiviert und mittels Lipofectamin 2000 (Invitrogen) unter der Verwendung von Transformationsmedium gemäß den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Pro Transfektion im 24-Well-Format wurden 0,5 µg DNA eingesetzt, 6 cm-Schalen wurden jeweils mit 3 µg DNA transfiziert. Im Falle einer transienten Transfektion wurde das Transfektionsmedium ca. 20 h nach Transfektion durch Grundmedium ersetzt und die Zellen 48 h nach Transfektion analysiert. Eine Auswertung der Zellen für Immunfluoreszenz wurde 24 h nach Transfektion durchgeführt.

3.5.4 Stabile Transfektion von HEK293- und COS7-Zellen

Für eine stabile Transfektion wurde die zu transfizierende DNA vor der Transfektion mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Das Antibiotikum Puromycin sowie das Antibiotikum Hygromycin wurden als Selektionsreagenz verwendet. Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden die entsprechenden Zellen auf unbeschichteten 24-Well-Platten ausgesät und anschließend mittels Lipofectamin 2000 transfiziert (Kapitel 3.5.3). 24 h nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, 48 h nach Transfektion erfolgte ein Ablösen der Zellen mittels PBS/EDTA. Abgelöste Zellen wurden dann in 6-Well-Platten umgesetzt, wobei dem Medium nun Puromycin und/oder Hygromycin zur Selektion beigelegt wurde. Die Zellen wurden anschließend vermehrt und auf Expression des exogenen Proteins mittels Western Blot Analyse getestet. Zur Herstellung stabiler Einzelklone wurde die stabile Zelllinie verdünnt (ca. 2 Zellen/100 µl) und 200 µl der Verdünnung in eine 96-Well-Platte transferiert. Nach ca. 1-2 Wochen wuchsen in einigen Wells stabile Einzelzellklone hoch, die dann auf die Expression des exogenen Proteins getestet wurden. Positive Klone wurden in 10 cm-Schalen ausgesät und mit Hilfe des Selektionsmediums weiterkultiviert.

3.5.5 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden konfluent gewachsene Zellen einer 10 cm-Zellkulturschale mit sterilem PBS-Puffer gewaschen, in 1,5 ml PBS/EDTA-Lösung abgelöst und mit 5 ml Grundmedium versetzt. Die Zellsuspension wurde in der Zentrifuge bei RT 5 min und 200 xg sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml frischem Einfriermedium resuspendiert und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kulturen wurden in speziellen Einfriergefäßen über Nacht bei -80 °C gefroren und anschließend bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.5.6 Nachweis der exogenen Proteinexpression in transfizierten Zellen

Transfizierte Zellen wurden mittels PBS/EDTA von einer 10 cm-Schale gelöst, mit 5 ml Grundmedium versehen und 5 min bei RT und 200 xg pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 800 µl Lysispuffer resuspendiert, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 13000 upm wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung (Kapitel 3.6.3.2) durchgeführt. 60 µl des Zelllysats wurden mit 20 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgekocht. Ca. 1/3 der Probe wurde auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Kapitel 3.6.6.1) und die Proteine im Western Blot nachgewiesen (Kapitel 3.6.6.4.1).

3.5.7 Übersicht über die genetisch veränderten Zelllinien

Tabelle 12: Übersicht über verwendete stabile Zelllinien

Angegeben ist der Name der jeweiligen Mutterzelllinie, das exogen exprimierte Protein, die entsprechenden Resistenzen zur Selektion sowie der Name und die Bezugsquelle der Linie.

AP: Alkalische Phosphatase; TNFR2: Tumor necrosis factor receptor 2.

Name	Mutterzelllinie	Exogen exprimiertes Protein	Resistenz	Bezugsquelle
AP-APP (SABC70)	HEK293E	AP-βAPP	Puromyzin/ Hygromyzin	(Lichtenthaler <i>et al.</i> , 2003)
AP-L-Selektin	HEK293E	AP-L-Selektin	Puromyzin/ Hygromyzin	(Lichtenthaler <i>et al.</i> , 2003)
AP-TNFR2	HEK293E	AP-TNFR2	Puromyzin/ Hygromyzin	(Lichtenthaler <i>et al.</i> , 2003)
COS/APP695	COS7	βAPP ₆₉₅ wt	Puromycin	Von Dr. Stefan Lichtenthaler zur Verfügung gestellt
HEK293/APP695	HEK293E	βAPP ₆₉₅ wt SNX33-HA	Puromyzin/ Hygromyzin	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

3.5.8 Transienter Knock-Down von Proteinen mittels siRNA

Für einen transienten Knock-Down von Proteinen wurde ein Ansatz gewählt, der auf der auf der Transfektion von siRNA (small interfering RNA) beruht. Die siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Alle bestellten Oligonukleotide wurden in RNase-freiem Wasser + RNAi-stabilisierendem Puffer (Dharmacon) gelöst, so dass eine 20 µM Stammlösung erhalten wurde. Tabelle 13 zeigt die Sequenzen der verwendeten RNAi-Oligonukleotide.

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten siRNA-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Gezeigt ist der Name des RNAi-Oligos, die Zielsequenz (in 5'3'-Orientierung) sowie die Position innerhalb der kodierenden Sequenz, an die das Oligonukleotid bindet.

Name	Sequenz (sense)	Zielregion (Bindungsstelle)
Kontrolle	UAGCGACUAAACACAUCAA	Non-targeting siRNA
SNX33-a	CCUCAACCGUUUCUCAUGCdTdT	Base 546 – 565
SNX33-b	GCACAUGAUGCAGAACUACdTdT	Base 1629 – 648
SNX33-pool	Mix aus 4 Oligonukleotiden; Sequenzen von Dharmacon nicht zur Verfügung gestellt	Zielregion(en) nicht bekannt
SNX9-b	CCUACUAACACUAAUCGAUdTdT	Base 999 - 1018

Für die Transfektion mit Lipofectamin wurden 5 ml HEK293E-Zellen ($3,5 \times 10^5$ Zellen/ml, entspricht $17,5 \times 10^5$ Zellen pro 6 cm-Schale) in poly-L-beschichtete 6 cm-Zellkulturschalen in Grundmedium ausgesät. 2 h nach dem Aussäen wurden die Zellen unter der Verwendung von Lipofectamin transfiziert. Pro 6 cm-Schale wurden 20 μ l Lipofectamin mit 250 μ l Transformationsmedium gemischt und 5 Minuten inkubiert. Parallel wurde in einem zweiten Reaktionsansatz 25 μ l einer 20 μ M RNAi-Oligonukleotid-Stammlösung (Endkonzentration: 100 nM) mit 250 μ l Transformationsmedium gemischt. Beide Ansätze wurden nach der 5-minütigen Inkubation gemischt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde anschließend auf die ausgesäten Zellen pipettiert. Am Morgen von Tag 2 wurde das Medium abgesaugt und durch 3 ml Grundmedium ersetzt. Zelllyse erfolgte an Tag 4 (Kapitel 3.6.1).

3.5.9 PMA-Stimulierung von Zellen

Um den Einfluss von PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Azetat) auf die Spaltung von β APP zu untersuchen, wurden Zellen im 24-well-Format ausgesät (250000 Zellen pro well). 2 Tage nach dem Aussäen wurden die Zellen 3 h mit 1 μ M PMA behandelt, Kontroll-behandelte Zellen wurden mit der gleichen Menge Ethanol behandelt. Anschließend wurde der Überstand der Zellen gesammelt, die Zellen lysiert (Kapitel 3.6.1) und analysiert.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Gewinnung von Gesamtproteinextrakten

Sämtliche Arbeitsschritte zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten erfolgten auf Eis. Zellen einer 6 cm-Kulturschale wurden zunächst mit 1,5 ml PBS gewaschen, das PBS wurde abgesaugt und anschließend wurden 800 μ l Lysispuffer auf die Zellen pipettiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers. Die so gelösten Zellen wurden anschließend in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine

Zentrifugation bei 4 °C/13000 upm für 5 min. Anschließend wurde der Proteinextrakt abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert, das Zellpellet wurde verworfen. Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus 24-Well-Platten wurden 500 µl PBS und 300 µl Lysispuffer verwendet, ansonsten erfolgten alle Arbeitsschritte wie oben beschrieben. Nach der Herstellung der Gesamtproteinextrakte erfolgte eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Proben mittels des BCA-Assays (Kapitel 3.6.3.2). Hergestellte Proteinextrakte wurden entweder umgehend weiter verarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Durchführung von Membranpräparationen

Zellen einer konfluenten 10 cm-Schale wurden mit PBS/EDTA abgelöst und bei 850 xg (3500 rpm) abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend 2x mit PBS und 2 x mit KSHM-Puffer gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wurde in KSHM resuspendiert, die Menge entsprach in etwa dem 1-2-fachen Volumen des Zellpellets. Die Resuspension wurde dann in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und anschließend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Dieser Vorgang wurde erneut wiederholt und die Zellen 5 min bei 850 xg abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet stellt die Membranfraktion dar und wurde in Lysispuffer resuspendiert. Der verbleibende Überstand repräsentiert die Zytosolfraktion und wurde anschließend bei 40000 rpm (70000 xg) für 30 min bei 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der resultierende Überstand repräsentiert die Zytosolfraktion.

3.6.3 Ermittlung der Proteinkonzentration

3.6.3.1 Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde die Gesamtproteinmenge mit Hilfe des Protein Assay Kits (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Proteinlysate wurde in der Regel 1:100 mit Lysispuffer verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden dann mit 200 µl einer 1:4-Mischung aus Protein Assay Kit und dH₂O in eine 96-Well-Platte pipettiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm, so dass für eine Western Blot-Analyse äquivalente Mengen unterschiedlicher Proben geladen werden konnten.

3.6.3.2 Proteinkonzentration nach dem Bicinchonic Acid Assay (BCA-Assay)

Je 10 µl eines Proteinlysats wurden in Doppelwerten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Je 200 µl einer 1:50-Verdünnung aus BCA-Reagenz B und -A (Uptima, Interchim) wurden mit

Hilfe einer Multi-Kanal-Pipette auf die vorgelegten Proteinlysate pipettiert. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden zusätzlich Verdünnungen einer BSA-Standardlösung zwischen 0 µg/ml und 2 µg/ml in einer Einfachbestimmung angesetzt und ebenfalls mit dem BCA-Reagenz-Mix versetzt. Die 96-Well-Platte wurde anschließend 25 min bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 562 nm. Nach Extrapolation der Eichkurve konnte eine Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben erfolgen.

3.6.4 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Herstellung monoklonaler Sorting Nexin-Antikörper erfolgte die Aufreinigung von SNX33-GST bzw. SNX9-GST. Kompetente *E. coli* BL21-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 60 µl der Zellsuspension wurden mit ca. 2 µg des gewünschten pGex-Plasmids versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90 sec Hitzeschock der Zellsuspension bei 42 °C wurden die Zellen mit 800 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Etwa 200 µl dieser Suspension wurden anschließend auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro GST-Konstrukt vier Klone gepickt um damit je 5 ml LB-Amp-Medium anzupflegen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 200 upm. Am Folgetag wurden die Bakterienkulturen in LB-Medium verdünnt, dass eine OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 in 1 ml Volumen erreicht wurde. Pro gepicktem Klon wurden dafür zwei Kulturen angesetzt. Einer dieser Ansätze wurde dann mit 1 µM 0,1 M IPTG versetzt, beide Ansätze wurden bei 37 °C und 200 upm 4 h inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei RT und 13000 upm für 1 min, die Überstände wurden verworfen und das Bakterienpellet in 60 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Es folgte eine Inkubation der Proben auf dem Thermoschüttler bei 95 °C für 5 min. Die Proben wurden 1 min bei RT und 13000 upm zentrifugiert, 10 µl des Überstandes wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (Kapitel 3.6.6.1). Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt und nach anschließender Entfärbung des Gels (Kapitel 3.6.6.3) konnten die aufgetragenen Klone auf die Expression der GST-Konstrukte überprüft werden.

400 ml LB/Amp-Medium wurden dann mit einem Klon guter Expression angeimpft und bei 37 °C und 200 upm inkubiert. In der Regel erfolgte bei dem Erreichen der OD₆₀₀ eine Induktion mit 0,1 mM IPTG (Endkonzentration), im Fall der SNX33-GST-Aufbereitung wurde dieser Schritt allerdings weggelassen, um die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, sogenannte „inclusion bodies“, zu vermeiden. Die Kulturen wurden weitere 4 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert und anschließend bei 4 °C und 5000 upm für

15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden oder aber direkt weiterverarbeitet werden.

Die Bakterienpellets wurden in 10 ml PBS mit zugesetztem Proteinaseinhibitor (pI; 1:500) resuspendiert und mit 500 μl Lysozymlösung versetzt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Die Zellen wurden 5x für je 30 sec bei 30% Amplitude sonifiziert und anschließend 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 10000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml-Falkongefäß überführt und mit eiskaltem PBS + pI auf ca. 45 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 5 ml GSH-Sepharose zugegeben und 2 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3500 upm für 5 min wurde der Überstand verworfen, die immobile Phase in ein 15 ml-Falkongefäß überführt und 6x mit je 10 ml eiskaltem PBS + pI gewaschen. Für die Antigen-Herstellung wurde die Sepharose in 5ml PBS + PI resuspendiert und auf eine Poly-Prep Chromatographie Säule (Biorad) geladen. Es folgte ein Äquilibrieren der Sepharose mit 2x 5ml 50 mM Tris (pH 8,0). Für die Elution der GST-Fusionsproteine wurden 10 ml Elutionspuffer (8 M Harnstoff) auf die Säule gegeben und das Eluat in 10 Fraktionen à 1 ml in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Es folgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Kapitel 3.6.3.1). Die Reinheit des Fusionsproteins wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.6.1) und anschließender Coomassie-Färbung (Kapitel 3.6.6.3) bestimmt.

3.6.5 SNX33-Antikörper-Generierung

Die Generierung des polyklonalen SNX33-67-Antikörper (67) wurde bei der Firma Eurogentec (Seraing; Belgien) in Auftrag gegeben. Für die Herstellung dieses Antikörpers wurden zwei Kaninchen mit folgendem Peptid immunisiert:

EP031167: $\text{H}_2\text{N-FRP KPP LER QDS LAS C-CONH}_2$ (16 AS; AS 158-172 von SNX33)

Das Peptid bindet in der Region zwischen der SH3- und PX-Domäne von SNX33. Zur Gewinnung des Antikörpers wurde das synthetische Peptid an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gebunden und das Produkt zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die finale Blutung („final bleeds“) beider Hasen wurde vereinigt und über Affinitätschromatographie mit dem Antigen EP031167 aufgereinigt. Die Kopplung des Peptids, die Immunisierung sowie die Gewinnung des Antiserums wurden von der Firma Eurogentec durchgeführt.

Die Herstellung der monoklonalen Ratten-Antikörper SNX33-2A1 und SNX9-6C6 wurden von Frau Dr. Elisabeth Kremmer unter der Verwendung von GST-Fusionsproteinen durchgeführt.

3.6.6 Nachweis von Proteinen

3.6.6.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer molekularen Größe aufzutrennen erfolgte eine eindimensionale Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen. Für die SDS-PAGE wurde das Mini-Gelsystem von Biorad verwendet, welches einen Sammelgelbereich von ca. 1 cm sowie einen Trenngelbereich von ca. 7 cm aufweist. Es wurden ausschließlich Gele mit 15 Probenaschen mit einer Kamm-Dicke von 1,5 mm verwendet. Vor der Verwendung wurden die Glasplatten mit 70% -igem Ethanol von Rückständen befreit, das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren (ca. 15 min) wurde das Isopropanol abgekippt, der über dem Trenngel befindliche Raum mit saugfähigem Papier getrocknet, mit Sammelgel befüllt und ein Kamm eingefügt. Nach dem vollständigen Aushärten des Sammelgels (ca. 15-20 min) wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer befüllt und die Taschen des Gels wurden mehrmals damit gespült. Proteinextrakte wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht und nach dem Abgleich der Proteinkonzentrationen auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 7 µl „See Blue Plus 2“ (Invitrogen) geladen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 90V und nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 140V.

Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist in Tabelle 14 angegeben. Ansteigende Acrylamidkonzentrationen führen zu einer höheren Vernetzung des Gels und erlaubt somit eine verbesserte Auftrennung von kleinen Proteinen. Wenn nicht anders angegeben, wurden 8% -ige Gele verwendet, die SNX33, welches ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa aufweist, gut auftrennen.

Tabelle 14: Zusammensetzung von 8%- und 12% -igen SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die angegebenen Mengen reichen für je 2 Minigele (1,5 mm).

Trenngel	8% Gel	12% Gel
H₂O	7,8 ml	6 ml
30% Acrylamid	4,2 ml	6 ml
Trenngelpuffer	4,0 ml	4 ml
10% APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl
Sammelgel		
H₂O	6,5 ml	6,5 ml
30% Acrylamid	1,2 ml	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
10% APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl

3.6.6.2 Tris-Tricin-Gele zur Trennung von Peptiden mit geringem Molekulargewicht

Für die Auftrennung von niedermolekularen Peptiden (zum Beispiel Aβ) wurden Tris-Tricin-Gele nach der Methode von Schagger und Jagow (Schagger and von Jagow, 1987) verwendet. Für die Auftrennung von Proteinen im Tris-Tricin-Gel wurde ebenfalls das Mini-Gelsystem von Biorad verwendet. Es wurden ausschließlich Gele mit 15 Probenaschen mit einer Kamm-Dicke von 1,5 mm verwendet.

Mit der Ausnahme, dass das Trenngel noch vor dem Aushärten mit dem Spacergel überschichtet wurde, wurden die Tris-Tricine Gele wie unter Kapitel 3.6.6.1 beschrieben gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde auf der Seite der Anode mit Anodenpuffer befüllt, auf der Seite der Kathode mit Kathodenpuffer. Die Probenvorbereitung erfolgte wie unter Kapitel 3.6.6.1 beschrieben, die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 80V, nach dem Eintreten der Proteine in das Trenngel bei 120V. Die Zusammensetzung von Sammel-, Spacer- und Trenngel ist in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Tris-Tricin-Gele

Angegeben ist die Mengen für 2 Minigele bei einer Kammdicke von 1,5 mm.

	Trenngel (16,5%)	Spacergel (10%)	Sammelgel (4%)
dH₂O	---	3,5 ml	4,2 ml
Acrylamid-Lösung	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Gelpuffer	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml
Glyzerol-Lösung	3,5 ml	---	---
TEMED	3,25 µl	4 µl	5 µl
APS	32,5 µl	35 µl	25 µl

In einigen Ausnahmefällen wurden auch kommerzielle Gele (Invitrogen) anstelle der selbst gegossenen Gele nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt.

3.6.6.3 Coomassie-Blue-Färbung und Entfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zum Proteinnachweis durch Coomassie-Färbung wurde das SDS-Gel direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese 15 min bei RT in Färbelösung geschüttelt und anschließend ca. 4-6 h mit Entfärbelösung bei RT entfärbt, bis der Gel-Hintergrund klar wurde. Die entfärbten Gele wurden 2 h bei 60 °C auf einem Gel-Trockner getrocknet und aufbewahrt.

3.6.6.4 Transfer und immunchemischer Nachweis von Proteinen

3.6.6.4.1 Standardprotokoll zur Proteinanalyse im Western Blot

Nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.6.1) wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Transfer Membran Milipore) übertragen. Vor dem Transfer ist eine Aktivierung der Membran durch 10 sec Inkubation in Isopropanol notwendig. Nach der Aktivierung wurde die Membran kurz mit VE-Wasser gespült und in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurde das Mini-Gel-Transfersystem von Biorad verwendet.

Transferaufbau:

- Anodenplatte
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- zwei Lagen Gel Blotting-Papier (Whatman; Schleicher & Schuell) in Transfer-Puffer äquilibriert
- PVDF-Membran mit Isopropanol aktiviert und in Transfer-Puffer äquilibriert
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- zwei Lagen Gel Blotting-Papier (Whatman; Schleicher & Schuell) in Transfer-Puffer äquilibriert
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- Kathodenplatte

Der Transfer erfolgte bei konstantem Stromfluss von 400 mA für 60 min bei RT. Nach erfolgtem Transfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 30 min bei RT in Blockierlösung geschüttelt. Die so vorbehandelte Membran wurde 2 x mit PBST gewaschen und 2 x 5 min mit PBST auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein Waschen der Membran für 3 x 10 min mit PBST. Der entsprechende HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde anschließend für 45 min bei RT auf die PVDF-Membran gegeben. Schließlich wurde erneut viermal je 5 min mit PBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte unter der Verwendung der ECL (enhanced chemoluminescence) Technik (ECLTM Western Blotting Detection Reagent; Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers unter der Verwendung von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji). Zum Nachweis schwacher Signale wurde das ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) verwendet.

3.6.6.4.2 Transfer und immunochemischer Nachweis von A β

Für den immunochemischen Nachweis von A β -Peptiden wurde anstelle der PVDF-Membran eine Nitrocellulose-Membran verwendet (Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schuell). Eine Aktivierung der Nitrocellulose-Membran mittels Isopropanol ist in diesem Fall nicht notwendig, ansonsten erfolgte der Transferaufbau und der Transfer wie unter Kapitel 3.6.6.4.1 beschrieben. Unmittelbar nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran 5 min in PBS-Puffer gekocht und anschließend 60 min bei RT in I-Block-Reagenz zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf dem Schüttler inkubiert. Die so vorbehandelte Membran wurde anschließend über Nacht mit dem Primärantikörper (6E10, SENETEC, 1:2000) bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Der entsprechende Anti-Maus-Alkalische-Phosphatase-konjugierte Zweitantikörper wurde ebenfalls in I-Block verdünnt (1:5000) und für 60 min bei RT auf die schüttelnde Membran gegeben. Es folgte erneut 3-maliges Waschen der Membran für je 10 min mit PBST, sowie 2 5-minütige Waschschrte mit 1 x Assay-Puffer (TROPIX-Western Star Kit; Nalgene). Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte unter der Verwendung des TROPIX-Western Star Kits (Nalgene) nach Angaben des Herstellers sowie unter der Verwendung von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji).

3.6.6.5 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen

Zur Anreicherung eines gewünschten Proteins aus einem Gesamtproteinextrakt (Kapitel 3.6.1) wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen das gewünschte Protein an einen entsprechenden Antikörper bindet, der seinerseits an eine immobile Phase anhaftet. Im Falle polyklonaler Antikörper wurde ProteinA-Sepharose (PAS) verwendet, bei monoklonalen Antikörper wurde ProteinG-Sepharose (PGS) eingesetzt. Sowohl PAS als auch PGS wurden vor Gebrauch 3x in PBS-Puffer gewaschen. Vor der eigentlichen IP wurde das Gesamtzelllysats mit 30 μ l immobilierter Phase versetzt und 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgte Zentrifugation bei 4 °C/8000 upm für 3 min und der Transfer des Zelllysats in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß. Auf diese Weise kann man Proteine, die unspezifisch an die immobile Phase binden, entfernen („Preclearing“). Der so gereinigte Überstand wurde dann mit dem entsprechenden Antikörper versetzt (Tabelle 4 und 5) und es wurden erneut 30 μ l der immobilisierten Phase hinzupipettiert. Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler.

Die Zelllysate wurden am nächsten Morgen bei 4 °C/8000 upm für 3 Minuten zentrifugiert. Es folgte ein Waschen der immobilisierten Phase mit 1 ml Sten-NaCl-Puffer, 1 ml Sten-SDS-Puffer sowie 1 ml Sten-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift wurden Pufferreste mit Hilfe einer Hamilton-Spritze entnommen, die immobile Phase mit 15 μ l 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend abzentrifugiert (13000 upm/30 sec). Die Proben wurden dann auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen (Kapitel 3.6.6.1) und auf einen Western Blot transferiert (Kapitel 3.6.6.4.1).

3.6.6.6 Immunpräzipitation von A β

Zur Immunpräzipitation von A β wurden β APP-überexprimierende Zellen (6 cm-Zellkulturschalen) verwendet, deren Überstand in der Regel 48 h nach Transfektion für eine A β -IP abgenommen wurde. 1 ml des Überstands wurde bei RT/13000 upm für 1 min zentrifugiert und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Eine Reinigung des Überstandes („Preclearing“) zur Vermeidung unspezifischer Bindung von Proteinen an PAS wurde durchgeführt, indem 30 μ l PAS zugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C für 60 min. Anschließend wurde die immobile Phase abzentrifugiert (8000 upm, 3 min) und der geklärte Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Pro Probe wurden ca. 800 μ l Überstand für die A β -Immunpräzipitation eingesetzt, wobei die eingesetzten Mengen anhand der Proteinkonzentrationsbestimmung des Gesamtzelllysats (Kapitel 3.6.1) berechnet wurden. Die A β -Immunpräzipitation erfolgte über

Nacht bei 4 °C unter der Verwendung des 3552-Antikörper (1:400) sowie mit 30 µl PAS pro Ansatz. Am nächsten Morgen wurden die PAS bei 4 °C/8000 upm für 3 min zentrifugiert und mit je 1 ml Sten-NaCl-Puffer, Sten-SDS-Puffer und Sten-Puffer gewaschen. Der verbleibende Pufferrest wurde vollständig mit einer Hamiltonspritze entfernt und die Proben mit 15 µl 4x Probenpuffer versetzt. Nach dem Aufkochen der Proben bei 95 °C für 5 min erfolgte eine kurze Zentrifugation (13000 upm/30 sec, RT) und das Laden auf ein Tris-Tricin-Gel (Kapitel 3.6.6.2).

3.6.7 Analyse zellulärer Transportmechanismen

3.6.7.1 βAPP-Antikörper-Endozytose-Experiment

Zur Durchführung des βAPP-Antikörper-Endozytose-Experiments wurden COS-Zellen der Dichte $1,5 \times 10^5$ auf Glasplättchen (Ø 10 mm) ausgesät und mit Wildtyp βAPP695 sowie dem gewünschten Konstrukt (C-terminal-konjugiertes SNX33-GFP bzw. SNX33-ΔSH3-GFP bzw. GFP) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit eiskaltem PCM gewaschen und 20 min auf Eis mit dem AK 5315 (1:200 in PCM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PCM gewaschen. PCM wurde dann durch auf 37 °C vorgewärmtes Grundmedium ersetzt und die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll fixiert und für die Immunfluoreszenz-Analyse vorbereitet (Kapitel 3.6.8), dabei wurde ein Alexa555-gekoppelter Sekundärantikörper (Tabelle 6) eingesetzt. Alexa555 emittiert nach Anregung mit 553 nm Fluoreszenz bei 568 nm und erscheint deshalb als rotes Fluoreszenzsignal.

3.6.7.2 Transferrin-Internalisierungs-Experiment

Für das Transferrin-Internalisierungs-Experiment wurden COS-Zellen der Dichte $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml auf Glasplättchen (Ø 10 mm) ausgesät (500 µl/Glasplättchen) und mit dem gewünschten Konstrukt (C-terminal-konjugiertes SNX33-GFP bzw. SNX33-ΔSH3-GFP bzw. GFP) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS (steril) gewaschen und 1 h in Serum-freiem Minimalmedium bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und nach Zugabe von 300 µl Endozytosemedium wurden die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann sofort auf Eis gestellt, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Fixierung und Aufbereitung der Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll

(Kapitel 3.6.8), jedoch ist in diesem Fall keine Behandlung mit einem Fluorophor-konjugiertem Sekundärantikörper nötig, da das hier verwendete Transferrin bereits mit dem Fluorophor Alexa 555 konjugiert ist.

3.6.7.3 Biotinylierung von Oberflächenproteinen

HEK293-Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten 6 cm Schalen (Kapitel 3.5.1) bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert, auf Eis gestellt und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Biotinlösung (0,5 mg/ml EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS) bedeckt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit je 3 ml Glycin-Lösung, wobei die Glycin-Lösung des letzten Waschschrittes 15 min auf den Zellen gelassen wurde, um ungebundenes Biotin abzusättigen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 3 ml eiskaltem PBS wurden 2 ml vorgewärmtes Grundmedium auf die Zellen gegeben und für die entsprechenden Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann umgehend auf Eis gestellt und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgte eine dreimalige Inkubation der Schalen mit 2 ml („Cleavage buffer“) für je 15 min. Proben, deren Oberflächen-Biotinylierung nicht entfernt werden sollte, wurden in dieser Zeit parallel mit PBS inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 15 min in PBS inkubiert. Die Zellyse und die Gesamtproteinextraktgewinnung erfolgten wie unter Kapitel 3.6.1 beschrieben. Zum Nachweis von biotinylierten Proteinen wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dafür wurde das Zellysate mit 30 µl Streptavidin Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) versetzt und 2 h bei 4 °C bzw. über Nacht auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose-Beads wurden anschließend bei 4 °C/8000 upm für 3 min zentrifugiert und mit jeweils 1 ml Sten-NaCl-Puffer, Sten-SDS-Puffer und Sten-Puffer gewaschen. Der verbleibende Puffer wurde mit einer Hamiltonspritze vollständig entfernt, die Sepharose-Beads mit 15 µl 4x Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min aufgekocht. Nach einer Zentrifugation bei RT/13000 upm für 30 sec wurden die Proben auf einem 8% -igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Kapitel 3.6.6.1) und im Western Blot analysiert (Kapitel 3.6.6.4.1).

3.6.8 Herstellung und Auswertung eines Immunfluoreszenz-Präparates

Zur Herstellung von Immunfluoreszenz-Präparaten wurden COS-Zellen auf Deckgläsern mit einem Durchmesser Ø 10 mm in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät, transfiziert (Kapitel 3.5.3) und bis zu einer Konfluenz von 50-60% kultiviert. Die Zellen wurden dreimal

mit je 1 ml PBS-Puffer auf Eis gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen auf Eis in 500 µl Fixierlösung für 30 min. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml PBS-Puffer wurden die Zellen 10 min in Ammoniumchlorid-Lösung inkubiert und erneut zweimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann 2 min in Tritonlösung inkubiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Es folgte 10-minütiges Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen, indem die Deckgläschen in 500 µl Blockmedium inkubiert wurden. Falls nötig, wurden die Zellen dann mit dem Erstantikörper behandelt, der – verdünnt in Blockmedium – mindestens 30 min inkubiert wurde. Anschließend wurden die Plättchen dreimal in PBS gewaschen und für mindestens 20 min mit dem Zweitantikörper behandelt, der ebenfalls in Blockmedium verdünnt wurde. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Deckgläser kurz in H₂O bidest. getaucht, die Rückseite der Gläschen auf einem Papiertuch abgetropft und die Deckgläser in Moviol-Lösung auf Objektträgern eingebettet. Das Deckglas wurde dabei mit der Zellseite nach unten auf den Objektträger gelegt. Nach ca. 30-minütiger Aushärtung erfolgte eine Analyse der Präparate unter der Verwendung eines Zeiss Axioskop2 plus Mikroskops, ausgestattet mit einem 63x/1.25-Objektiv sowie Standard FITC und TRITC-Fluoreszenz-Filtern. Bilder der präparierten Zellen wurden mit Hilfe der Zeiss AxioCam HRm-Kamera sowie der Metaview Imaging Software (Universal Imaging Corp.) aufgenommen und ausgewertet.

Im Falle des Transferrin-Endozytose-Versuchs ist keine Behandlung der Zellen mit einem Fluoreszenz-markiertem Zweitantikörper notwendig, weshalb die Zellen bereits nach der Behandlung mit Ammoniumchlorid-Lösung und zweimaligem Waschen der Deckgläser mit PBS-Puffer in Moviol eingebettet wurden.

3.6.9 Funktionelle Analyse von SNX33

3.6.9.1 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurden AP-APP-Zellen in poly-L-Lysin-beschichteten 24-Well-Platten ausgesät und mit den gewünschten cDNAs transfiziert (Kapitel 3.5.3). Die AP-APP-Reporterzelllinie exprimiert βAPP, welches N-terminal an sekretorische alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Zur Bestimmung der Menge an sekretiertem βAPP wurde das Medium der Zellen 48 h nach Transfektion abgenommen und bei RT/13000 upm 1 min zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden dann in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 30 min bei 65 °C inkubiert, um eine Hitzeinaktivierung endogener alkalischer Phosphatase zu erlangen. Die in dem Reportersystem überexprimierte Alkalische Phosphatase hingegen ist hitzestabil und wird dabei nicht Hitze-

inaktiviert. Anschließend wurden die Überstände bei RT/13000 upm für 30 sec zentrifugiert. Je 20 µl einer Probe wurden dann in Doppelwerten in eine 96-Well-Platte (Nunc) pipettiert und mit 200 µl Substratpuffer versetzt. Die Absorbionsmessung der Farbreaktion erfolgte bei 405 nm zu mehreren unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die 96-Well-Platte dabei bei RT aufbewahrt wurde. Als Nullwert wurde der Hitze-inaktivierte Überstand von nicht-transfizierten HEK293-Zellen verwendet, als Kontrolle wurde der Überstand von AP-APP-Zellen verwendet, die mit einem leeren Kontrollplasmid transfiziert worden sind.

Parallel zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität der Proben wurden Gesamtzellextrakte hergestellt (Kapitel 3.6.1) und die Proteinkonzentration der Proben mittels des BCA-Assay-Kits bestimmt (Kapitel 3.6.3.2). Die gemessenen alkalischen Phosphatase-Aktivitäten wurden dann auf die zugehörige Proteinkonzentration des Gesamtzellextrakts normiert und graphisch dargestellt.

3.6.9.2 Dephosphorylierung von SNX33

HEK293-Zellen wurden in PolyL-Lysin-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät, mit SNX33-HA transfiziert (Kapitel 3.5.3) und Gesamtproteinextrakte wurden hergestellt (Kapitel 3.6.1). Das Zelllysate wurde zur Reinigung und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 30 min mit ProteinA-Sepharose inkubiert („Preclearing“), 5 min bei 4 °C/13000 upm zentrifugiert und der Überstand für eine Immunpräzipitation unter der Verwendung eines HA-Antikörpers (Tabelle 4) und PAS eingesetzt. Der Ansatz wurde 5 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Immunpräzipitation wurde mit je 1 ml Sten-NaCl-Puffer, Sten-SDS-Puffer und Sten-Puffer gewaschen (Kapitel 3.6.6.5), es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml alkalischem Phosphatase-Puffer („SAP-Puffer“). Der Waschpuffer wurde vollständig entfernt und die Sepharose-Beads mit 400 µl 1x SAP-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde gründlich gevortext und in zwei Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt. In eines der Reaktionsgefäße wurden dann 3 µl alkalische Phosphatase (SAP; 1 U/µl;) gegeben, wohingegen das zweite Eppendorfgefäß nicht mit SAP versetzt wurde (Kontrolle). Beide Ansätze wurden über Nacht auf einem Thermoschüttler bei 37 °C/1100 upm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die PAS bei 4 °C/8000 upm für 3 min zentrifugiert, mit 15 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf ein 8% -iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen (Kapitel 3.6.6.1), aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse (Kapitel 3.6.6.4.1) unter der Verwendung eines HA-Antikörpers (Tabelle 4) analysiert.

Die Ergebnisse der Akt-Phosphorylierung sowie der PI3-Kinase-Aktivitätsbestimmung (Kapitel 3.6.9.3 und 3.6.9.4) wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, sind jedoch nicht gezeigt. Da diese Daten jedoch auch in Kapitel 5 erwähnt und diskutiert werden, ist die Durchführung der Experimente im Material- und Methoden-Kapitel enthalten.

3.6.9.3 Insulin-Stimulierung und Akt-Phosphorylierung

HEK293-Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät, transfiziert und bei einer Konfluenz von ca. 80-90% (in der Regel 3 Tage nach dem Aussäen der Zellen) einer Insulin-Stimulierung unterzogen. Dafür wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt und nach einmaligem Waschen mit Minimalmedium mit 2 ml Minimalmedium bei 37 °C für 3-4 h im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen. Es folgte eine Inkubation der Zellen in 2 ml Minimalmedium + 1 µM Insulin für 5 min bei 37 °C. Kontrollzellen, die nicht mit Insulin stimuliert werden sollten, wurden in dieser Zeit mit Minimalmedium + 0,012 µM HCl inkubiert, das entspricht der HCl-Konzentration, in der 1 µM Insulin gelöst ist (Stammlösung: 861 µM Insulin in 0,01 M HCl). Die Zellen wurden danach umgehend auf Eis gestellt, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Herstellung eines Gesamtproteinextrakts (Kapitel 3.6.1) sowie eine Proteinkonzentrationsbestimmung (Kapitel 3.6.3.2). Zur Bestimmung der Akt-Phosphorylierung wurden die Proben auf einem 12% -igen SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 3.6.6.1) und die Proteine mittels Western-Blot-Analyse (Kapitel 3.6.6.4.1) unter der Verwendung Phospho-Akt-spezifischer Antikörper (Tabelle 5) nachgewiesen. Insulin-stimulierte Proben wurden in der Regel umgehend weiterverarbeitet, ansonsten erfolgte eine Aufbewahrung bei -20 °C.

3.6.9.4 Phosphatidyl-Inositol-3-(PI3)Kinase-Experiment

Das PI3-Kinase-Experiment beruht auf der Tatsache, dass nur aktive PI3-Kinase an Membranen lokalisiert ist und nur nach einer Aktivierung an das phosphorylierte Insulinrezeptorsubstrat (IRS) binden kann (Abb. 11). Zur Überprüfung der Menge an aktiver PI3-Kinase in HEK293-Zellen wurde zunächst eine Insulinstimulierung durchgeführt (Kapitel 3.6.9.3). 60 µl des Zelllysats wurden mit 20 µl 4x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C aufgeköcht, das verbleibende Zelllysat wurde umgehend für eine Immunpräzipitation gegen IRS unter der Verwendung von PAS eingesetzt (Tabelle 5). Die dabei einzusetzenden Mengen wurden mit Hilfe der zuvor ermittelten Proteinkonzentrationsbestimmung berechnet. Die Immunpräzipitation erfolgte bei 4 °C für 4 h, anschließend wurden die Proben bei

4 °C/8000 upm für 3 min zentrifugiert und mit Sten-NaCl-Puffer, Sten-SDS-Puffer und Sten-Puffer gewaschen. Die so gewaschenen Sepharose wurde dann 5 min bei 95 °C in 15 µl 4x Probenpuffer aufgekocht (Kapitel 3.5.6), auf ein 8% -iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.6.6.1). Es folgte ein immunchemischer Nachweis mittels Western Blot Analyse. Für die Detektion wurde der p85-Antikörper verwendet (Tabelle 5). p85 ist eine Untereinheit der PI3-Kinase und interagiert mit phosphoryliertem IRS, weshalb eine IP gegen IRS mit anschließender Western Blot Analyse gegen p85 als ein Maß für aktivierte PI3-Kinase verwendet werden kann. Zusätzlich wurde das in Probenpuffer aufgekochte Gesamtzelllysat auf die Gesamtmenge von p85 mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse untersucht, dafür ist keine vorangeschaltete Immunpräzipitation nötig.

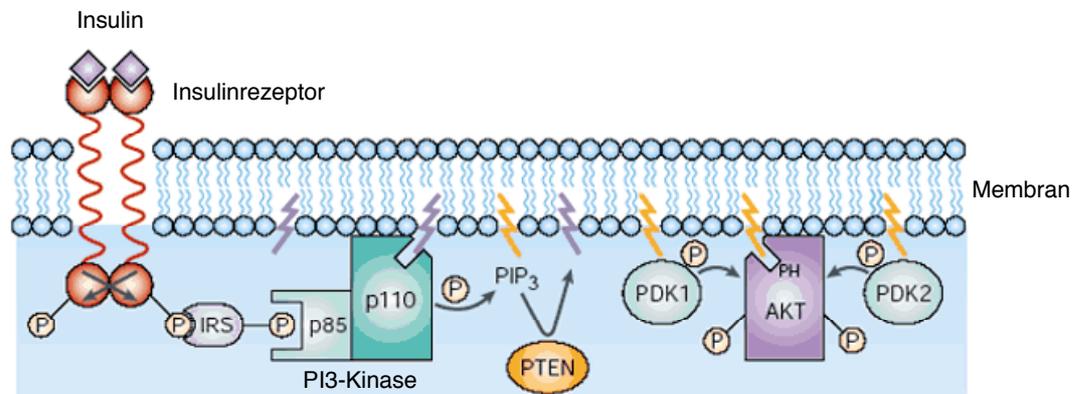


Abbildung 11: Prinzip des PI3-Kinase-Experiments

Nach einer 5-minütigen Insulinstimulierung der Zellen mit 1 µM Insulin folgte die Herstellung des Gesamtzellextrakts sowie die Immunpräzipitation gegen IRS. Western Blot-Analyse gegen die PI3-Kinase-Untereinheit p85 kann als Maß für die Menge an aktivierter PI3-Kinase nach Insulin-Stimulierung in der Zelle herangezogen werden, da nur aktivierte PI3-Kinase an der Membran lokalisiert ist und mit (phosphoryliertem) IRS interagiert. Abbildung modifiziert nach www.piramed.com/science.

Die so nachgewiesene p85-Menge in den Zellen wurde nach erfolgter Western Blot-Analyse quantifiziert und unter der Verwendung von Excel ausgewertet.

3.7 *Caenorhabditis elegans*-Experimente

Alle in dieser Doktorarbeit gezeigten *C. elegans*-Experimente wurden von Dr. Maren Hertweck der Universität Freiburg durchgeführt. Die Kultivierung von *C. elegans* auf NGM-Medium („nematode growth medium“) erfolgte wie bereits beschrieben (Brenner, 1974). Knock-Down von *lst-4* erfolgte durch RNAi-Fütterung (Kamath *et al.*, 2001). Das gewünschte *lst-4* RNAi-Fragment umfasste 950 bp (vom ATG Start stromabwärts) und wurde durch PCR-Reaktion genomischer DNA amplifiziert und in den L4440-Futter-Vektor

3. Material und Methoden

kloniert. Das hergestellte Plasmid wurde in den RNaseIII-defizienten *E. coli*-Stamm HT115(DE3) transformiert und *lst-4* RNAi nach (Kamath *et al.*, 2001) durchgeführt. Folgende *C. elegans*-Stämme wurden verwendet:

Tabelle 16: Verwendete *C. elegans*-Stämme, die für diese Doktorarbeit verwendet wurden

Aufgelistet ist der Name, die Bezeichnung des Stammes sowie das in diesem Stamm mutierte Gen.

Name	Stamm	Mutation
Wildtyp	N2 Bristol	
<i>daf-2/IR</i>	<i>e1370</i>	Insulin-/IGF-Rezeptor („loss of function“)
<i>age-1</i>	<i>sa315</i>	PI3-Kinase Untereinheit p110 („gain of function“)
<i>pdk-1</i>	<i>sa680</i>	3-Phosphoinositol-abhängige Kinase („loss of function“)

Würmer des Larvenstadiums L4 wurden auf *lst-4* RNAi NGM-Platten gesetzt, welche die *lst-4*-dsRNAi exprimierten (NGM-RNAi). Die Würmer wurden mindestens zwei Generationen bei 15 °C auf *lst-4* RNAi Platten gehalten, um den RNAi Phänotyp optimal zu induzieren. Für die Dauer-Experimente wurden nun einzelne adulte Würmer auf frische NGM-RNAi-Platten umgesetzt und für 4h bei 15 °C inkubiert, um die Tiere Eier legen zu lassen. Nach den 4h wurden die erwachsenen Würmer entfernt und die Platten mehrere Tage bei entsprechender Testtemperatur inkubiert (4,5 Tage bei 15 °C). Im Anschluss erfolgte die Auswertung, indem die Anzahl der Würmer pro Platte und der Phänotyp jedes Wurmes nach vorgegebenen Kategorien (Tabelle 17 und Abb. 39) bestimmt wurden.

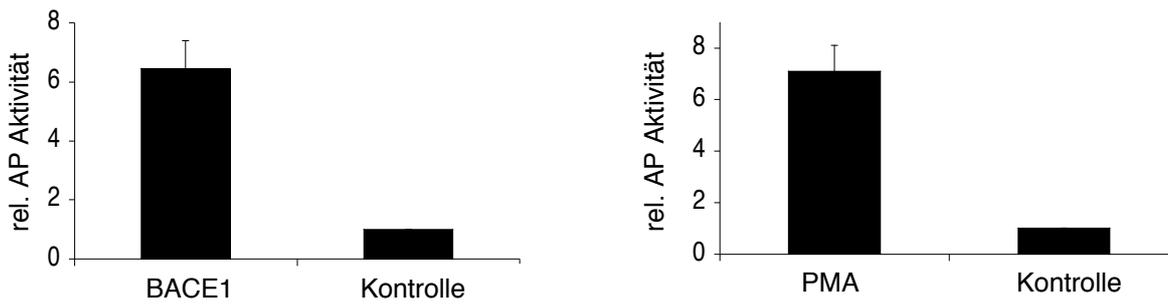
4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der β APP-Sekretion mit der AP-APP-Reporterzelllinie

Das neue Sorting Nexin 33 (SNX33) wurde in einem Expressionsklonierungs-Screen unter der Verwendung einer Reporterzelllinie, die alkalische Phosphatase (AP) N-terminal an β APP gekoppelt hat (AP-APP), identifiziert (Kapitel 1.5). Da diese Reporterzelllinie auch in der vorliegenden Doktorarbeit mehrfach verwendet wurde, wurde zunächst überprüft, ob sich Änderungen in der α - und β -Sekretase-Spaltung von β APP tatsächlich mit dieser Zelllinie testen lassen. Um die β -Sekretase-Spaltung zu erhöhen, wurde BACE1-cDNA in die Reporterzelllinie transfiziert und die Menge an sekretiertem β APP untersucht. Um auch einen möglichen Anstieg der α -Sekretase-Spaltung zu detektieren, wurden die Zellen mit dem Reagenz PMA (Phorbol-12-Myristat-Azetat) behandelt. PMA ist ein Phorbolster, der zu einer Aktivierung der ADAM-abhängigen Spaltung führt (Davenpeck *et al.*, 2000; Garton *et al.*, 2001; Lichtenthaler *et al.*, 2003). α - als auch β -Sekretase-abhängige Aktivierung der β APP-Proteolyse wurde mittels einer alkalischen Phosphatase-Aktivitätsbestimmung im Überstand der Zellen (Abb. 12A) sowie durch detaillierte Western Blot Analyse (Abb. 12B) überprüft.

Sowohl Transfektion von BACE1-cDNA als auch PMA-Behandlung der AP-APP-Reporterzelllinie führten zu einer ca. 6-fachen Zunahme der Spaltung von AP-APP in der Reporterzelllinie (Abb. 12A), d.h. anhand dieser Reporterzelllinie ist es möglich, eine Erhöhung des α - als auch des β -Schnittes von β APP zu detektieren. Die gemessene Zunahme der alkalischen Phosphatase-Aktivität im Überstand korrelierte sehr gut mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse (Abb. 12B), wo nach BACE1-Transfektion bzw. PMA-Behandlung ebenfalls eine starke Zunahme der β APP-Sekretion detektiert werden konnte. Bei der Transfektion von BACE1-cDNA wurde ein HA-konjugiertes DNA-Konstrukt verwendet (BACE1-HA). Bei Betrachtung der Western Blots in Abbildung 12B wird des Weiteren deutlich, dass die Zunahme an sekretiertem AP-APP der Reporterzelllinie in etwa der Zunahme an sekretiertem endogenen β APP entsprach.

A)



B)

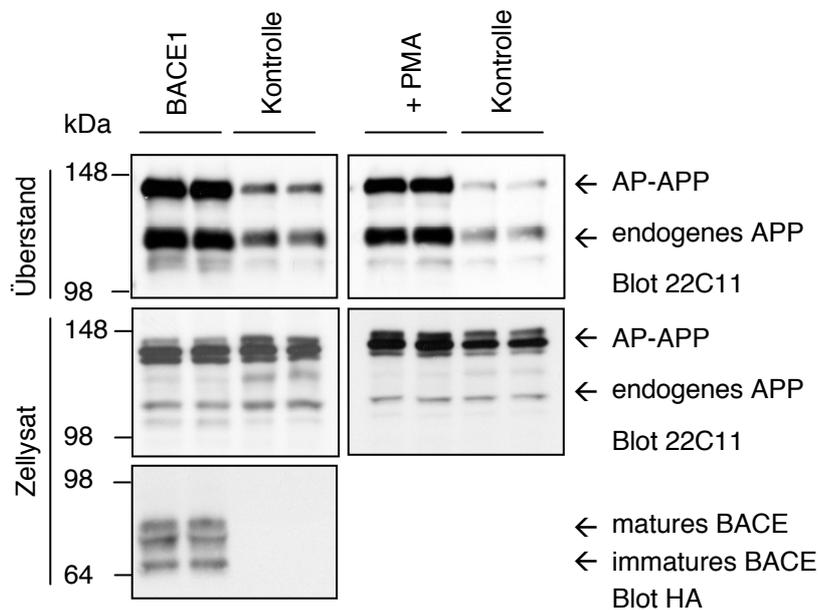


Abbildung 12: Alkalischer Phosphatase (AP) Reporterassay für die Spaltung von β APP

A) Zellen der AP-APP-Reporterzelllinie wurden transient mit BACE1-HA transfiziert bzw. 3 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ PMA behandelt. Die alkalische Phosphatase-Aktivität im Überstand der Zellen wurde bestimmt, dargestellt ist der Mittelwert und die Abweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

B) Aliquots der Experimente aus A) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse untersucht. Ein BACE1-Nachweis erfolgte mittels des HA-Antikörpers. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. AP-APP bezeichnet β APP, das N-terminal an alkalische Phosphatase (AP) konjugiert ist (modifiziert nach Schobel *et al.*, 2006).

Die in Abbildung 12 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass sich das alkalische-Phosphatase-konjugierte β APP der Reporterzelllinie analog dem Wildtyp- β APP verhält. Unter der Verwendung der AP-APP-Reporterzelllinie war es möglich, eine Zunahme der α - als auch der β -Spaltung zu detektieren.

4.2 Identifizierung, Sequenzanalyse und Nachweis eines neuen Sorting

Nexins

Mit Hilfe des unter Kapitel 1.5 beschriebenen Verfahrens der Expressionsklonierung konnte die cDNA eines bislang nicht untersuchten Gens identifiziert werden. Transfektion in die verwendete AP-APP-Reporterzelllinie (Kapitel 1.5 und 4.1) führte zu einer starken Zunahme der alkalischen Phosphatase-Aktivität (Abb. 13), gleichbedeutend mit einer Zunahme der AP-APP-Proteolyse. Bei dieser cDNA handelte es sich um den Klon „788-B8“, ein Protein, das in einer kürzlich veröffentlichten Übersicht Sorting Nexin 33 (SNX33) bzw. SH3PX3 genannt wurde (Seet and Hong, 2006). SNX33 ist bisher weder untersucht noch funktionell charakterisiert. Die Transfektion der SNX33-cDNA führte im hier verwendeten Reportersystem (Kapitel 1.5) zu einer etwa vierfachen Zunahme der relativen alkalischen Phosphatase-Aktivität, gleichbedeutend mit einem vierfachen Anstieg der AP-APP-Proteolyse (Abb. 13).

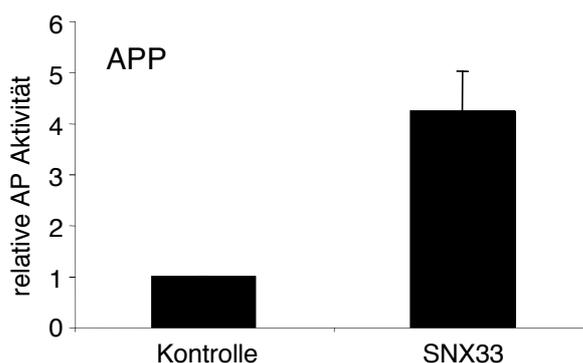


Abbildung 13: Effekt von SNX33 auf die AP-Aktivität der Reporterzelllinie

SNX33-cDNA wurde in die AP-APP-Reporterzelllinie transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität im Überstand der Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung. AP: alkalische Phosphatase.

Um zu überprüfen, ob der Einfluss von SNX33 spezifisch auf die Proteolyse von β APP wirkt, oder aber zu einer generellen Zunahme der Ektodomänenspaltung von Membranproteinen führt, wurden zwei weitere Transmembranproteine, der Tumor-Nekrosisfaktor-Rezeptor 2 (TNFR2; „Tumor necrosis factor receptor 2“) sowie L-Selektin N-terminal an sekretorische alkalische Phosphatase konjugiert (AP-TNFR1 und AP-L-Selektin). Beide Kontrollproteine sind Typ1-Transmembranproteine und können wie β APP durch α -Sekretasen prozessiert werden (Peschon *et al.*, 1998). Nach stabiler Transfektion der AP-Reporterkonstrukte in HEK293-Zellen und anschließender transients Transfektion der SNX33-cDNA wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität im Überstand bestimmt. Die Transfektion der SNX33-cDNA

in die AP-TNFR2-Reporterzelllinie führte zu einer etwa zweifachen Zunahme der alkalischen Phosphatase-Aktivität (Abb. 14A). In der AP-L-Selektin-Zelllinie war keine signifikante Zunahme der AP-Aktivität zu sehen (Abb. 14B). Um sicher zu stellen, dass die AP-TNFR2 und AP-L-Selektin-Reporterzelllinien funktionell sind, wurde des weiteren MEKK2 (mitogen aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinase), ein bekannter Aktivator der L-Selektin- und TNFR2-Spaltung (Lee *et al.*, 1995) in die Reporterzelllinien transfiziert und die Funktionalität der Konstrukte bestätigt (Daten von Stefanie Neumann, Schobel *et al.*, 2006). Folglich führt die Transfektion der SNX33-cDNA zu einer starken Erhöhung der β APP-Spaltung (Abb. 13), hat aber nur einen geringen Effekt auf die Spaltung von TNFR2 und L-Selektin, weshalb man davon ausgehen kann, dass es keinen generellen Effekt auf die Spaltung von TypI-Transmembranproteine ausübt.

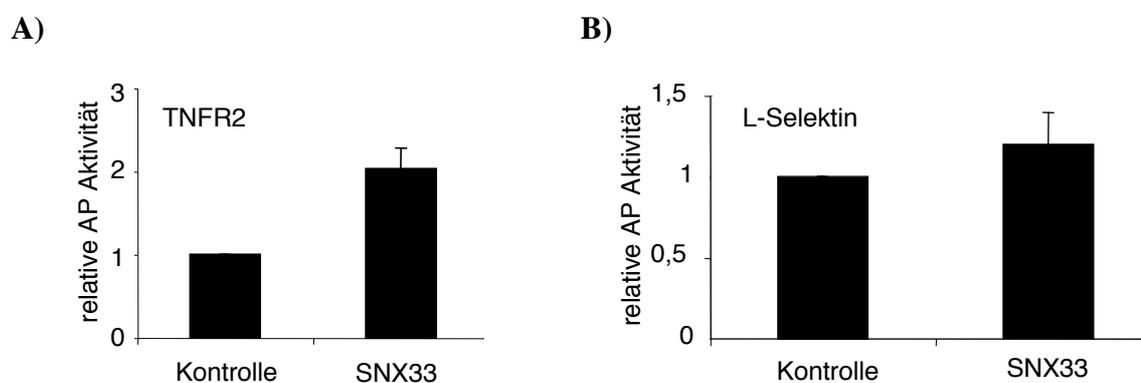


Abbildung 14: Einfluss von SNX33 auf die Spaltung von AP-TNFR2 und AP-L-Selektin

Mittels einer alkalischen Phosphatase-Aktivitätsbestimmung wurde der Einfluss der SNX33-cDNA auf die Proteolyse der TypI-Transmembranproteine AP-TNFR2 (A) und AP-L-Selektin (B) untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten sowie die zugehörige Standardabweichung.

Mit Hilfe des SMART-Programms („Simple Modular Architecture Research Tool“) konnte anhand der Sequenz eine Vorhersage für im Protein auftretende Domänen getroffen werden. Laut dieser Vorhersage enthält SNX33 die für Sorting Nexine charakteristische Phox-Homologie-Domäne (PX), sowie zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen: eine Src-Homologie 3-Domäne (SH3) und eine Bin/Amphiphysin/Rvs-Domäne (BAR). Beide Domänen können eine Protein-Interaktion vermitteln, des Weiteren sind BAR-Domänen in der Lage, eine Membranassoziiierung von Proteinen zu vermitteln (vgl. Kapitel 1.6.1). Abbildung 15 zeigt eine schematische Domänenstruktur des Proteins.



Abbildung 15: Vorhergesagte Domänenstruktur von SNX33

Mit Hilfe des SMART-Programms können im SNX33 eine Src-Homologie3-Domäne (SH3), eine Phox-Homologie-Domäne (PX) und eine Bin/Amphiphysin/Rvs-Domäne (BAR) vorhergesagt werden.

Durchsucht man Proteindatenbanken nach SNX33-Homologen in Säugetieren, findet man zwei Proteine, die eine große Ähnlichkeit zu SNX33 aufweisen: Sorting Nexin 9 (SNX9) und Sorting Nexin 18 (SNX18). Interessanterweise besitzen SNX33 und SNX18 eine sehr ähnliche Exon- und Intronstruktur, wohingegen SNX9 deutliche Unterschiede in der Genstruktur aufweist (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Es ist vorstellbar, dass sich SNX33 unabhängig von SNX9 entwickelt hat oder sich im Laufe der Evolution von SNX9 entfernt hat. Auch in anderen Spezies konnten verwandte Proteine gefunden werden, beispielsweise Ist-4, ein SNX33-Homolog im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). SNX18, SNX9 und Ist-4 besitzen eine ähnliche Domänenstruktur wie SNX33, die eine SH3-Domäne sowie eine PX- und BAR-Domäne beinhaltet (Abb. 16). Die Aminosäuresequenz der Proteine SNX33, SNX9, SNX18 und Ist-4 ist besonders im Bereich der SH3-Domäne und der PX-Domäne konserviert (Abb. 16).

4. Ergebnisse

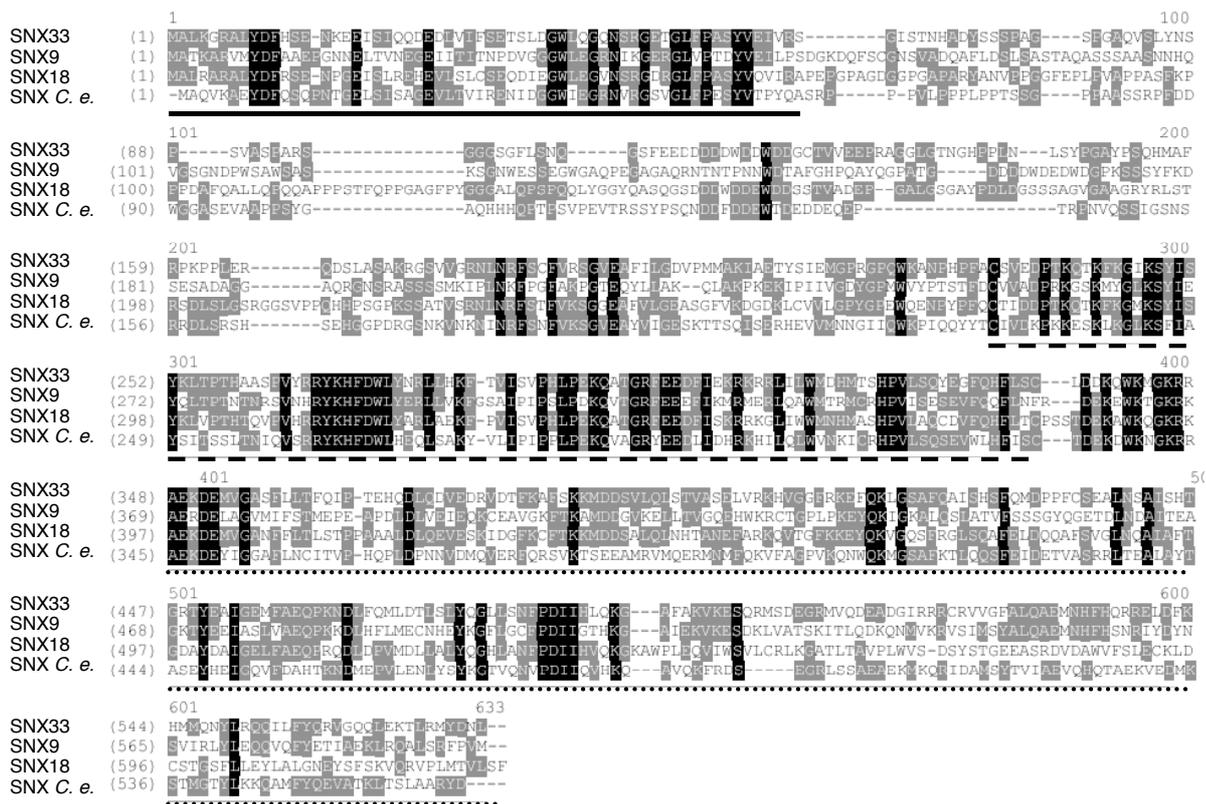


Abbildung 16: Vergleich der Proteinsequenzen von SNX33 (574 Aminosäuren) mit humanem SNX9 (595 Aminosäuren), SNX18 (629 Aminosäuren) und Ist-4 (SNX C.e.; 564 Aminosäuren) aus dem Fadenwurm *C. elegans*

Streng konservierte Aminosäuren sind schwarz unterlegt, konservierte Aminosäuren in grau. Laut einer Analyse der Sequenzen mittels der EMBL EMBOSS-Align Software besitzt SNX33 42,6 % Identität (54,6 % Ähnlichkeit) mit SNX18 und 35,9 % Identität (49,6 % Ähnlichkeit) mit SNX9. Ist-4 aus *C. elegans* besitzt eine Ähnlichkeit von 48,2 % zu SNX33. Die SH3-Domäne ist mit einer durchgezogenen Linie unterzeichnet, die PX-Domäne ist mit Strichen unterlegt, die C-terminale BAR-Domäne ist mit Punkten gekennzeichnet. Die Datenbank-Zugangsnummer („accession number“) von SNX33 ist NP_695003 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms „Vektor-NTI“ angefertigt.

Zur Detektion von SNX33 wurden zwei unterschiedliche Antikörper generiert: der polyklonale Antikörper SNX33-67 (67) sowie der monoklonale Antikörper SNX33-2A1 (2A1). Beide Antikörper erkennen spezifisch exogenes, aber auch endogenes SNX33. Sie identifizierten ein Protein, das ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa besitzt (Abb. 17). Das berechnete Molekulargewicht des neuen Proteins lässt sich anhand der Sequenz auf ca. 65 Kilodalton (kDa) abschätzen. Es ist möglich, dass die Differenz im Molekulargewicht durch post-translationale Modifikationen bedingt ist (siehe Abb. 19).

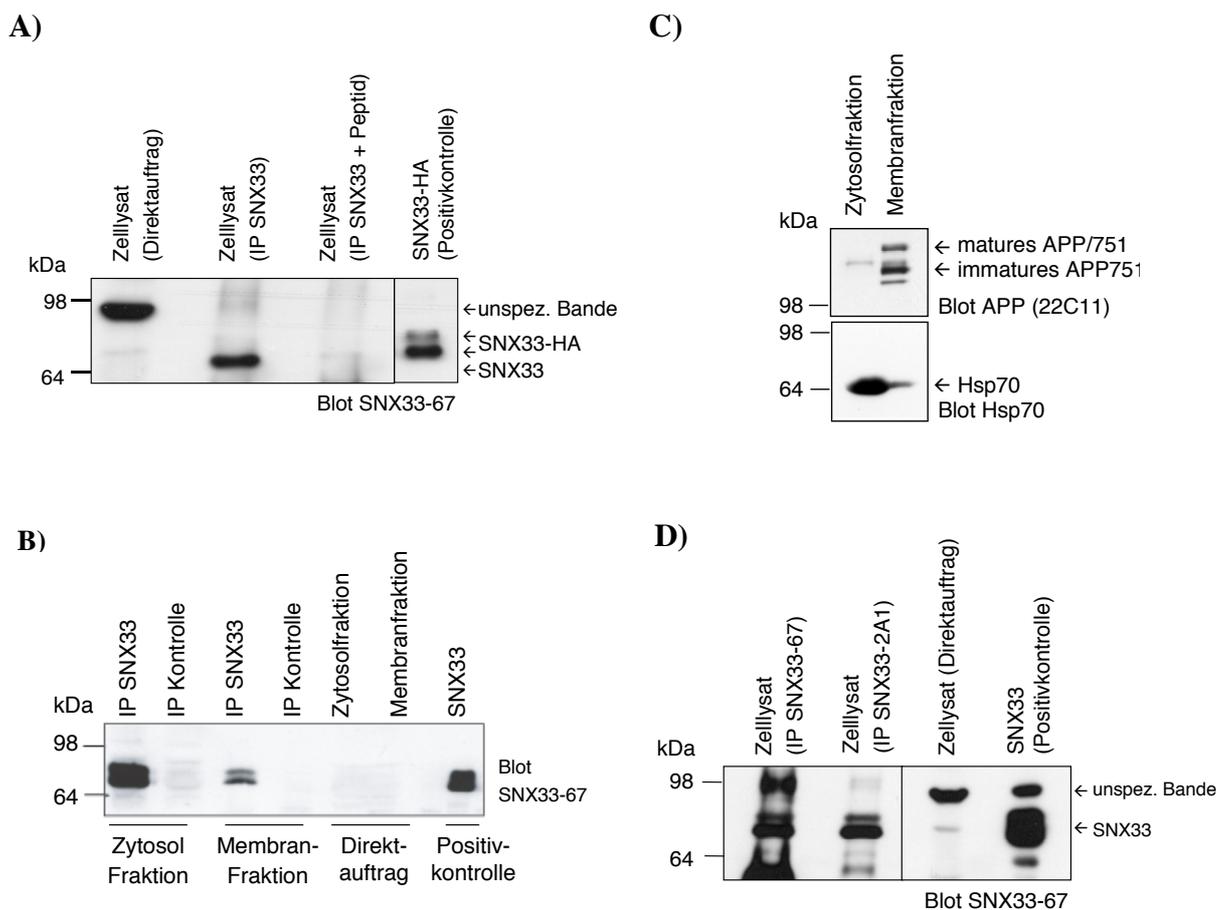


Abbildung 17: Test der Antikörper 67 und 2A1 in der Immunpräzipitation und im Western Blot auf endogenes und überexprimiertes SNX33

A) Endogenes SNX33 und transfiziertes, HA-konjugiertes SNX33 (Positivkontrolle „PK“) aus HEK293-Zellen (Gesamtzellysate) konnten nach Immunpräzipitation (SNX33-67-Antikörper) mit dem SNX33-67-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. Des Weiteren ist eine unspezifische Bande bei ca. 90-95 kDa zu erkennen („unspez. Bande“). Wurde der Antikörper vor der Immunpräzipitation mit dem zugehörigen Peptid geblockt, konnte kein SNX33 detektiert werden.

B) Endogenes SNX33 aus HEK293-Zellen nach Membranpräparation war in der Zytosol- als auch in der Membranfraktion nachweisbar. Die Immunpräzipitation erfolgte mittels des SNX33-2A1-Antikörpers, Western Blot-Detektion erfolgte mittels des SNX33-67-Antikörpers. Zudem gezeigt ist eine SNX33-Positivkontrolle aus HEK293-Zellen, die SNX33 transient überexprimieren.

C) Direktauftrag der Membran- und Zytosolfraktion nach Membranpräparation. Das Transmembranprotein β APP ist vor allem in der Membranfraktion nachweisbar (Blot 22C11), Hsp70 ist ein zytosolisches Protein und liegt vor allem in der Zytosolfraktion vor (Blot Hsp70).

D) Endogenes SNX33 aus HEK293-Zellen konnte mit dem aufgereinigten Antiserum des SNX33-67-Antikörpers als auch mit dem Hybridomaüberstand des SNX33-2A1-Antikörpers immunpräzipitiert werden. Der 67-Antikörper wurde für die Immunpräzipitation 1:100 eingesetzt, 2A1 wurde 1:10 verdünnt. Zudem gezeigt ist eine SNX33-Positivkontrolle („PK“) aus HEK293-Zellen, die SNX33 transient überexprimieren. Western Blot-Detektion von SNX33 erfolgte mit dem 67-Antikörper. Bei ca. 98 kDa war nach SNX33-67-Immunpräzipitation sowie im Direktauftrag des Zellysats eine unspezifische Bande („unspez. Bande“) zu erkennen.

Eine senkrechte durchgezogene Linie bedeutet, dass die auf dem Film gezeigten Proben auf dem SDS-Gel nicht nebeneinander aufgetragen wurden und deshalb mit einem Photo-Programm bearbeitet worden sind. Alle pro Versuch dargestellten Proben stammen jedoch von einem Experiment und wurden auf das gleiche SDS-Gel aufgetragen.

Abbildung 17A weist die Spezifität der SNX33-Immunpräzipitation nach, da eine mit Antikörper und zugehörigem Peptid behandelte Probe kein SNX33 im Western Blot nachweisen konnte. Ohne vorangeschalteter Immunpräzipitation („Zellysats Direktauftrag“, entspricht 1/25 der Proteinmenge, die für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde) war kein SNX33 zu detektieren, es war jedoch eine unspezifische Bande bei ca. 90-95 kDa zu detektieren. Endogenes SNX33 befand sich in HEK293-Zellen sowohl in der Zytosol- als auch in der Membranfraktion, was mittels einer Trennung der Zellen in eine Membran- und Zytosolfraction („Membranpräparation“) nachgewiesen wurde (Abb. 17B). Um sicher zu stellen, dass es sich bei den aufgereinigten Fraktionen tatsächlich um eine Membran- und Zytosolfraction handelt, wurden beide Fraktionen auf das Vorhandensein der Proteine β APP und Hsp70 untersucht. Hsp70 ist ein Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa, das im Zytosol lokalisiert ist. Abbildung 17C bestätigt dieses Ergebnis, es konnte nur ein geringer Anteil Hsp70 in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Abb. 17C). β APP ist ein Transmembranprotein und sollte deshalb vornehmlich in der Membranfraktion nachweisbar sein. Dies war nach einer Membranpräparation auch der Fall (Abb. 17C). Diese Ergebnisse bestätigen eine erfolgreiche Trennung des Zellysats in eine Membran- und Zytosolfraction.

Eine Membranassoziiierung von SNX33 lässt sich sehr gut durch das Vorhandensein einer BAR- sowie einer PX-Domäne erklären, die eine Membranassoziiierung von Proteinen vermitteln können (Dawson *et al.*, 2006; Worby and Dixon, 2002). Endogenes SNX33 aus HEK293-Zellen konnte nach einer Immunpräzipitation mit dem aufgereinigten 67-Antiserum als auch mit dem 2A1-Hybridomaüberstand nachgewiesen werden (Abb. 17D). Nach einer Immunpräzipitation mit dem 67-Antikörper wurde im 67-Western Blot eine unspezifische Bande bei ca. 90-95 kDa detektiert, die auch im Direktauftrag des Zellysats („Ladekontrolle“) zu sehen war (Abb. 17D). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl der aufgereinigte 67-Antikörper als auch der Hybridomaüberstand-2A1-Antikörper für eine Immunpräzipitation von endogenem SNX33 geeignet sind. Anschließend wurde die Qualität der beiden Antikörper in der Western Blot Analyse untersucht. Beide Antikörper detektierten überexprimiertes SNX33 im Western Blot, ein Vergleich der Antikörper ist in Abbildung 18 dargestellt.

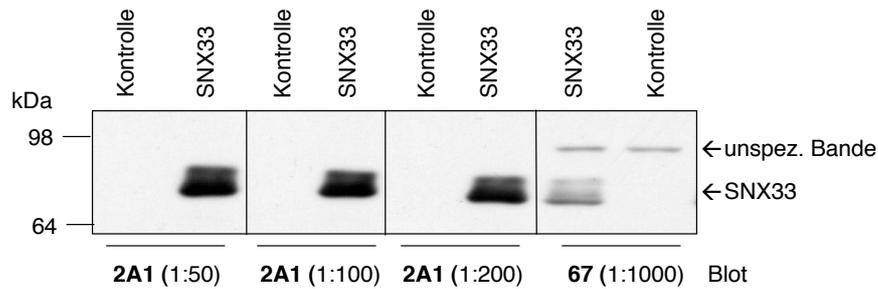


Abbildung 18: Vergleich der SNX33-Antikörper in der Western Blot Analyse

HEK293-Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid oder mit SNX33 transfiziert und im Western Blot auf SNX33-Expression getestet. Der SNX33-2A1-Antikörper wurde in drei unterschiedlichen Verdünnungen getestet (1:50, 1:100 und 1:200), der SNX33-67-Antikörper wurde 1:1000 verwendet. „unspez. Bande“ bezeichnet eine unpezifische Bande, die bei ca. 95 kDa vom SNX33-67-Antikörper detektiert wird.

Die durchgezogenen Linien bedeuten, dass die auf dem Film gezeigten Proben auf dem SDS-Gel nicht direkt nebeneinander aufgetragen wurden und deshalb mit einem Photo-Programm bearbeitet worden sind. Alle dargestellten Proben stammen jedoch von einem Experiment und wurden auf das gleiche SDS-Gel aufgetragen.

In allen folgenden Experimenten wurde der SNX33-2A1-Antikörper für die Immunpräzipitation von endogenem SNX33 verwendet, anschließend wurde der SNX33-67-Antikörper für die Detektion im Western Blot benutzt. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass nur eine begrenzte Menge des aufgereinigten SNX33-67-Antiserums zur Verfügung stand, wohingegen eine unbegrenzte Menge an 2A1-Hybridomaüberstand für Immunpräzipitationen verwendet werden konnte.

Betrachtet man die Western Blots der SNX33-Immunpräzipitation (Abb. 17B und 17D), so fällt auf, dass exogen exprimiertes Protein, aber auch endogenes SNX33 nicht als distinkte Bande detektiert wurde, vielmehr wurden zwei bis vier Banden von den SNX33-spezifischen Antikörpern 67 und 2A1 erkannt. Da diese Banden sehr dicht beisammen liegen, könnte es sich hierbei um post-translational modifiziertes SNX33 handeln. Aufgrund des geringen Laufunterschieds der Banden und aufgrund potentieller Phosphorylierungsstellen in der SNX33-Sequenz wurde untersucht, ob es sich bei diesen zusätzlichen Banden um phosphoryliertes SNX33 handelt. Weiteres Indiz für mögliche post-translationelle Modifikationen ist die Tatsache, dass SNX33 in der Western Blot Analyse ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa aufweist, wohingegen das berechnete Molekulargewicht bei 65 kDa liegt. Um SNX33 auf post-translationelle Modifikationen zu untersuchen, wurde transfiziertes SNX33-HA aus dem Lysat von HEK293-Zellen immunpräzipitiert, wobei eine der beiden Proben zusätzlich mit Alkalischer Phosphatase (SAP; „shrimp alkaline

4. Ergebnisse

phosphatase“) behandelt wurde. Sollte es sich bei den zusätzlichen Banden tatsächlich um phosphoryliertes Protein handeln, sollten diese nach SAP-Behandlung aufgrund von Dephosphorylierung auf eine Bande reduziert werden. Nach Phosphatasebehandlung des Zelllysats war nur noch eine distinkte SNX33-Bande zu erkennen (Abb. 19), weshalb es sich bei den zusätzlich auftretenden Banden um phosphoryliertes SNX33 handeln muss.

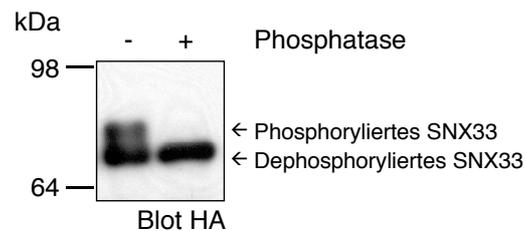


Abbildung 19: Phosphatase-Behandlung von überexprimiertem SNX33 in HEK293-Zelllysaten

SNX33-HA wurde aus transient-transfizierten HEK293-Zellen mittels des HA-Antikörpers immunpräzipitiert. Eine der beiden Proben wurde nach erfolgter Immunpräzipitation zusätzlich über Nacht mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Beide Proben wurden dann auf ein 8% -SDS-Gel geladen und nach PAGE im Western Blot mit dem SNX33-67-Antikörper detektiert.

Mittels der Antikörper 67 und 2A1 war SNX33 endogen in Nierenzellen nachweisbar (Abb. 17D). Als nächstes wurden weitere Gewebearten auf SNX33-Expression untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine SNX33-spezifische Sonde generiert, die zur Hybridisierung auf einen sogenannten humanen „multiplen Gewebe Northern („multiple tissue Northern“; MTN) Blot“ gegeben wurde. Der MTN-Blot ist eine Membran, auf der mRNA unterschiedlicher Gewebe aufgetragen ist. Mit Hilfe einer spezifischen Sonde ist es möglich, die mRNA-Mengen eines gewünschten Gens in einer Vielzahl an Gewebearten zu überprüfen. Die für dieses Experiment verwendete SNX33-cDNA-Sonde (Abb. 20A) wurde vor Beginn mittels des BLAST-Programms („Basic Local Alignment Search Tool“) auf ihre Spezifität überprüft und so ausgewählt, dass sie SNX33-mRNA, aber nicht dessen Homologe erkennt. SNX33-mRNA wurde in allen aufgetragenen Organen gebildet, besonders stark war die Expression im Pankreas, dem Herz und dem Muskelgewebe (Abb. 20B). Das Northern Blot Experiment zeigte zwei unterschiedliche SNX33-mRNA-spezifische Signale der Größe 4,6 kb und 8 kb (Abb. 20B). Vermutlich ist ein alternatives Spleißen oder potentielle Unterschiede in der Länge der 3'UTR Ursache für unterschiedliche SNX33-mRNA-Versionen. SNX33-Expression im Gehirn war nur sehr schwach nachzuweisen. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass in der Bahn, wo Gehirn-mRNA aufgetragen ist, sehr viel weniger mRNA geladen war. Dies wird ersichtlich, wenn man den β -Aktin-Blot betrachtet (Abb. 20).

Bei korrekter Beladung des multiplen Gewebe-Northern Blots ist folglich auch ein stärkeres SNX33-mRNA-Signal im Gehirn zu erwarten.

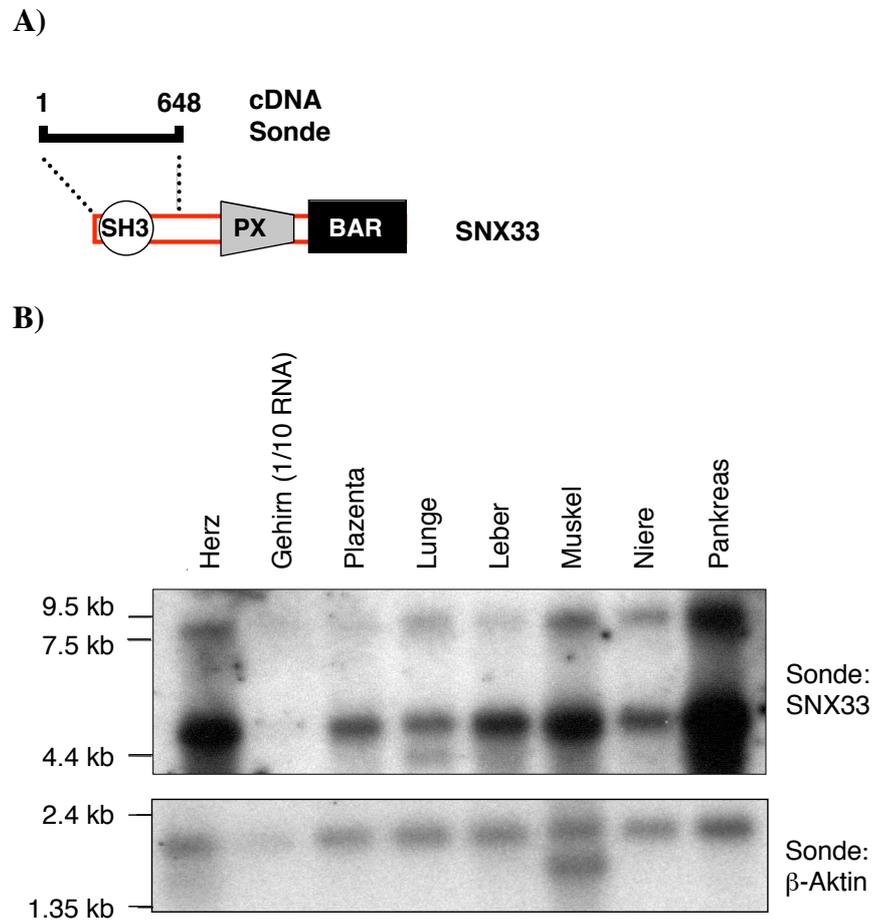


Abbildung 20: SNX33-Expression in humanen Geweben

Mit Hilfe eines kommerziell erwerblichen MTN-Blot konnte die Expression von SNX33 in allen aufgezeigten Gewebearten nachgewiesen werden.

A) Die für dieses Experiment verwendete spezifische cDNA-Sonde umfasste die Basen 1-648 der SNX33-kodierenden Sequenz und bindet in der 5'-Region.

B) Ergebnis der MTN-Blot Analyse von SNX33 in humanem Gewebe mit der in (A) gezeigten Sonde sowie einer β -Aktin-Kontrollsonde.

Der β -Aktin-Blot diente in diesem Experiment als Kontrollblot zur Normierung des Signals, so dass eine relative Abschätzung der Signalintensitäten möglich war. Zur weiteren Überprüfung einer neuronalen SNX33-Expression wurde endogenes SNX33 in der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y (Abb. 21) sowie in adultem Maushirn (Ergebnis nicht gezeigt) nach Immunpräzipitation nachgewiesen.

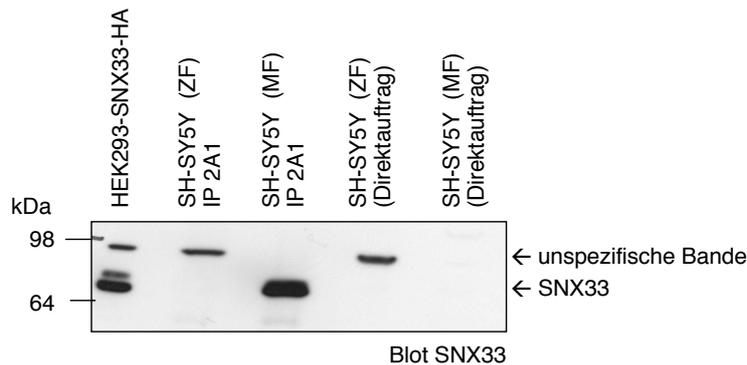


Abbildung 21: Nachweis von SNX33 in neuronalem Gewebe

Endogener Nachweis von SNX33 in SH-SY5Y-Zellen, einer Neuroblastom-Zelllinie. Bei der Herstellung der Zellysate wurden eine Zytosolfraktion (ZF) und eine Membranfraktion (MF) gewonnen. Aus diesen Proben wurde SNX33 mittels des SNX33-2A1-Antikörpers immunopräzipitiert und im Western Blot mittels des SNX33-67-Antikörpers nachgewiesen. HEK293-SNX33-HA-Zellysate diente als Positivkontrolle, außerdem gezeigt sind die entsprechenden Ladekontrollen der SH-SY5Y-Frakturen („Direktauftrag“). Eine unspezifische Bande, die vom SNX33-67-Antikörper detektiert wurde, war bei ca. 95 kDa zu beobachten.

SNX33 konnte mittels einer Immunpräzipitation in der neuronalen SH-SY5Y-Zelllinie in der Membranfraktion (MF) mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa detektiert werden, ein Nachweis in der löslichen zytosolischen Fraktion konnte in den SH-SY5Y-Zellen nicht erfolgen. Ein direkter SNX33-Nachweis ohne vorgeschaltete Immunpräzipitation war nicht möglich (Abb. 21, „Direktauftrag“), dabei entsprachen die Ladekontrollen 1/25 der Proteinmenge, die für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde. Wie auch in vorherigen Abbildungen gezeigt (Abb. 17A, 17D) konnte eine unspezifische Bande bei ca. 95 kDa detektiert werden. SNX33-HA-überexprimierende HEK293-Zellen dienten in diesem Experiment als Positivkontrolle.

Im Gegensatz zu den in Abbildung 21 gezeigten Ergebnissen in SH-SY5Y-Zellen konnte SNX33 in HEK293-Zellen sowohl in der Membranfraktion als auch in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 17B). Möglicherweise ist der Anteil an Membran-assoziiertem SNX33 in verschiedenartigen Zelltypen unterschiedlich. Beide verwendeten Zelltypen - HEK293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen - erlaubten einen Nachweis von SNX33 in der Membranfraktion. Eine Membranassoziiierung von SNX33 passt gut mit der vorhergesagten Domänenstruktur von SNX33 (Abb. 15) zusammen. Wie bereits erwähnt kann eine Assoziierung von SNX33 an Membranen durch die PX- sowie die BAR-Domäne vermittelt werden (Carlton and Cullen, 2005; Habermann, 2004).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SNX33 ein phosphoryliertes Protein ist, das ubiquitär exprimiert wird und in humanen Zellen zwei nahe Verwandte, SNX9 und SNX18, besitzt. Auch in anderen Organismen, beispielsweise im Fadenwurm *C. elegans*, konnte ein SNX33-Ortholog identifiziert werden. SNX33 ist ein zytosolisches Protein, das auch Membran-assoziiert vorliegen kann.

4.3 Analyse der Funktion von SNX33 in der β APP-Prozessierung

Als nächstes wurde eine detaillierte Analyse der Funktion von SNX33 und dessen Homologen SNX9 und SNX18 auf die β APP-Prozessierung durchgeführt. Der Einfluss dieser Proteine auf die Spaltung von β APP erfolgte zunächst unter Überexpressionsbedingungen. Ab Kapitel 4.6 sind Ergebnisse dargestellt, die unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen durchgeführt worden sind.

4.3.1 SNX33, SNX9 und SNX18 führen zu einer Zunahme der β APP-Spaltung

SNX33 konnte mittels des Expressionsklonierungs-Screens (Kapitel 1.5) als Aktivator der β APP-Proteolyse identifiziert werden. Da zu Beginn der Studie noch keine SNX33-Antikörper erhältlich waren, war es notwendig, für einige Experimente HA-konjugiertes SNX33 zu verwenden, um einen Nachweis des Proteins zu ermöglichen. Da artifizielle Veränderungen wie HA-Konjugate die Funktion von Proteinen beeinflussen können, wurde der Effekt von SNX33-HA auf die Spaltung von β APP in der AP-APP-Reporterzelllinie überprüft. Es sollte sichergestellt werden, dass sich SNX33-HA im verwendeten Reportersystem analog SNX33 verhält (Abb. 13). Neben SNX33-HA wurden die homologen Proteine SNX9-HA und SNX18-HA, sowie ein Kontrollvektor und SNX1-HA in die AP-APP-Reporterzellen transfiziert. SNX9-HA und SNX18-HA sind Homologe zu SNX33 und weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf (Kapitel 1.6.1), weshalb auch diese Konstrukte in der Reporterzelllinie untersucht werden sollten. Um auszuschließen, dass Sorting Nexine generell einen Einfluss auf die Spaltung von β APP besitzen, wurde SNX1, ein weiteres Mitglied der Sorting Nexin-Familie, jedoch nicht Mitglied der SNX9/18/33-Unterklasse, als „Negativkontrolle“ mitgeführt. Der Kontrollvektor diente in diesem Experiment als Referenzwert und zeigt, wieviel β APP konstitutiv gespalten wird. Transfektion von SNX33-HA, SNX9-HA und SNX18-HA in die AP-APP-Reporterzelllinie führten zu einer deutlichen Zunahme an geschnittenem β APP, wohingegen SNX1-HA keinen Einfluss ausübte (Abb. 22).

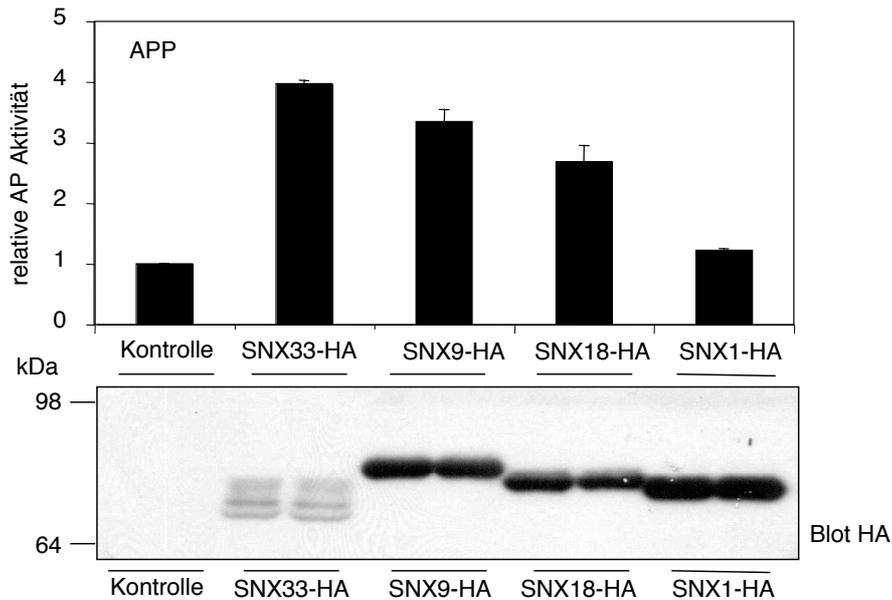


Abbildung 22: Einfluss von SNX33-HA auf die β APP-Proteolyse im AP-APP-Reportersystem

AP-APP-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert, die ein C-terminales HA-Konjugat („tag“) besitzen. „Kontrolle“ bezeichnet einen Expressionsvektor ohne Insert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität im Überstand der Zellen. Gemessene Werte wurden auf die Proteinkonzentration im Zelllysat normiert und relativ zueinander graphisch dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, jedes Experiment wurde in Doppelwerten durchgeführt. Außerdem zu sehen ist das Expressionsmuster der transfizierten Konstrukte (Blot HA). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot eines Experiments.

Das an SNX33 angefügte HA-Konjugat beeinflusste folglich nicht den Effekt des Proteins auf die β APP-Proteolyse, da sich HA-konjugiertes SNX33 analog dem Wildtyp-SNX33 verhielt (vgl. Abb. 13 und 22) und zu einer ca. vierfachen Zunahme der β APP-Spaltung führte. Auch GFP-konjugiertes SNX33 führte im AP-APP-Reportersystem zu einer circa vierfachen Zunahme der β APP-Spaltung (Daten nicht gezeigt), das bedeutet, dass die Funktion von SNX33 weder durch ein HA- noch durch ein GFP-Konjugat beeinflusst wurde. Die in Abbildung 22 gezeigten Daten lassen vermuten, dass SNX33, SNX9 und SNX18, die eine gemeinsame Domänenstruktur besitzen (Abb. 10), auch eine funktionelle Subgruppe bilden, da alle drei getesteten Proteine zu einer Zunahme der alkalischen Phosphatase-Aktivität, d.h. zu einer Zunahme der β APP-Sekretion führten. Interessanterweise zeigte die Transfektion von SNX33-HA den größten Effekt, obwohl seine Expression im Vergleich zu den anderen Konstrukten relativ schwach war (Abb. 22, Blot HA). Ein genereller Effekt auf die β APP-Proteolyse durch Mitglieder der Sorting Nexin-Familie kann jedoch ausgeschlossen werden, da SNX1 keinen Effekt auf die Proteolyse von β APP ausübte.

Im Gegensatz zur SNX33-Subgruppe besitzt SNX1 keine SH3-Domäne (Abb. 10). Es ist also möglich, dass die Zunahme der β APP-Prozessierung durch diese Domäne vermittelt wird. Deshalb wurde eine SNX33-Deletionsmutante kloniert, der die komplette SH3-Domäne fehlt (SNX33- Δ SH3). Der Effekt dieser Mutante auf die β APP-Spaltung wurde anschließend in der AP-APP-Reporterzelllinie untersucht. SNX33-HA zeigte den bereits mehrfach beschriebenen Effekt (Abb. 22) und führte zu einer circa vierfachen Erhöhung an sekretiertem β APP. Nach Deletion der SH3-Domäne konnte keine signifikante Zunahme der β APP-Spaltung beobachtet werden (Abb. 23).

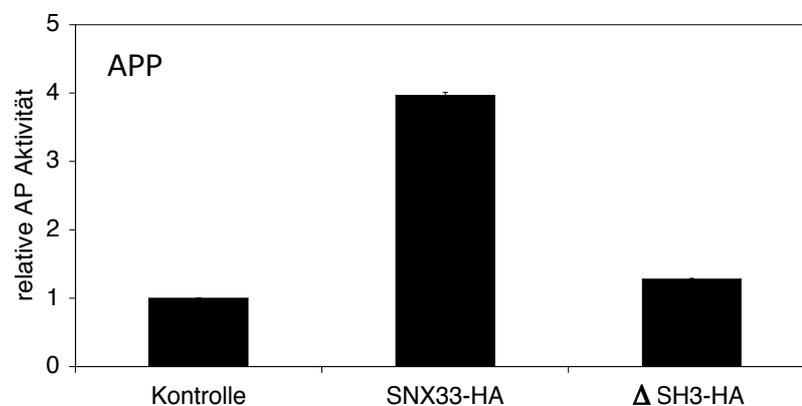


Abbildung 23: Effekt der SNX33- Δ SH3-Deletionsmutante auf die β APP-Spaltung in der AP-APP-Reporterzelllinie

Zellen der AP-APP-Linie wurden transient mit SNX33-HA, SNX33- Δ SH3 („ Δ SH3-HA“) oder Vektor ohne Insert (Kontrolle) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität im Überstand der Zellen bestimmt, auf die Gesamtproteinkonzentration der Zellysate normiert und gegeneinander aufgetragen. Das Experiment wurde in Doppelwerten in zweifacher Ausführung durchgeführt, dargestellt ist der Mittelwert sowie die Abweichung vom Mittelwert.

Offensichtlich ist die SH3-Domäne von SNX33 für eine Modulation der β APP-Proteolyse von Bedeutung, da nach einer Deletion dieser Domäne keine signifikante Änderung der β APP-Spaltung festgestellt werden konnte. Auch SNX9 und SNX18 besitzen eine SH3-Domäne und erhöhten die Spaltung von β APP (Abb. 22). Da es sich bei SH3-Domänen um Protein-Interaktionsdomänen handelt, ist es möglich, dass SNX33 durch eine Interaktion mit einem weiteren, bislang nicht bekannten Protein, die β APP-Proteolyse moduliert.

4.3.2 Western Blot-Analyse des Spaltungs-induzierenden Effekts von SNX33-HA auf endogenes β APP

Anschließend wurde überprüft, ob SNX33 Überexpression auch zu einer Zunahme an sekretiertem Wildtyp- β APP führt. Mit Hilfe der AP-APP-Reporterzelllinie ist es möglich, Änderungen der Gesamt-Sekretionsrate von β APP zu detektieren (Kapitel 1.5), es ist jedoch nicht möglich, α -Sekretase-Spaltung von β -Sekretase-Spaltung zu unterscheiden. Dies ist jedoch gerade im Hinblick auf die Alzheimer Krankheit von großer Bedeutung, da es wünschenswert ist, die pathogene β -Spaltung zu Gunsten der neurotrophen α -Spaltung zu reduzieren. Um die Funktion von SNX33 in der β APP-Proteolyse zu verstehen, ist es essentiell, α - und β -Spaltung zu unterscheiden. Dies ist durch eine detaillierte Western Blot-Analyse, unter der Verwendung von Schnittstellen-spezifischen Antikörpern möglich. Abbildung 24 zeigt die Bindungsstellen der für die Western Blot Analyse verwendeten Antikörper.

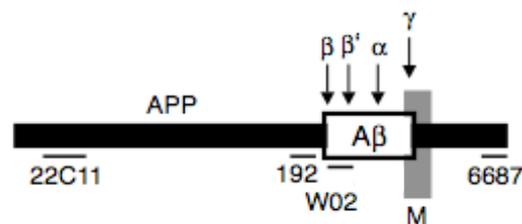


Abbildung 24: Bindungsstellen der verwendeten Antikörper im β APP

22C11 bindet in der N-terminalen Region und erkennt sAPP α , sAPP β sowie Gesamt- β APP im Zelllysat. 192 ist ein Neo-Epitop-spezifischer Antikörper, der sAPP β erkennt. W02 detektiert sAPP α und sAPP β' (Glu11-Schnittstelle) im Überstand sowie Vollängen- β APP im Zelllysat. Der Antikörper 6687 bindet C-terminal und wurde zur Detektion von Gesamt- β APP im Zelllysat verwendet. „M“ bezeichnet die Membran, zusätzlich sind in der Abbildung die Hauptschnittstellen der α -, β -, β' - und γ -Sekretase mittels Pfeilen gekennzeichnet (Abbildung modifiziert aus Schobel *et al.*, 2006). β' bezeichnet eine alternative Schnittstelle der β -Sekretase, die an Position Glu11 innerhalb der A β -Sequenz vorhanden ist.

Anschließend wurde ein geeignetes Modellsystem ausgewählt. Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) sind im Gegensatz zu Neuronen oder neuronalen Zelllinien sehr einfach zu transfizieren. Da SNX33 auch in HEK293-Zellen exprimiert wird (Abb. 17D) und auch endogenes β APP sehr gut nachweisbar ist, ist diese Zelllinie gut geeignet. Des Weiteren verläuft die β APP-Prozessierung in allen Zell- und Gewebetypen sehr ähnlich (Haass *et al.*, 1992b) und auch die Analyse der Sekretasen, welche die β APP-Prozessierung beeinflussen, wurde schon mehrfach in HEK293-Zellen beschrieben (Capell *et al.*, 1998; Citron *et al.*, 1992; Lammich *et al.*, 1999), weshalb ein Großteil der folgenden Experimente in dieser humanen Nierenzelllinie durchgeführt wurde.

Für eine detaillierte Analyse wurden HEK293-Zellen mit SNX33 oder Kontrollvektor transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das Medium im Überstand der Zellen auf sAPP α - und sAPP β untersucht. Außerdem wurde die β APP-Gesamtmenge im Zelllysate sowie die Expression des SNX33-HA-Konstruktes im Western Blot analysiert. SNX33-HA Expression führte in HEK293-Zellen, die endogenes β APP exprimieren, zu einer deutlichen Zunahme von sekretiertem sAPP α im Überstand (Abb. 25, Blot W02). Die Bildung von sAPP β war nur minimal verändert. SNX33-HA-Expression in HEK293 führte zu einer geringen Zunahme von sAPP β (Abb. 25, Blot 192 Wt), die jedoch nicht in allen durchgeführten Experimenten beobachtet werden konnte.

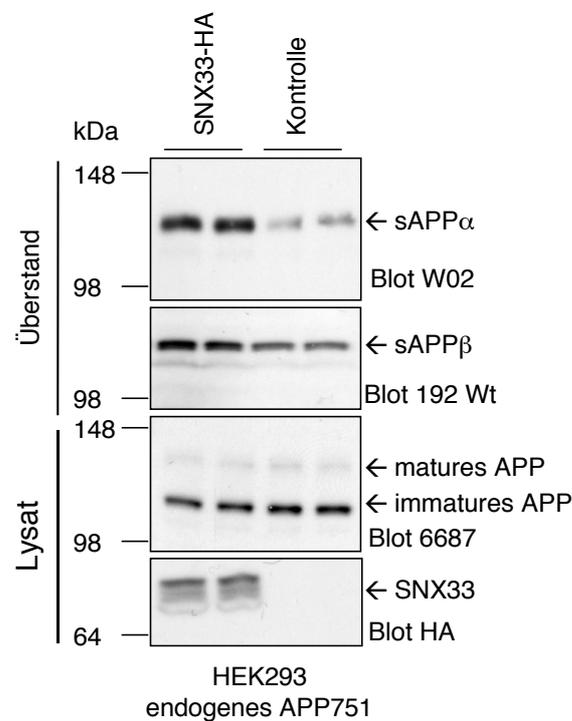


Abbildung 25: Detaillierte Western Blot Analyse des Effekts von SNX33 auf die endogene β APP-Spaltung

HEK293-Zellen wurden transient mit SNX33-HA oder leerem Vektor (Kontrolle) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen lysiert und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Das Experiment wurde in Doppelwerten durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt, gezeigt sind repräsentative Blots.

SNX33-HA-Expression führte folglich vor allem zu einer Zunahme der α -Sekretase-Spaltung, wohingegen die Funktion der β -Sekretase nur minimal beeinflusst wurde. Mit Hilfe des HA-Blots konnte eine Expression des SNX33-HA-Konstruktes nachgewiesen werden. Ein A β -Nachweis konnte nicht durchgeführt werden, da die Menge an sekretiertem A β unter diesen Bedingungen unter dem Detektionslimit lag.

4.3.3 Western Blot-Analyse des Spaltungs-induzierenden Effekts von SNX33-HA auf überexprimiertes β APP

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den beobachteten Effekten nicht um unspezifische Effekte handelt, wurde das gleiche Experiment auch in der Affenzelllinie COS7 durchgeführt, die stabil β APP695 exprimiert (COS7/APP695). Neben der COS7/APP695-Linie wurde der Einfluss von SNX33 Überexpression parallel in einer HEK293-Zelllinie durchgeführt, die stabil β APP695 überexprimiert (HEK293/APP695). Beide Zelllinien bieten den Vorteil, dass sie aufgrund der β APP-Überexpression einen A β -Nachweis erlauben, was für ein molekulares Verständnis der Pathogenese der Alzheimer Krankheit von besonderem Interesse ist.

Auch unter β APP-Überexpression führte die Expression von SNX33-HA zu einer deutlichen Zunahme von sAPP α im Überstand. Dies war sowohl in COS7/APP695-Zellen als auch in HEK293/APP695-Zellen zu beobachten (Abb. 26). In beiden Zellsystemen wurde SNX33-HA exprimiert (Abb. 26, Blot HA), die Gesamtmenge an β APP im Zelllysate wurde nicht abhängig von der Transfektion der Konstrukte verändert (Abb. 26, Blot 6687). Bezüglich der β -Spaltung unterschieden sich die beiden Zelllinien. In den COS7/APP695-Zellen führte SNX33-HA-Expression zu einer leichten Abnahme der gebildeten sAPP β -Menge (Abb. 26A, Blot 192 Wt). In Übereinstimmung mit diesem geringen Effekt blieb auch die Menge an sekretiertem A β unverändert (Abb. 26A, Blot 6E10). In den HEK293/APP695-Zellen hingegen führte SNX33-HA-Transfektion zu einer starken Zunahme der sAPP β -Generierung (Abb. 26B, Blot 192 Wt) sowie zu einer geringen Zunahme der A β -Level (Abb. 26B, Blot 6E10).

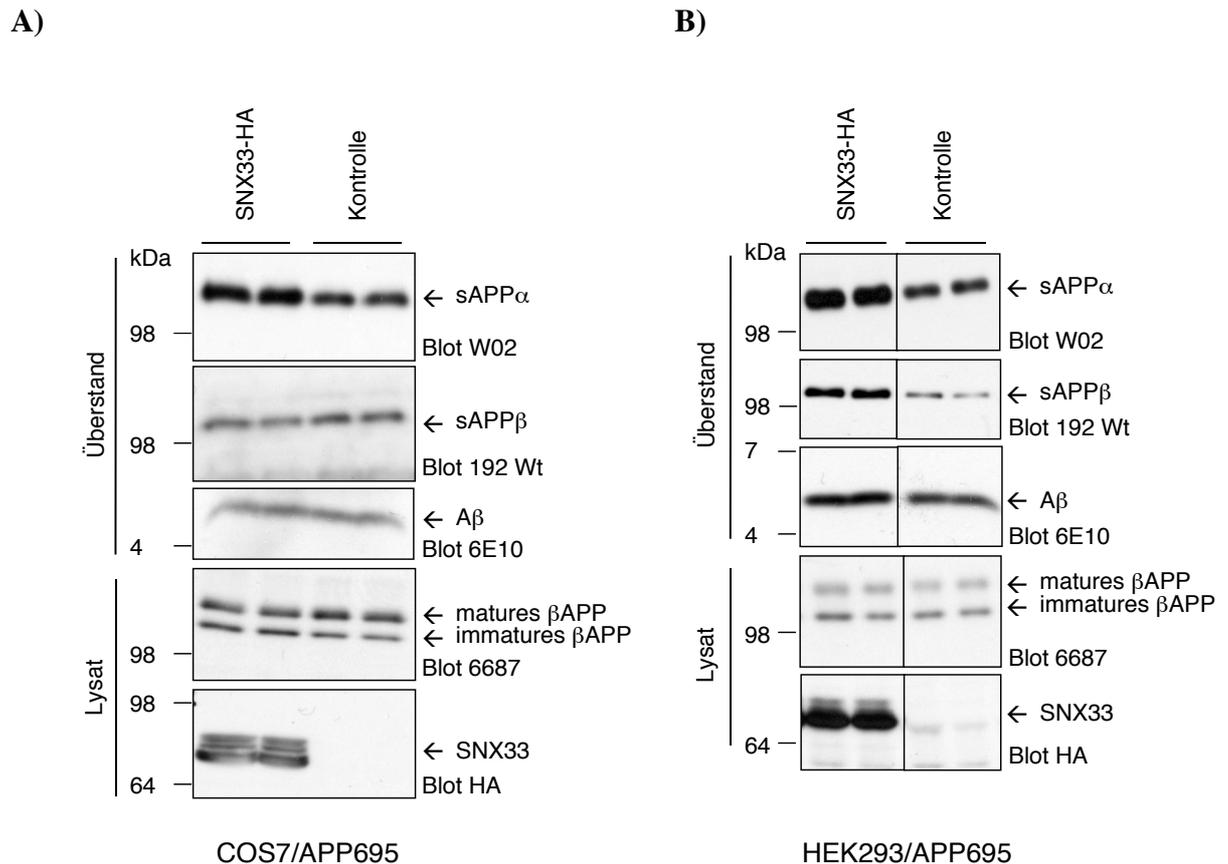


Abbildung 26: Detaillierte Western Blot Analyse des Effekts von SNX33 auf die β APP-Spaltung unter β APP-Überexpressionsbedingungen

COS7/APP695-Zellen (A) wurden transient mit SNX33-HA oder Vektor ohne Insert (Kontrolle) transfiziert. HEK293/APP695 (B) exprimieren SNX33 stabil. 48 h nach Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen lysiert und mittels Western Blot Analyse untersucht. Beide Versuche wurden in Doppelwerten in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Blots dieser Experimente. Die senkrechten eingefügten Linien symbolisieren, dass die Proben nicht direkt nebeneinander geladen wurden, sie stammen jedoch vom gleichen Gel bzw. Western Blot.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Überexpression von SNX33 in allen drei getesteten System -HEK293, HEK293/APP695 und COS7/APP695- zu einer deutlichen Zunahme der $sAPP\alpha$ -Sekretion führte (Abb. 25 und 26A/B). Die Menge an detektiertem $sAPP\beta$ variierte jedoch abhängig von der verwendeten Zelllinie sowie von der Menge an exprimiertem β APP.

Es konnte bereits in der AP-APP-Reporterzelllinie gezeigt werden, dass sich SNX33-HA analog dem Wildtyp SNX33 verhält und ein angefügtes HA-Konjugat keinen störenden Einfluss auf die Funktion des Proteins ausübt (Abb. 22). Mittels Western Blot Analyse wurde anschließend überprüft, dass das Vorhandensein eines HA- bzw. GFP-Konjugates keinen Einfluss auf die $sAPP\alpha$ -Bildung ausübt. Transfektion von SNX33, SNX33-HA und

SNX33-GFP führte zu einer deutlichen Zunahme der sAPP α -Bildung in HEK293-Zellen (Abb. 27), Gesamt- β APP-Mengen im Zelllysat blieben unverändert (Daten nicht gezeigt). Die konjugierten Konstrukte verhielten sich in der Western Blot Analyse analog SNX33 (Abb. 27) und bestätigen damit das Ergebnis der AP-APP-Reporterzelllinie (Abb. 22).

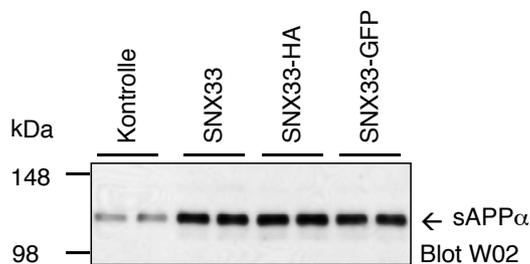


Abbildung 27: Überprüfung des Effekts von SNX33-GFP auf die sAPP α -Spaltung von β APP

HEK293-Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Menge an gebildetem sAPP α im Überstand der Zellen mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Für die Detektion von sAPP α wurde der Antikörper W02 verwendet.

4.4 SNX33-Expression beeinflusst Endozytosevorgänge in der Zelle

4.4.1 SNX33-GFP inhibiert die Endozytose von β APP695

Als nächstes wurde der Mechanismus aufgeklärt, der zu einer Zunahme von sAPP α sowie zu einer Änderung von sAPP β nach SNX33-Transfektion führte. Es ist aus der Literatur bekannt, dass eine generelle Endozytosehemmung zu einer Erhöhung der α -Sekretase-Spaltung von β APP sowie zu einer leichten Zunahme der sAPP β -Bildung führt (Chyung and Selkoe, 2003). Da diese Beobachtung sehr gut mit den Ergebnissen der SNX33-Überexpression übereinstimmt (Kapitel 4.3), wurde untersucht, ob SNX33 eine Endozytosehemmung verursachen kann. Dafür wurde von meiner Kollegin Stephanie Neumann ein Versuchsaufbau entwickelt, der es erlaubt, β APP-Endozytose in transfizierten COS-Zellen zu verfolgen (Haass *et al.*, 1992a; Kaether *et al.*, 2002; Neumann *et al.*, 2006). Mit Hilfe dieses Versuchs wurde der Einfluss von SNX33-GFP auf die β APP-Endozytose analysiert. Abbildung 28 zeigt das Prinzip des hier angewandten Versuchsaufbaus: β APP-überexprimierende COS-Zellen wurden auf Eis mit Antikörpern gegen β APP (5313) sowie einem Antikörper gegen das Protein Early Endosomal Antigen 1 (EEA1) markiert, welches man als endosomalen Marker verwendet. Zu Beginn des Experiments wurde ausschließlich β APP der Zelloberfläche markiert. Betrachtet man die β APP-Färbung zum Zeitpunkt t=0 min (keine Endozytose,

Zellen auf Eis) erhält man eine β APP-Zelloberflächenfärbung (Abb. 28, APP, 0 min). Inkubiert man die Zellen anschließend 7 min bei 37 °C und erlaubt so eine Rezeptorendozytose, wird β APP in die endosomalen Kompartimente transportiert. Folglich war keine β APP-Zelloberflächen-markierung mehr zu sehen, stattdessen kolokalisierte β APP nun mit EEA1, was auf eine endosomale Lokalisierung von β APP schließen ließ (Abb. 28, APP, 7 min). Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus ist es möglich, β APP der Zelloberfläche zu markieren und seine Endozytose zu verfolgen.

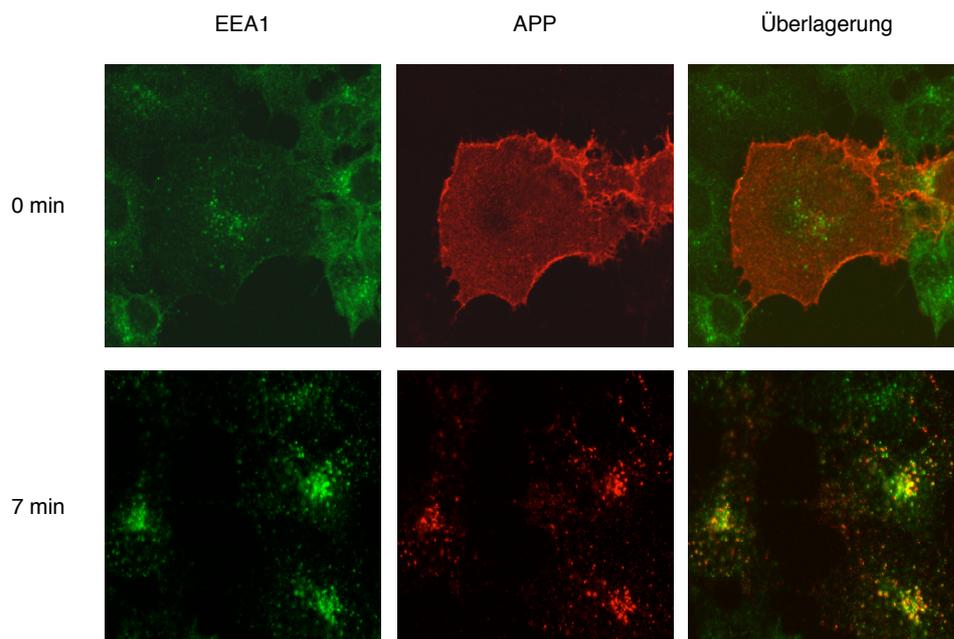


Abbildung 28: Prinzip des β APP-Endozytose-Versuchs

COS-Zellen wurden transient mit β APP695 transfiziert und unter der Verwendung spezifischer Antikörper für β APP (5313) bzw. dem endosomalen Marker Early Endosomal Antigen 1 (EEA1) für die Fluoreszenzmikroskopie markiert. Versuchsaufbau sowie hier gezeigte Bilder stammen von Stephanie Neumann (siehe auch (Neumann *et al.*, 2006)).

Inkubierte man die Fluorophor-markierten Zellen für unterschiedlich lange Zeitpunkte bei 37 °C, konnte die β APP-Endozytose – beispielsweise durch Kolokalisation mit endosomalen Markern wie EEA1 verfolgt werden (Abb. 28). Um eine Aussage für den Einfluss von SNX33 auf die β APP-Endozytose treffen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Kollegin Stephanie Neumann COS-Zellen mit β APP695 und SNX33-GFP kotransfiziert und die β APP-Endozytose zu unterschiedlichen Zeitpunkten überprüft. SNX33-GFP-exprimierende Zellen (Abb. 29, Pfeil 1b, grüner Kanal) zeigten auch nach 20 Minuten noch eine β APP-Zelloberflächenmarkierung, es waren keine bzw. kaum endozytotische Vesikel zu erkennen, die β APP beinhalten (Abb. 29, 1a, roter Kanal). Zellen, die kein SNX33-GFP exprimierten

(Abb. 29, Pfeil 2b, grüner Kanal) zeigten zu diesem Zeitpunkt vesikuläres β APP, es konnte kaum noch β APP an der Zelloberfläche beobachtet werden (Abb. 29, Pfeil 2a, roter Kanal).

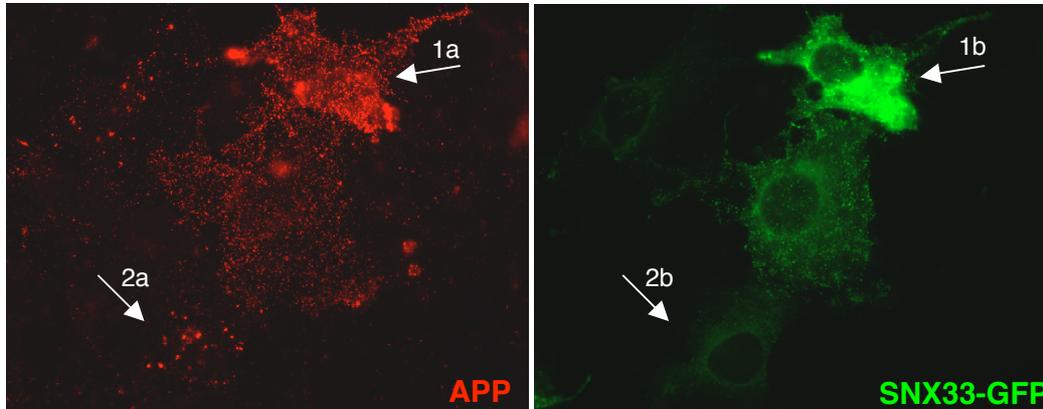


Abbildung 29: SNX33-GFP inhibiert die Endozytose von β APP695 in COS-Zellen

COS-Zellen wurden mit SNX33-GFP und β APP695 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das β APP-Endozytose Experiment durchgeführt. Diese Abbildungen zeigen die Menge an internalisiertem β APP nach 20 Minuten. Der rote Kanal zeigt fluorescent markiertes β APP, in grün sind SNX33-GFP-exprimierende Zellen dargestellt. 1a bzw. 1b deuten auf eine Zelle, die starke SNX33-Überexpression zeigt, Pfeil 2a und 2b markieren eine Zelle, die kein SNX33-GFP exprimiert.

Der Grad der Endozytosehemmung korrelierte in diesem Experiment mit der SNX33-GFP-Expressionsintensität (Abb. 29). Um ein repräsentatives Ergebnis der gesamten Zellpopulation zu erhalten, wurden pro untersuchtem Zeitwert mindestens 30 schwach-, 30 mittel- und 30 stark-exprimierende Zellen auf Endozytoseinhibition untersucht. Diese Auszählung wurde unter „einfach blinden“ Bedingungen durchgeführt. β APP-Endozytosehemmung entsprach dabei einer β APP-Zelloberflächen-Markierung wie im APP-Rotkanal „Pfeil 1a“ gezeigt (Abb. 29), β APP-Endozytose wurde durch das Auftreten endozytotischer Vesikel charakterisiert, dargestellt wie bei „Pfeil 2a“ im APP-Rotkanal (Abb. 29).

Bereits nach 7 Minuten konnte eine SNX33-GFP-abhängige Endozytosehemmung beobachtet werden, nur etwa 30% des Oberflächen-markierten β APP wurden endozytiert, wohingegen bei Kontroll-transfizierten Zellen, die nur GFP exprimieren, bereits 60% des markierten β APP internalisiert waren (Abb. 30). Nach 35 Minuten war in den Kontrollzellen fast 100% des β APP internalisiert, es konnte keine β APP-Oberflächenfluoreszenz mehr beobachtet werden. Die β APP-Internalisierungsrate bei SNX33-GFP-transfizierten Zellen betrug zu diesem Zeitpunkt jedoch nur etwa 50% (Abb. 30, schwarze Balken).

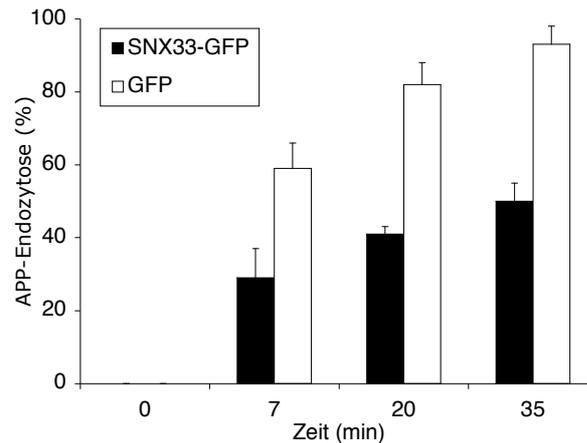


Abbildung 30: Auswertung des β APP-Endozytose-Versuchs bei SNX33-GFP-Expression

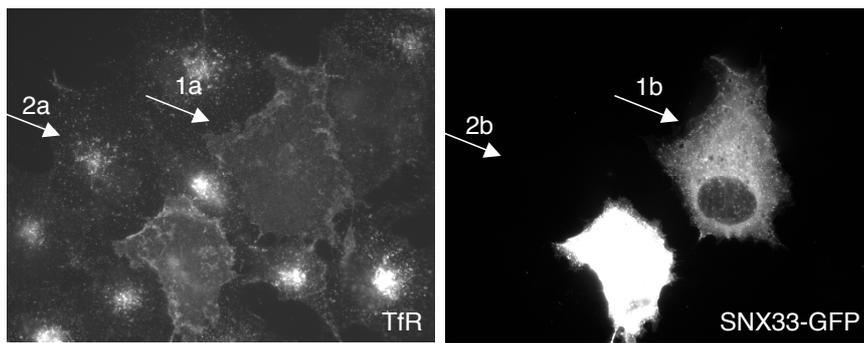
Für diese Graphik wurde die β APP-Endozytose unter SNX33-GFP Überexpressionsbedingungen (schwarze Balken) in COS-Zellen zum Zeitpunkt $t=0$ min, 7 min, 20 min und 35 min untersucht. Als Kontrolle dienten GFP-exprimierende Zellen (weiße Balken). Pro Zeitpunkt und Konstrukt wurden mindestens 90 Zellen unter „einfach blinden“ Bedingungen ausgewertet. Dabei waren schwach, mittel und stark-exprimierende Zellen vertreten. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Abweichung von drei unabhängigen Experimenten.

SNX33-GFP Expression führte also zu einer etwa 50% -igen Abnahme der β APP-Endozytose in COS-Zellen.

4.4.2 SNX33-GFP inhibiert die Transferrinrezeptor-Endozytose

Um herauszufinden, ob der Effekt von SNX33-GFP spezifisch auf die Internalisierung von β APP wirkt, oder aber generelle Endozytoseprozesse hemmt, wurde das Endozytose-Experiment von 4.4.1 wiederholt, jedoch wurde nun der Einfluss von SNX33-GFP auf die Transferrinrezeptor (TfR)-Endozytose untersucht. Der TfR ist ein TypII-Transmembran-Protein, das Dynamin-abhängig über ein Tyrosin-basierendes Motiv internalisiert wird (Altschuler *et al.*, 1998; Kasai *et al.*, 1999). Durch Inkubation der Zellen mit einem Fluorophor-markierten Liganden (Alexa555-Transferrin) ließ sich der TfR sehr gut markieren und seine Internalisierung mikroskopisch verfolgen (Abb. 31A).

A)



B)

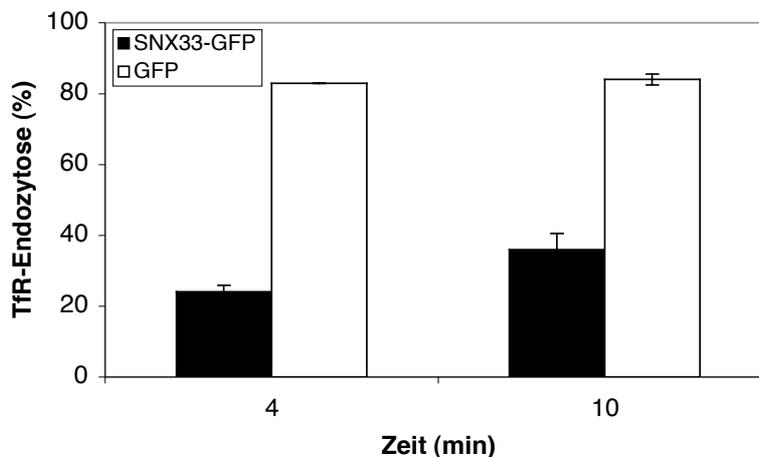


Abbildung 31: SNX33-GFP inhibiert die Endozytose des Transferrin-Rezeptors (TfR)

Der Effekt von SNX33-GFP und GFP auf die Transferrinrezeptor-Endozytose wurde in COS-Zellen untersucht.

A) Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von SNX33-GFP-transfizierten COS-Zellen zum Zeitpunkt $t=10$ Minuten. „Pfeil 1a“ zeigt die TfR-Markierung einer nicht-transfizierten COS-Zelle, „Pfeil 2a“ zeigt eine transfizierte Zelle im selben Kanal. „Pfeile 1b“ und „Pfeil 2b“ markieren die entsprechenden Zellen im Grünkanal und zeigen die Expressionslevel von SNX33-GFP.

B) Graphische Darstellung der Auswertung des TfR-Endozytose-Versuchs. Dargestellt ist der Einfluss von SNX33-GFP (schwarz) und GFP (weiß) auf die TfR-Internalisierung in Abhängigkeit der Zeit.

Pro Zeitpunkt und Konstrukt wurden mindestens 90 Zellen unter „einfach blinden“ Bedingungen ausgewertet. Die Ergebnisse spiegeln den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten wieder.

SNX33-GFP-Expression führte zur Inhibition der Endozytose des endogenen Transferrin-Rezeptors. Nach 4 Minuten zeigten ca. 80% der Kontroll-transfizierten Zellen (GFP) TfR-Aufnahme in endozytotische Vesikel, wohingegen nur ca. 20% der SNX33-GFP-transfizierten Zellen TfR-Endozytose zeigten (Abb. 31B). Die Transferrinrezeptor-Internalisierung in diesen Zellen wurde jedoch nicht komplett inhibiert, sondern fand stark verlangsamt statt. Zum Zeitpunkt $t=10$ min zeigten etwa 30% der SNX-GFP-transfizierten Zellen eine Aufnahme des TfR in endozytotische Vesikel, wohingegen GFP-transfizierte

Zellen die maximale Aufnahme rate von ca. 80% bereits nach 4 Minuten erreicht hatten (Abb. 31B).

Mit Hilfe des β APP-Internalisierungs-Experiments in Kombination mit dem Transferrinrezeptor-Endozytose-Versuch konnte gezeigt werden, dass SNX33-GFP-Expression in COS-Zellen keinen spezifischen Einfluss auf die β APP-Internalisierung ausübt, sondern auch die Internalisierung weiterer Proteine inhibiert.

4.5 SNX33 interagiert mit Dynamin

SNX33-GFP-Expression führte zu einer etwa 30-50% -igen Inhibition der Endozytose (Abb. 30 und 31), von der sowohl β APP als auch der Transferrin-Rezeptor betroffen waren. Eine generelle Endozytose-Inhibition nach SNX33-Expression und eine damit einhergehende β APP-Akkumulation an der Plasmamembran könnte auch eine Zunahme der sAPP α -Sekretion erklären (Abb. 25 und 26), da α -Sekretasen vor allem an der Plasmamembran aktiv sind (Sisodia, 1992), wohingegen β -Sekretasen den sauren pH-Wert der Endosomen als pH-Optimum vorziehen (Vassar, 2001). Ein modulatorischer Einfluss auf die β APP-Proteolyse konnte in vorangegangenen Experimenten durch SNX33-Expression (Abb. 13 und 22), nicht aber bei Transfektion der SNX33- Δ SH3-Mutante nachgewiesen werden (Abb. 23). Vermutlich handelt es sich bei der SH3-Domäne um eine regulatorisch wichtige Domäne von SNX33, die einen Einfluss auf endozytotische Prozesse besitzt. Da SH3-Domänen Protein-Interaktions-Domänen sind (Mayer, 2001) wurde unter der Durchführung von Koimmunpräzipitations-Experimenten nach potentiellen Interaktoren von SNX33 gesucht. Da sowohl die Endozytose des Transferrin-Rezeptors als auch die Endozytose von β APP in einem Dynamin-abhängigen Prozess erfolgt, und die Internalisierung beider Proteine unter SNX33-Expression inhibiert war (Abb. 30 und 31B), wurde Dynamin als möglicher Interaktionspartner von SNX33 untersucht. Dynamin ist eine GTPase mit zentraler Bedeutung in der Endozytose. Es katalysiert unter anderem die Abschnürung von Clathrin-ummantelten Vesikeln von der Plasmamembran. Dynamin besitzt eine Prolin-reiche Domäne, die unter anderem mit SH3-Domänen regulatorischer Proteine interagieren kann. Da SNX33 ebenfalls eine SH3-Domäne besitzt und auch für SNX9 bereits eine Interaktion mit Dynamin beschrieben ist (Lundmark and Carlsson, 2003), wurde untersucht, ob die Endozytosehemmung von SNX33 über eine Interaktion mit Dynamin vermittelt wird.

4.5.1 SNX33-HA koimmunopräzipitiert mit Dynamin

Um SNX33 als Interaktionspartner von Dynamin nachzuweisen, wurden HEK293-Zellen mit SNX33-HA und Dynamin kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion der Plasmide wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt (Abb. 32).

Da SNX33 potentiell mittels der SH3-Domäne mit Dynamin interagiert, wurde zudem eine Interaktion zwischen der Deletionsmutante SNX33- Δ SH3-HA und Dynamin überprüft. Zur Überprüfung der Versuchsbedingungen wurde eine Koimmunpräzipitation zwischen SNX9 und Dynamin-1 durchgeführt, da diese Interaktion bereits in der Literatur beschrieben ist (Lundmark and Carlsson, 2003; Lundmark and Carlsson, 2004). Eine Dynamin-Kotransfektion mit der Proteinkinase C α (PKC α), Dynamin-Kotransfektion mit Vektor ohne Insert (Kontrolle) bzw. mit nicht transfizierten Zellen (Mock) dienten in diesem Experiment als Negativkontrolle. PKC α wurde als Negativkontrolle gewählt, da es sich dabei auch um ein zytosolisches Protein handelt. Eine Interaktion von PKC α und Dynamin ist in der Literatur nicht beschrieben.

Abbildung 32 zeigt eine Koimmunopräzipitation von HA-konjugiertem SNX33 mit Dynamin. Diese Interaktion war in beide Richtungen nachweisbar, d.h. nach einer Dynamin-Immunpräzipitation wurde SNX33 im HA-Blot erkannt, aber auch nach einer HA-Immunpräzipitation konnte Dynamin im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 32). Interessanterweise konnte keine Dynamin-SNX33-Interaktion nachgewiesen werden, wenn das Deletionskonstrukt SNX33- Δ SH3-HA verwendet wurde (Abb. 32). Diesem Konstrukt fehlt die SH3-Domäne, was zeigt, dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen über die SNX33-SH3-Domäne vermittelt wurde. Diese Beobachtung ist sehr gut mit den Ergebnissen der β APP-Proteolyse vereinbar, da in diesen Experimenten keine Modulation der β APP-Proteolyse nach Transfektion der SNX33- Δ SH3-HA-Mutante nachgewiesen werden konnte (Abb. 23).

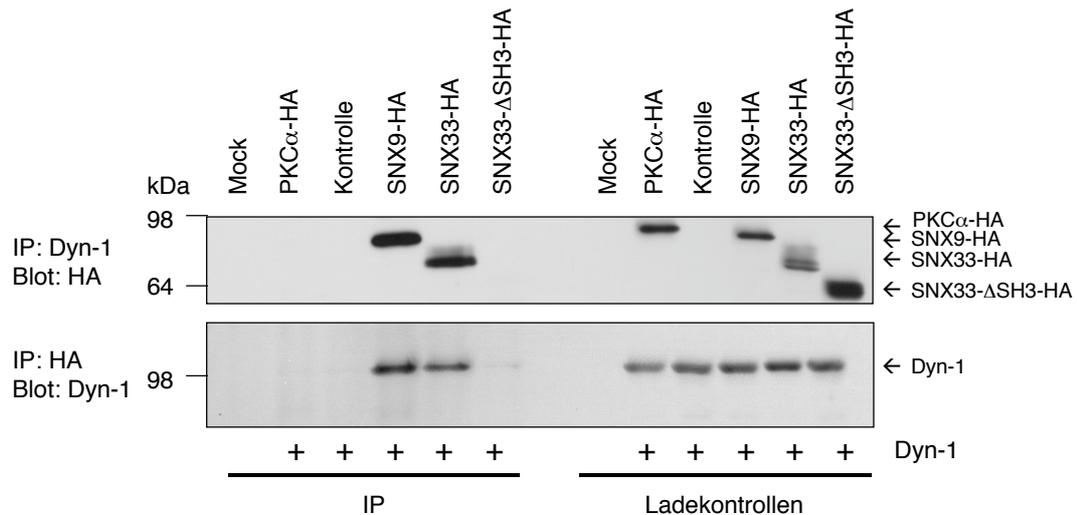


Abbildung 32: Koimmunpräzipitation von SNX33-HA mit Dynamin-1

HEK293-Zellen wurden transient mit Dynamin-1 (Dyn-1) und den angegebenen Konstrukten kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen. Die Immunpräzipitation (IP) und anschließende Western Blot-Analyse erfolgte wie unter „Material und Methoden“ beschrieben. Links sind die durchgeführten Koimmunpräzipitations-Experimente gezeigt, rechts die entsprechenden Ladekontrollen. Dabei entsprechen die Ladekontrollen 1/25 der Menge, die für die Koimmunpräzipitation eingesetzt wurden. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen Western Blot von drei unabhängigen Experimenten.

Die bereits publizierte SNX9-Dynamin-Koimmunpräzipitation (Lundmark and Carlsson, 2003) konnte ebenfalls reproduziert werden. Die verwendeten Negativkontrollen PKC α bzw. Mock (nicht transfizierte Zellen) zeigten keine Dynamin-Interaktion, was die Spezifität der SNX33-Dynamin bzw. SNX9-Dynamin-Interaktion unterstreicht.

4.5.2 Dynamin-Expression reduziert den von SNX33 induzierten Effekt auf die β APP-Spaltung

Unter 4.5.1 wurde eine Interaktion zwischen SNX33 und Dynamin beschrieben, die durch die SH3-Domäne von SNX33 vermittelt wurde. Die Überexpression von SNX33 führte zu einer Inhibition der Endozytose von β APP sowie des Transferrinrezeptors (siehe 4.4), beide Proteine werden in einem Dynamin-abhängigen Prozess endozytiert. Es ist also wahrscheinlich, dass SNX33 unter Überexpressionsbedingungen sämtliches Dynamin der Zelle mittels der SH3-Domäne bindet und inaktiviert, was in Folge dessen einen Dynamin-Funktionsverlust und eine Inhibition Dynamin-abhängiger Endozytoseprozesse mit sich bringen würde. Für SNX9 konnte gezeigt werden, dass unter endogenen Bedingungen ca. 25% des Dynamins in der Zelle im Komplex mit SNX9 vorliegen (Lundmark and Carlsson,

2004). SNX9-komplexiertes Dynamin ist im Zytosol lokalisiert und kann seine Funktion an der Plasmamembran bei Clathrin-vermittelter Endozytose nicht mehr erfüllen. Unter Überexpressionsbedingungen erscheint es möglich, dieses natürliche Gleichgewicht zu verschieben. Es ist vorstellbar, dass ein großes Angebot an SNX33 in der Zelle einen größeren Anteil Dynamin bindet, als es unter endogenen Bedingungen der Fall wäre.

Ist diese Hypothese richtig, sollte der Effekt von SNX33 auf die Endozytose und somit auf die β APP-Proteolyse durch ein Überangebot an Dynamin rückgängig gemacht werden können. Das bedeutet, dass unter SNX33- und Dynamin-Überexpression beide Komponenten im Überschuss vorliegen, so dass erneut nur ein Teil des Dynamins im Komplex mit SNX33 vorliegen würde und somit seiner physiologischen Funktion nachgehen kann. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden SNX33-HA und Dynamin-HA in der AP-APP-Reporterzelllinie koexprimiert und die alkalische Phosphatase-Aktivität im Überstand dieser Zellen bestimmt. Koexpression von SNX33-HA zusammen mit GFP (GFP dient in diesem Fall als Kontrollplasmid), führte zu einer etwa sechsfachen Zunahme der relativen Alkalischen Phosphatase-Aktivität (Abb. 33). Kotransfektion von Dynamin (Dyn-HA) reduzierte den Spaltungs-induzierenden Effekt von SNX33 auf β APP um 50%, es wurde eine circa dreifache Zunahme gemessen (Abb. 33).

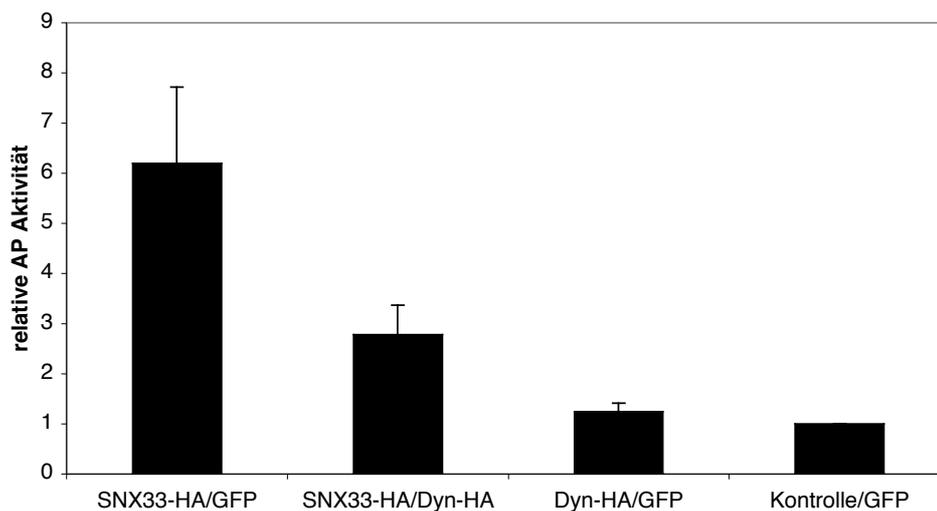


Abbildung 33: SNX33- und Dynamin Ko-Expression in der AP-APP-Reporterzelllinie

Die AP-APP-Reporterzelllinie wurde mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität im Überstand der Zellen bestimmt. „Kontrolle“ bezeichnet einen Kontrollvektor, „GFP“ beschreibt einen Vektor, der nur GFP exprimiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelwerten ausgeführt worden sind.

Transfektion von Dynamin mit dem Plasmid GFP bzw. einem Vektor ohne Insert („Kontrolle“) zusammen mit GFP führte zu keiner signifikanten Zunahme der alkalischen Phosphatase-Aktivität (Abb. 33). SNX33-Dynamin-Koexpression führte also zu einer partiellen Aufhebung des Effekts von SNX33 auf die Proteolyse von AP-APP, was eine mögliche Interaktion zwischen SNX33 und Dynamin bestätigt.

Der Effekt einer SNX33-Dynamin-Koexpression auf die sAPP α -Spaltung wurde anschließend mittels Western Blot Analyse untersucht, um das Ergebnis aus Abbildung 33 zu überprüfen. Dafür wurden HEK293-Zellen mit den unter Abbildung 33 aufgeführten Konstrukten transfiziert und die sAPP α -Bildung untersucht. Auch in diesem Experiment führte die SNX33-Dynamin-Koexpression zu einer Abnahme der sAPP α -Bildung (Abb. 34A, 1/2).

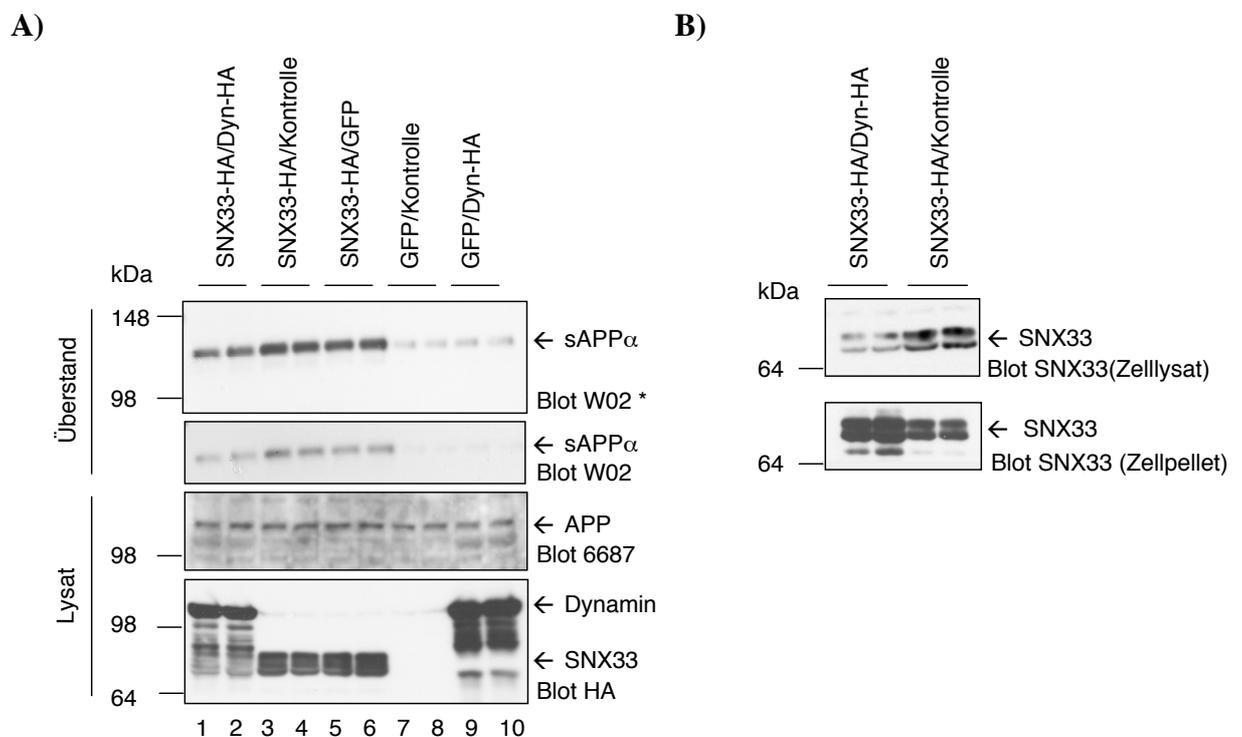


Abbildung 34: Analyse des Effekts der SNX33-HA- und Dynamin-Koexpression auf die sAPP α -Generierung im Western Blot

A) HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde der Zellüberstand auf sAPP α -Bildung mittels Western Blot-Analyse analysiert (Blot W02). Zelllysate wurden auf Gesamt- β APP-Level (Blot 6687) sowie SNX33-Expression (Blot HA) untersucht. Der HA-Antikörper detektiert in Bahn 1 und 2 sowohl HA-konjugiertes SNX33 als auch HA-konjugiertes Dynamin. Dargestellt sind repräsentative Western Blots, die Durchführung des Experiments erfolgte in Doppelwerten und wurde dreimal durchgeführt. „sAPP α (W02) *“ zeigt eine längere Exposition des Western Blots sAPP α (W02).

B) Western Blot-Analyse der SNX33-Lokalisierung bei Dynamin-Koexpression. SNX33-HA wurde mit Dynamin-HA bzw. mit einem Kontrollvektor in HEK293-Zellen transfiziert. Die Menge an SNX33 im Lysat bzw. im Zellpellet nach Zentrifugation wurde mittels des SNX33-67-Antikörpers nachgewiesen.

Als Kontrolle wurde die Expression von Dynamin mit GFP (Kontrollvektor) getestet. Diese führte zu keiner Zunahme von sAPP α (Abb. 34A, 9/10), SNX33HA-Transfektion in Kombination mit GFP (Kontrollvektor) führte zu der bereits mehrfach beobachteten Zunahme der sAPP α -Bildung (Abb. 34A, 3/4 und 5/6).

Interessanterweise konnten in Abbildung 34A im HA-Blot unterschiedliche SNX33-Expressionslevel nach Dynamin-Kotransfektion im Zelllysat nachgewiesen werden, obwohl in alle Ansätze die gleiche Menge SNX33-cDNA transfiziert wurde (Abb. 34A, HA-Blot, 1/2 mit 3/4). Dieser Effekt konnte in jedem der drei durchgeführten, unabhängigen Experimente beobachtet werden. Um zu verstehen, weshalb SNX33-Dynamin-koexprimierende Zellen weniger SNX33 im Zelllysat besitzen, wurde die Menge an löslichem SNX33 im Zelllysat im Vergleich mit der SNX33-Menge im verbleibenden Zellpellet nach Zentrifugation untersucht. Abbildung 34B zeigt eine deutliche Umverteilung der SNX33-Mengen nach Dynamin-Transfektion. Die gemeinsame Transfektion beider Plasmide reduzierte den löslichen SNX33-Anteil der Zelle, wohingegen ein größerer Anteil SNX33 im Zellpellet zu detektieren war. Möglicherweise führte SNX33 unter Dynamin-Kotransfektion zur Bildung hochmolekularer Komplexe, was erklären könnte, weshalb nach einer Zentrifugation mehr SNX33 im unlöslichen Zellpellet und weniger lösliches Protein detektierbar war. Die Bildung hochmolekularer Komplexe konnte für das homologe Protein SNX9 nachgewiesen werden. SNX9 ist in der Lage, Komplexe zu bilden, die ein Molekulargewicht von ca. 1 MDa besitzen (Lundmark and Carlsson, 2005). Es ist auch vorstellbar, dass SNX33 durch eine Bindung an das Zytoskelett an der Ausbildung hochmolekularer Strukturen verwickelt ist, da ebenfalls für SNX9 gezeigt werden konnte, dass es eine Bindung mit dem Protein N-WASP (neuronales Wiscott-Aldrich Syndrome Protein) bzw. WASP eingehen kann (Badour *et al.*, 2007; Worby *et al.*, 2001). WASP ist ein wichtiger Modulator der Aktin-Polymerisierung und besitzt in Folge dessen eine wichtige Funktion bei der Ausbildung zellulärer Strukturen. Durchgeführte Immunfluoreszenzmikroskopie-Studien unter SNX33- und Dynamin-Koexpression deuteten ebenfalls auf eine Interaktion beider Proteine hin, es konnte die Bildung großer Strukturen in COS-Zellen beobachtet werden, die Dynamin- sowie SNX33-positiv waren (Daten nicht gezeigt).

Die Abnahme an sekretiertem sAPP α nach Dynamin- und SNX33-Koexpression war also keine Folge einer geringeren SNX33-Expression, sondern konnte auf eine partielle Wiederherstellung der Dynamin-Funktion zurückgeführt werden („rescue“). Alle Zellen

enthielten gleiche SNX33-Mengen, die jedoch unter Dynamin-Kotransfektion zum Großteil in der unlöslichen Fraktion zu finden waren (Abb. 34B).

4.6 Analyse der endogenen SNX33-Funktion

Die „RNA-Interferenz-Technik („siRNA“; small interfering RNA) ist eine neue, gut geeignete Methode, die Expression gewünschter Proteine zu reduzieren (Meister and Tuschl, 2004; Tuschl *et al.*, 1999). Um Rückschlüsse auf die endogene Funktion von SNX33 ziehen zu können, wurden zwei siRNA-Oligonukleotide ausgewählt, die eine spezifische Reduktion („Knock-Down“) der endogenen SNX33-Menge in HEK293-Zellen ermöglichen. Außerdem wurde ein SNX33-RNAi-Oligonukleotid-Mix („pool“) verwendet, der vier unterschiedliche siRNAs zum Knock-Down von SNX33 beinhaltet. Die Sequenz der RNAi-Oligonukleotide des „SNX33-pools“ wurden von der Firma Dharmacon nicht mitgeteilt. Abbildung 35 zeigt die Bindungsregionen der RNAi-Oligonukleotide SNX33-a und SNX33-b in der SNX33-Domänenstruktur.

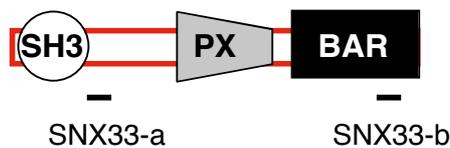


Abbildung 35: Bindungsbereiche der ausgewählten siRNA-Oligonukleotide zur Reduktion endogener SNX33-Level in HEK293-Zellen

Schematische Darstellung der Bindungsstellen von siRNA SNX33-a und SNX33-b.

Zunächst sollte die Funktionalität der ausgewählten siRNA-Oligonukleotide getestet und die effektivste Methode zur Transfektion der siRNA herausgefunden werden. Als Transfektionsreagenzien für siRNA-Oligonukleotide wurden Oligofectamin (Invitrogen) und Lipofectamin (Invitrogen) getestet. Da die Transfektion der siRNAs mittels Lipofectamin die besten Resultate brachte, wurden alle in dieser Arbeit gezeigten siRNA-Knock-Down-Experimente unter der Verwendung von Lipofectamin durchgeführt. HEK293-Zellen, die unter der Verwendung von Lipofectamin mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert wurden, zeigten keinerlei toxischen Effekte. Bei der Lipofectamin-Transfektion war die Knock-Down-Effizienz abhängig von der Zelldichte sowie dem allgemeinen Zustand der Zellen, als auch von der Qualität der transfizierten siRNA-Oligonukleotide.

4.6.1 SNX33 Knock-Down hat keinen Einfluss auf die β APP-Proteolyse

Da SNX33 mit Hilfe des Expressionsklonierungs-Screens als Aktivator der β APP-Spaltung identifiziert werden konnte, wurde nun untersucht, ob der Knock-Down dieses Proteins ebenfalls eine Auswirkung auf die Proteolyse von β APP besitzt. Dafür wurden HEK293-Zellen mit den entsprechenden siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und der Effekt auf die sAPP α - und sAPP β -Generierung, sowie auf Gesamt- β APP im Zelllysate überprüft. Des Weiteren wurde im Hinblick auf die genetische Redundanz auch der Effekt eines SNX9-Knock-Downs auf die β APP-Proteolyse analysiert. Mit Hilfe eines SNX9-Knock-Downs kann überprüft werden, ob eine siRNA-vermittelte Reduktion von SNX9 gleiche Auswirkungen auf zelluläre Prozesse – in diesem Fall speziell auf die β APP-Proteolyse – wie ein SNX33-Knock-Down besitzt. Abbildung 36 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Transfektion der siRNA-Oligonukleotide „SNX33-a“, „SNX33-b“ und „SNX33-pool“ führt zu einer deutlichen Reduktion endogener SNX33-Mengen in HEK293-Zellen (Abb. 36A, Blot 67). Dennoch konnte keine Änderung an sekretiertem sAPP α im Überstand nachgewiesen werden (Abb. 36A, Blot W02). Die Western Blots dieser Experimente wurden mehrfach wiederholt und quantifiziert, es konnte jedoch keine signifikante Änderung der sAPP α -Bildung beobachtet werden (Abb. 36C). Sekretierte sAPP β -Mengen waren nach einem SNX33-Knock-Down unter der Verwendung der SNX33-RNAi-Oligonukleotide „SNX33-b“ und „SNX33-pool“ minimal reduziert (Abb. 36A, Blot 192 Wt), es konnte jedoch keine signifikante Änderung nachgewiesen werden. Auch die Menge an gebildetem Gesamt- β APP im Zelllysate blieb unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen unverändert (Abb. 36A, Blot 22C11). Ein siRNA-vermittelter Knock-Down von SNX9 unter der Verwendung des Oligonukleotids „SNX9-b“ führte zu einer deutlichen Reduktion an endogenem SNX9 in transfizierten Zellen (Abb. 36B, Blot 6C6). Knock-Down von SNX9 zeigte ebenfalls keine Änderung der sAPP α -Sekretion (Abb. 36B, Blot W02), auch die Menge an β APP im Zelllysate war unter diesen Bedingungen unverändert (Abb. 36B, Blot 22C11). Im Vergleich mit Kontroll-transfizierten Zellen konnte eine minimale, jedoch nicht signifikante Abnahme der sAPP β -Bildung in SNX9-Knock-Down-Zellen beobachtet werden (Abb. 36B, Blot 192 Wt).

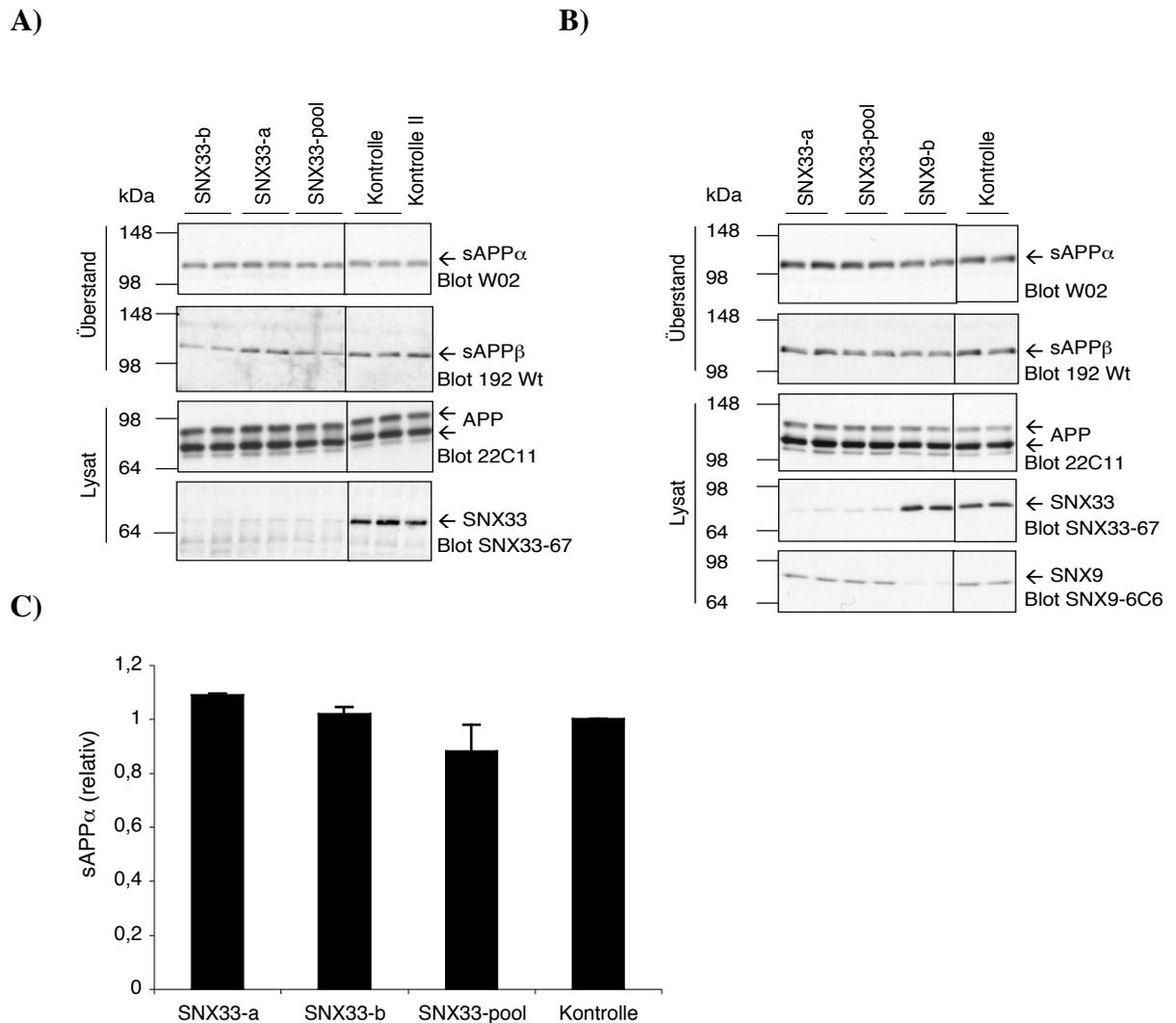


Abbildung 36: Analyse des Effekts von SNX33- und SNX9-Einzel-Knock-Down auf die Proteolyse von β APP

A) siRNA-Oligonukleotid SNX33-a, SNX33-b, ein Kontroll-Oligonukleotid sowie SNX33-pool („pool“ bezeichnet einen Mix von vier siRNA-Oligonukleotiden, die spezifisch gegen unterschiedliche Sequenzbereiche der angegebenen Gene gerichtet sind) wurden in HEK293-Zellen transfiziert und der Effekt auf die β APP-Spaltung mittels Western Blot Analyse untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurde einmal Wasser transfiziert („Kontrolle II“). Ebenfalls dargestellt ist die Knock-Down Effizienz von SNX33 (Blot 67).

B) Neben der Transfektion der siRNA-Oligonukleotide SNX33-a, SNX33-pool und einer RNAi-Kontrolle wurde zusätzlich ein SNX9-Einzel-Knock-Down durchgeführt und dessen Effekt auf die sAPP α - und sAPP β -Bildung untersucht. Nachweis von SNX9 erfolgte direkt aus dem Zelllysat unter der Verwendung des SNX9-6C6-Antikörpers.

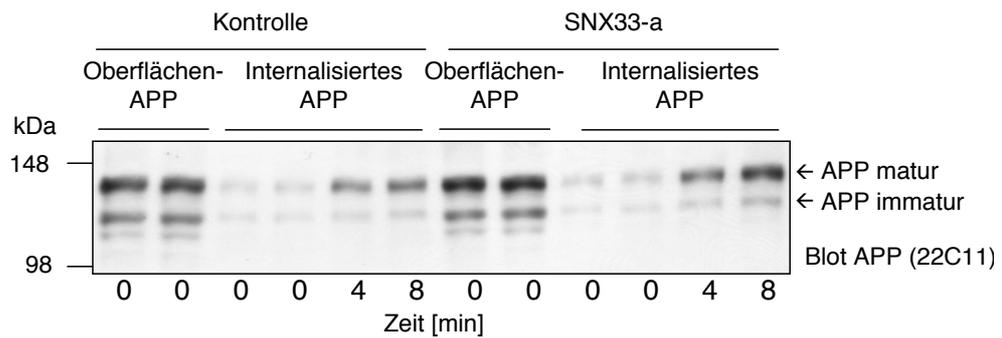
C) Unter der Verwendung von drei unterschiedlichen siRNA-Oligonukleotiden (SNX33-a, SNX33-b und SNX33-pool) wurde der Effekt des SNX33-Knock-Downs auf die sAPP α -Bildung in HEK293-Zellen mittels Western Blot Analyse untersucht und quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten, jedes Experiment wurde in Doppelwerten durchgeführt. Dargestellt ist die zur Kontrolle relative sAPP α -Signalintensität, normiert auf gemessene Aktin-Level der Zellen (Aktin-Blots nicht gezeigt).

Eine Immunpräzipitation von SNX33 erfolgte mittels des 2A1-Antikörpers, bevor ein Nachweis mittels des 67-Antikörpers im Western Blot erfolgen konnte. Weitere verwendete Antikörper sind angegeben. Das Experiment zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten. Die senkrechten eingefügten Linien symbolisieren, dass die Proben nicht direkt nebeneinander geladen wurden, sie stammen jedoch vom gleichen Gel bzw. Western Blot.

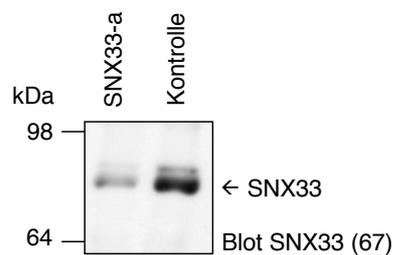
Im Gegensatz zur Überexpression von SNX33 (Abb. 22, 25 und 26) führte der Knock-Down von SNX33, als auch der Knock-Down von SNX9 zu keiner Zunahme der Bildung von sAPP α . Geht man anhand der Überexpressions-Daten davon aus, dass SNX33 ein für die Endozytose von β APP essentielles Protein ist, sollte auch im Knock-Down-Experiment ein Effekt auf die Endozytose-Rate und folglich auch auf die Spaltung von β APP nachweisbar sein. Da jedoch mittels Western Blot Analyse weder eine Änderung der sAPP α - noch der sAPP β -Bildung unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen nachweisbar war, kann man vermuten, dass auch die β APP-Endozytose-Rate unter diesen Bedingungen unverändert bleibt.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen mit dem siRNA-Oligonukleotid SNX33-a bzw. mit einem unspezifischen Kontroll-siRNA-Oligonukleotid transfiziert. Anschließend erfolgte eine Biotinylierung aller Zelloberflächenproteine, um die Aufnahme von maturem β APP in der Zelle verfolgen zu können. Ermöglicht man diesen auf Eis biotinylierten Zellen Endozytose, indem man sie für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert und anschließend das verbleibende Biotin der Plasmamembran entfernt, ist es möglich, die Menge an internalisiertem, biotinyliertem β APP der Zelle zu bestimmen. Mit Hilfe der durchgeführten β APP-Endozytose-Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen SNX33-a transfizierten Zellen und Kontroll-behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 37A und 37C).

A)



B)



C)

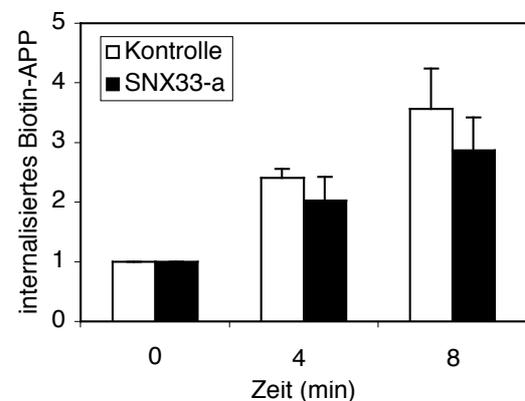


Abbildung 37: SNX33-Knock-Down hat keinen signifikanten Einfluss auf die β APP-Endozytose

A) HEK293-Zellen wurden mit SNX33-a- und Kontroll-siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, anschließend wurde ein β APP-Endozytose-Experiment durchgeführt. Die Untersuchung der Nullwerte wurde in Doppelwerten ausgeführt, „Oberflächen-APP“ zeigt die komplette Menge an Gesamt- β APP nach der Biotinylierung an der Zelloberfläche. Proben die mit „internalisiertes APP“ gekennzeichnet sind, wurden mit einem Puffer behandelt („cleavage buffer“), der die Biotinylierung der Zelloberflächenproteine nahezu vollständig entfernt. Die Analyse des aufgenommenen β APP erfolgte nach 0, 4 und 8 Minuten. Während des Vorgangs der Oberflächenbiotinylierung wurde auch ein geringer Anteil an immatorem β APP markiert, der möglicherweise durch das Vorhandensein von nicht-intakten Zellen verursacht wurde. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt, gezeigt ist der Western Blot eines repräsentativen Versuchs.

B) Nachweis des SNX33-Knock-Downs der für das in (A) gezeigte Experiment. Nach einer Immunpräzipitation mittels des 2A1-Antikörpers erfolgte ein Nachweis von SNX33 im Western Blot (Blot SNX33-67).

C) Graphische Darstellung der Menge an internalisiertem β APP unter SNX33-Knock-Down- bzw. Kontrollbedingungen. Zusammengefasst sind die Ergebnisse so wie die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Das Ergebnis des β APP-Endozytose-Experiments (Abb. 37) passt sehr gut mit den Daten der β APP-Proteolyse unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen zusammen. Wie erwartet, übte ein Knock-Down von SNX33 in HEK293 keinen inhibitorischen Effekt auf die β APP-Endozytose aus. Die Internalisierung von β APP sowie der Abbau dieses Proteins blieben von einem SNX33-Knock-Down unbeeinflusst. In Folge dessen konnte auch keine veränderte

β APP-Spaltung beobachtet werden (Abb. 36A). Eine Reduktion endogener SNX33-Mengen in HEK293-Zellen brachte folglich keinen Hinweis auf eine Änderung der Dynamin-abhängiger Endozytose mit sich. Es ist allerdings möglich, dass unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen die homologen Proteine SNX9 und SNX18 dessen Funktion übernehmen und in Folge dessen keine Effekte zu beobachten sind. Ein β APP-Internalisierungs-Experiment (Abb. 37) wurde auch unter SNX33/SNX9-Doppel-Knock-Down-Bedingungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte auch hier keine Änderung der β APP-Internalisierungsrate gemessen werden. Möglicherweise reicht das Vorhandensein von SNX18 aus, um eine regulierte Endozytose zu gewährleisten. Des Weiteren gilt zu beachten, dass die Effizienz eines Doppel-Knock-Downs nicht mit der eines Einzel-Knock-Downs zu vergleichen ist. Gleichzeitige Transfektion von zwei siRNA-Oligonukleotiden führte in der Regel zu einer SNX33-Reduktion von etwa 60 bis 70%, wohingegen ein SNX33-Einzel-Knock-Down eine Effizienz von ca. 80-90% erreichte (Abb. 38).

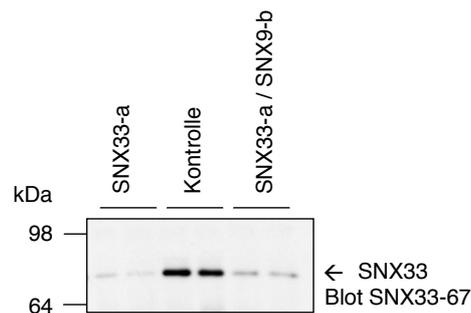


Abbildung 38: Lipofectamin-vermittelter Knock-Down von SNX33 in HEK293-Zellen nach Einfachtransfektion

HEK293-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotid SNX33-a oder Kontroll-Oligonukleotid transfiziert. Auch ein SNX33-SNX9-Doppel-Knock-Down wurde getestet. Ca. 60 Stunden nach Transfektion erfolgte Zellyse und Immunpräzipitation von SNX33 mittels des 2A1-Antikörpers. Für die Western Blot-Analyse wurde der SNX33-Antikörper (Blot SNX33-67) verwendet. Für alle Immunpräzipitationen wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt.

4.7 *In vivo*-Funktion von SNX33

Um Aufschluss über die *in vivo* Funktion von SNX33 zu erhalten, wurde eine Kooperation mit Dr. Maren Hertweck von der Universität Freiburg gestartet. Im Rahmen dieses Gemeinschaftsprojektes sollte die Funktion von SNX33 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*; *C.e.*) erforscht werden. *C. elegans* bietet gegenüber dem humanen Zellsystem den großen Vorteil, dass keine SNX33/SNX9/SNX18-Untergruppe vorhanden ist, im Fadenwurm existiert nur ein Gen, Ist-4, welches die größte Homologie zu SNX33 besitzt (Abb. 16). In Zellkulturexperimenten konnten nach einem SNX33-Einzel-Knock-Down keine Effekte bezüglich der Proteolyse von β APP beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.6), vermutlich können die homologen Proteine SNX9 und SNX18 einen Funktionsverlust von SNX33 kompensieren. Da ein Dreifach-Knock-Down von SNX33, SNX9 und SNX18 derzeit aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte, dieser aber für das Verständnis von SNX33 unabdinglich ist, sollte anhand des Modellorganismus *C. elegans* Aufschluss über die endogene Funktion von SNX33 erhalten werden. Mit Hilfe von Dr. Maren Hertweck war es möglich, Ist-4/SNX33 in *C. elegans* mittels der siRNA-Technik herunterzuregulieren und den auftretenden Phänotyp der Fadenwürmer zu analysieren.

Anhand der unter Kapitel 4.5 gezeigten Daten sind zwei unterschiedliche Szenarien bezüglich der Funktion von SNX33 vorstellbar. Geht man davon aus, dass die SNX33/SNX9/SNX18-Subgruppe eine essentielle Komponente einer regulierten Dynamin-Funktion darstellt, so sollte ein Knock-Down von Ist-4/SNX33 zu einer gestörten Dynamin-Funktion und in Folge dessen zu einem „Dynamin-Funktionsverlust“-Phänotyp führen. Ist die SNX33/9/18-Subgruppe jedoch nur für einen Teilbereich der Dynaminfunktion verantwortlich, sollte ein Knock-Down von Ist-4 keinen generellen Dynamin-Funktionsverlust-Phänotyp induzieren, sondern zu einer Störung spezifischer Prozesse in der Zelle führen.

Interessanterweise zeigte *C. elegans* nach erfolgtem Ist-4/SNX33-Knock-Down eine Fehlfunktion in der Insulin-Signaltransduktion. Diese äußerte sich darin, dass ca. 32% der RNAi-behandelten Würmer in das sogenannte „partielle Dauerstadium“ („partial Dauer formation“) eintraten, welches charakteristisch für eine defekte bzw. gestörte Insulin-Signal-Transduktion ist (Kimura *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997). *C. elegans* kann im Verlauf seiner Entwicklung von der Larve zum erwachsenen Wurm in das Dauerstadium eintreten und dort bis zu 6 Monate verweilen (Abb. 39), wenn dem Wurm umgebene Bedingungen für eine Weiterentwicklung nicht vorteilhaft sind. Solche Bedingungen können beispielsweise externe

4. Ergebnisse

Stressoren, ein Nährstoffmangel oder eine zu hohe Populationsdichte sein. Das Dauerstadium ist eine Phase, in welcher der Wurm besonders Stress-resistent ist und auch keine Nährstoffe benötigt. Das partielle Dauerstadium ist eine milde Form des Dauerstadiums und beschreibt einen Zustand des Fadenwurms, der zwischen der normalen Entwicklung und dem Dauerstadium liegt. Der Eintritt in das Dauer-Stadium wird vor allem durch zwei unterschiedliche Signalwege reguliert: den TGF β -Signalweg sowie den Insulin-Signalweg. Anhand genetischer Kopplungsanalysen von Dr. Maren Hertweck konnte ein Funktionsverlust des TGF β -Signalweges unter Ist-4/SNX33-Knock-Down-Bedingungen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt; Manuskript in Vorbereitung). Abbildung 39 zeigt eine schematische Darstellung des Lebenskreislaufs des Fadenwurms sowie des Insulin-Signalweges in *C. elegans*.

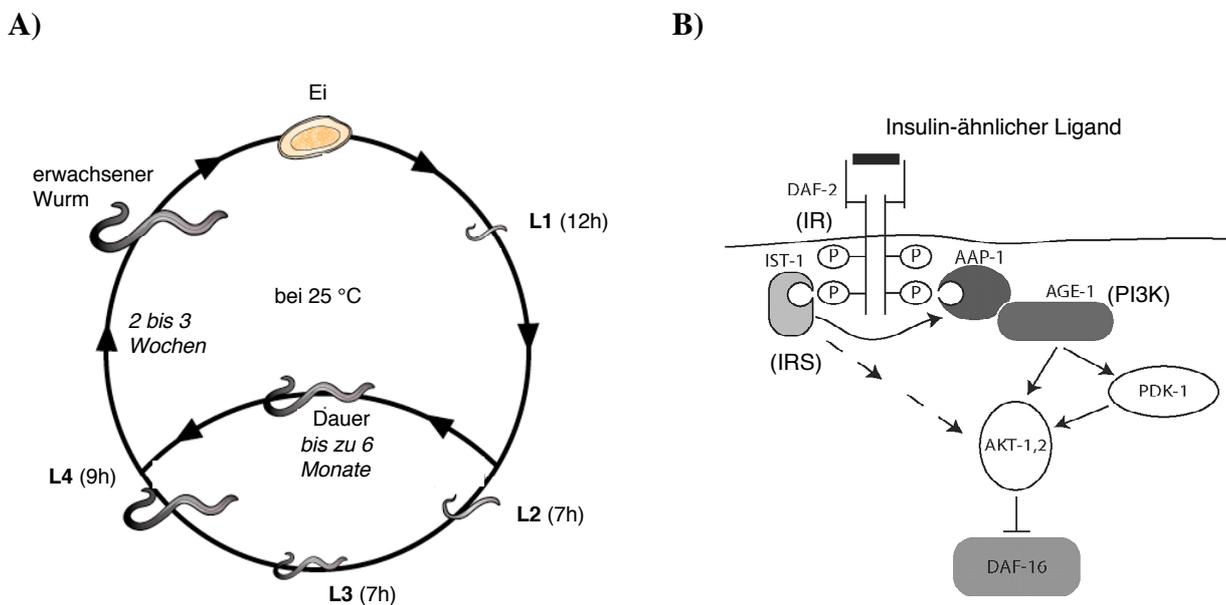


Abbildung 39: Lebenskreislauf und Insulinsignalweg in *C. elegans*

A) Lebenskreislauf des Fadenwurms *C. elegans* bei 25 °C. Eingezeichnet sind die Stadien der Larvenentwicklung (L1 bis L4) sowie die Dauer der einzelnen Phasen in der Entwicklung. Das Dauerstadium ist ein alternatives L3-Larvenstadium. Unter normalen Bedingungen (ohne Dauer-Pause) ist die Entwicklung vom Ei zum adulten Wurm nach drei Tagen abgeschlossen. Abbildung modifiziert nach www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/Longevity/.

B) Insulinsignalweg in *C. elegans*. Aktivierung des konservierten Signalweges führt zur Inhibition des Transkriptionsfaktors DAF-16, der für eine Initiation des Dauer-Stadiums verantwortlich ist.

IR: Insulinrezeptor (entspricht DAF-2 in *C.e.*), PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (entspricht AGE-1 in *C.e.*), IRS: Insulinrezeptor-Substrat (entspricht IST-1 in *C.e.*), AAP-1: ABL-associated Protein, PDK-1: Phospho-Inositide dependent kinase-1. Abbildung modifiziert nach Wolkow, J. Biol. Chem. 2002;277:49591-49597.

Einzel-Knock-Down von *lst-4/SNX33* führte zu einer partiellen Dauerbildung. Diese konnte bei etwa 32% der untersuchten *lst-4/SNX33*-Knock-Down-Würmer beobachtet werden (Tab. 17, Spalte 2). Wildtyp-Würmer zeigen bei 15 °C und stressfreien Umweltbedingungen keine Dauerbildung (Tab. 17, Spalte 1), nach ca. 3 Tagen ist die Entwicklung von der Larve zum erwachsenen Wurm abgeschlossen. Interessanterweise entsprach der Effekt keinem kompletten Funktionsverlust der Insulin-Signaltransduktion, der in einer Dauer-Bildung ersichtlich wäre. Eine wie in diesem Experiment beobachtete partielle Dauerbildung deutet auf eine Einschränkung dieses Signalweges hin. Das bedeutet, dass *lst-4/SNX33* kein essentielles Protein, sondern eine modulatorische Komponente dieses Signalwegs ist. Da nur etwa ein Drittel der analysierten *lst-4*-Knock-Down-Würmer eine partielle Dauerbildung zeigt, kann man folgern, dass auch ohne *lst-4/SNX33* Insulin-Signaltransduktion im Wurm stattfinden kann. Möglicherweise funktioniert dieser Signalweg nach einem *lst-4/SNX33*-Knock-Down nur eingeschränkt.

Durch die Verwendung von *C. elegans*-Stämmen mit Mutationen, die zu einem Funktionsverlust („loss of function“) der Insulin-Signaltransduktion führen, konnte eine genetische Kopplung zwischen *lst-4/SNX33* und *daf-2/IR* (Insulinrezeptor) und *lst-4/SNX33* und *pdk-1* („Phospho-Inositide dependent kinase-1“) nachgewiesen werden. Bei *daf-2/IR* und *pdk-1* handelt es sich um genetisch veränderte *C. elegans*-Stämme, die schwache Mutationen in den entsprechenden Genen besitzen (vgl. Abb. 39B). Das bedeutet, dass *daf-2/IR* und *pdk-1*-Würmer unter normalen Umweltbedingungen eine gewöhnliche Entwicklung analog den Wildtyp-Würmern zeigen (Tab. 17, Spalte 3 und 5), jedoch reagieren diese mutanten Stämme wesentlich sensitiver auf Stressoren. Ein Knock-Down von *lst-4/SNX33* im Stamm *daf-2/IR* bzw. *pdk-1* führte zu einer deutlichen Insulin-Fehlfunktion, die sich darin äußerte, dass 99,6% der untersuchten Würmer in das Dauer-Stadium eintraten (Tab. 17, Spalte 4 und 5). Dieses Ergebnis zeigt, dass *lst-4/SNX33* und Komponenten des Insulinsignalweges (*daf-2/IR* und *pdk-1*) gemeinsam in diesem Signalweg agieren, da weder ein *lst-4/SNX33*-Knock-Down alleine noch der mutante Stamm ohne weitere Behandlung diesen Phänotyp zeigt. Des Weiteren wurde der Einfluss eines *lst-4/SNX33*-Knock-Downs auf den *C. elegans*-Stamm *age-1/PI3K* (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase) untersucht. *Age-1/PI3K* exprimiert eine konstitutiv aktive Form der PI3-Kinase und zeigt in Folge dessen auch keine Dauerbildung (Tab. 17, Spalte 7). Wirkt *lst-4/SNX33* in der Insulinsignalkaskade unterhalb der PI3-Kinase, so sollte ein Knock-Down von *lst-4/SNX33* in diesem Stamm zu einer Dauerbildung führen. Interessanterweise übt ein Knock-Down von *lst-4/SNX33* in *age-1/PI3K* keinen Effekt auf die

4. Ergebnisse

Dauerbildung (Tab. 17, Spalte 8) aus, folglich agiert Ist-4/SNX33 oberhalb bzw. auf Höhe der PI3-Kinase im Insulinsignalweg. Tabelle 17 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Ist-4/SNX33-Knock-Downs in *C. elegans*. Alle in Tabelle 17 dargestellten Daten wurden in der Universität Freiburg von Dr. Maren Hertweck generiert.

Tabelle 17: Knock-Down von Ist-4/SNX33 in *C. elegans* führt zur partiellen Dauerbildung

Die Stämme daf-2/IR und pdk-1 besitzen schwache Mutationen in den entsprechenden Genen. Age-1/PI3K ist ein Stamm, der eine konstitutiv aktive Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase exprimiert. Alle untersuchten Fadenwürmer wurden bei 15 °C gehalten und untersucht. Die angegebenen Zahlenwerte beschreiben die Anzahl der Fadenwürmer in % des zugehörigen Phenotyps. Für das Verständnis der Tabelle besonders wichtige Ergebnisse sind in Fettschrift dargestellt. IR: Insulinrezeptor; PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase; pdk-1: Phospho-Inositide dependent kinase-1

^{a)} Anzahl der untersuchten Würmer.

^{b)} Alle gezeigten Ist-4/SNX33-Knock-Down-Experimente erfolgten transient durch RNAi-Fütterung.

IR: Insulinrezeptor; PI3K: PI3-Kinase.

Alle in dieser Tabelle dargestellten Daten stammen von Dr. Maren Hertweck der Universität Freiburg.

Spalte	SNX33	<i>C. elegans</i> Stamm	L4 Larven & erwachsene Würmer	Dauer-Stadium	partielles Dauerstadium	L1-Arrest	Anzahl ^{a)}
Ist-4/SNX33-Knock-Down verursacht partielle Dauerbildung							
1	+	Wildtyp	100	0	0	0	831
2	-	Ist-4/SNX33 ^{b)}	67,4	0	32,3	0,3	597
Ist-4/SNX33 Knock-Down in daf-2/IR verursacht Dauerbildung (⇒ Synergie ⇒ Ist-4/SNX33 und daf-2/IR agieren im gleichen Signalweg!)							
3	+	daf-2/IR	100	0	0	0	856
4	-	daf-2/IR; Ist-4/SNX33	0	99,6	0	0,4	889
Ist-4/SNX33 Knock-Down in pdk-1 verursacht Dauerbildung (⇒ Synergie ⇒ Ist-4/SNX33 und pdk-1 agieren im gleichen Signalweg!)							
5	+	pdk-1	95,0	4,4	0,6	0	792
6	-	pdk-1; Ist-4/SNX33	0,2	99,6	0	0,2	1090
Ist-4/SNX33-Knock-Down in age-1/PI3K verursacht keine Dauerbildung (⇒ keine Synergie ⇒ Ist-4/SNX33 wirkt oberhalb der PI3-Kinase!)							
7	+	age-1/PI3K	99,8	0	0	0,2	1076
8	-	age-1/PI3K; Ist-4/SNX33	99,7	0	0	0,3	981

Zusammenfassend konnte unter der Kooperation mit Dr. Maren Hertweck im Modellorganismus *C. elegans* gezeigt werden, Ist-4/SNX33 eine modulatorische Komponente der Insulin-Signaltransduktion in *C. elegans* ist. Abbildung 40 fasst die Daten der Tabelle 17 graphisch zusammen.

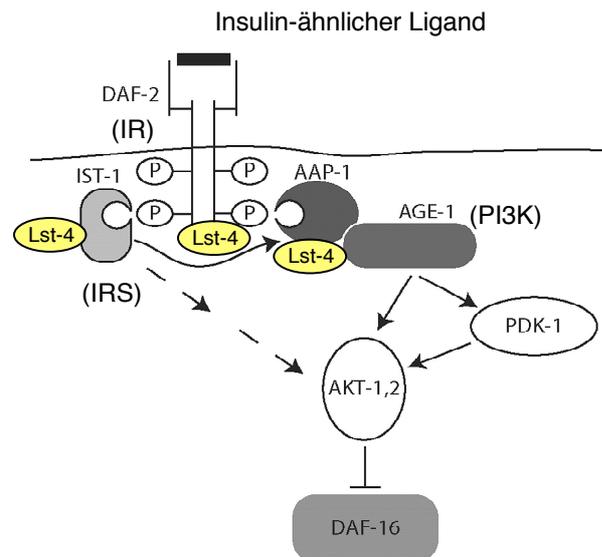


Abbildung 40: Mögliche Eingriffsstellen von *lst-4/SNX33* im Insulinsignalweg in *C. elegans*

Aufgrund der in Tabelle 17 gezeigten Daten kann ein Einfluss von *lst-4/SNX33* unterhalb der PI3-Kinase (*age-1*) ausgeschlossen werden. Möglicherweise moduliert *lst-4/SNX33* die Aktivität der PI3-Kinase, aber auch ein Einfluss von *lst-4/SNX33* auf das Insulinrezeptorsubstrat IRS (*lst-1*), AAP-1 sowie den Insulinrezeptor selbst (*daf-2*) ist anhand der generierten *C. elegans*-Daten möglich.

IR: Insulinrezeptor (entspricht DAF-2 in *C.e.*), PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (entspricht AGE-1 in *C.e.*), IRS: Insulinrezeptor-Substrat (entspricht IST-1 in *C.e.*), PDK-1: Phospho-Inositide-dependent Kinase 1. AAP-1: ABL-associated Protein. Abbildung modifiziert nach Wolkow, J. Biol. Chem. 2002;277:49591-49597.

Die bereits erwähnten Studien unter der Verwendung von *C. elegans*-Mutanten innerhalb des Insulinsignalwegs lassen eine *lst-4/SNX33*-Funktion im Signalweg oberhalb der PI3-Kinase (inklusive der PI3-Kinase selbst) vermuten (Tab. 17), das bedeutet jedoch nicht, dass es sich auch um die gleiche Zelle handeln muss. Da der Fadenwurm einen komplexen Zellverband darstellt, könnte es sein, dass *lst-4/SNX33* keinen direkten Einfluss auf die Insulin-Signalkaskade besitzt, aber die Insulin-Signal-sendende Zelle reguliert, indem es beispielsweise die Menge an sekretiertem Insulin kontrolliert. Die bereits erwähnte hohe mRNA-Expression von *SNX33* in Insulin-sensitiven Geweben wie Leber und Muskel (Abb. 20) spricht jedoch für eine Beteiligung von *lst-4/SNX33* in der Insulin-Signaltransduzierenden Zelle.

5. Diskussion

Auf der Suche nach neuen Modulatoren der β APP-Proteolyse wurde ein Expressionsklonierungs-Screen durchgeführt (Schobel *et al.*, 2006). Dafür wurde eine humane cDNA-Bibliothek in eine Reporterzelllinie transfiziert (siehe Kapitel 1.5), die einen schnellen Nachweis der β APP-Spaltung erlaubt. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte ein bislang nicht beschriebenes Gen identifiziert werden, dessen exogene Expression zu einer Zunahme an sekretiertem β APP führt. Das von diesem Gen kodierte Protein ist Mitglied der Sorting Nexin Familie, die bislang 33 Mitglieder beinhaltet, und wurde in einer kürzlich veröffentlichten Publikation Sorting Nexin 33 (SNX33) genannt (Seet and Hong, 2006). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte erstmals eine Charakterisierung sowie eine funktionelle Beschreibung von SNX33 durchgeführt werden. Es wurde gezeigt, dass SNX33 unter Überexpression ein Modulator der β APP-Proteolyse ist, der die Menge an sekretiertem β APP kontrolliert, indem es zu einer Hemmung Dynamin-abhängiger Endozytose führt. Des Weiteren konnte SNX33 als modulatorische Komponente der Insulin-Signal-Transduktionskaskade in *C. elegans* identifiziert werden. Im Rahmen dieser Diskussion sollen nun die unter SNX33-Überexpression generierten Daten sowie der SNX33-Knock-Down-Phänotyp analysiert und kritisch diskutiert werden.

5.1 Die Rolle der Endozytose bei der β APP-Proteolyse

In der Alzheimer Krankheit ist die Proteolyse des β -Amyloid Vorläufer Proteins (β APP) ein wichtiger Schritt, der die Entstehung von A β beeinflusst. Die Bildung von A β sowie die damit einhergehende A β -Aggregation sind dabei initiale Ereignisse, die im Krankheitsverlauf der Alzheimer Krankheit auftreten (Selkoe and Schenk, 2003). Die Tatsache, dass die nicht-amyloidogenen α -Sekretasen vor allem an der Plasmamembran (Sisodia, 1992) und die amyloidogene β -Sekretase bevorzugt im sauren pH-Bereich der Endosomen schneiden (Vassar, 2001), verdeutlicht den Einfluss einer regulierten Endozytose auf die β APP-Prozessierung. Bislang sind einige Publikationen erschienen (Carey *et al.*, 2005; Chyung and Selkoe, 2003; Eehalt *et al.*, 2003; Koo and Squazzo, 1994), die den Einfluss einer Endozytose-Inhibition auf die β APP-Prozessierung untersucht haben. Die veröffentlichten Ergebnisse stehen jedoch in teilweiseem Widerspruch, die exakte Auswirkung einer β APP-Endozytose-Hemmung ist noch nicht komplett verstanden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit führte eine durch SNX33-Überexpression induzierte Endozytosehemmung in drei unterschiedlichen Zellkultursystemen (HEK293, HEK293/APP695 und COS7/APP695) zu einer deutlichen Zunahme der sAPP α -Bildung, jedoch zeigten diese Zelllinien unterschiedliche Effekte bezüglich der sAPP β - und A β -Generierung. Es ist bekannt, dass die Inhibition der β APP-Internalisierung zu einer Zunahme von β APP an der Zelloberfläche (Haass *et al.*, 1993; Koo and Squazzo, 1994) und in Folge dessen zu einer verstärkten Bildung von sAPP α führt (Sisodia, 1992). Auch im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Experimente unter exogener SNX33 Expression konnten eine Inhibition der β APP Internalisierung mit einhergehender sAPP α -Zunahme nachweisen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Studien. Wie aber sind die unterschiedlichen Effekte in der sAPP β -Bildung zu erklären?

Für den gegensätzlichen Effekt bezüglich der sAPP β -Generierung in den unterschiedlichen Zelllinien (Abb. 26A und 26B, Blot 192 Wt) sind mehrere Erklärungen möglich. Zwar exprimieren beide Zelllinien β APP exogen, jedoch ist die Expression von β APP695 in den HEK293-Zellen wesentlich stärker als in den COS7-Zellen (etwa 5-10 fach). Möglicherweise führt eine starke β APP-Überexpression in diesem Zellsystem zu einer physiologisch falschen Lokalisierung bzw. veränderten Transport von β APP, was ein unterschiedliches Verhalten in der β APP-Proteolyse erklären könnte. Des Weiteren sind unter β APP-Überexpressionsbedingungen zytosolische Adaptorproteine wie Fe65 oder Mint, die für ein reguliertes β APP-Trafficking verantwortlich sind, limitierend. Man kann deshalb nicht ausschließen, dass β APP-Überexpression an sich zu einer veränderten Verteilung an α - und β -Spaltung führt. Letztendlich muss man noch anmerken, dass es sich bei der COS7-Zelllinie um eine Zelllinie aus Affen handelt, HEK293-Zellen hingegen sind eine humane Zelllinie. β APP-Überexpression in HEK293-Zellen zeigte nach SNX33-Kotransfektion ähnliche Effekte wie unter endogenen β APP-Mengen in der Zelle (Abb. 25). Möglicherweise beeinflussen weitere Faktoren in der Affenzelle die Spaltung von überexprimiertem humanem β APP. Es sind folglich mehrere Faktoren denkbar, die Ursache für unterschiedliche Effekte bezüglich der sAPP β -Generierung sein könnten. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Überexpression von SNX33 in allen drei getesteten System -HEK293, HEK293/APP695 und COS7/APP695- zu einer deutlichen Zunahme der sAPP α -Sekretion führte (Abb. 25 und 26A/B). Die Menge an detektiertem sAPP β variierte jedoch abhängig von der verwendeten Zelllinie sowie von der Menge an exprimiertem β APP. Es erscheint daher sinnvoll, die Proteolyse von endogenem β APP zu untersuchen, da diese Versuchbedingung der

physiologisch relevanten Situation in der Zelle am ehesten entspricht. Dies gilt natürlich nicht nur für die Expression von β APP, auch eine Überexpression von SNX33 entspricht nicht der physiologischen Situation in der Zelle, weshalb der Effekt von SNX33 auf die β APP-Proteolyse auch unter Knock-Down-Bedingungen untersucht wurde (Kapitel 4.6).

Unter endogener β APP-Expression in HEK293-Zellen führte SNX33-Expression zu einer deutlichen Zunahme der sAPP α -Bildung sowie zu einer minimalen Zunahme der sAPP β -Bildung (Abb. 25). Dieser beobachtete Effekt stimmt sehr gut mit einer bereits veröffentlichten Publikation überein. Chyung *et al.* konnten in HeLa-Zellen unter endogener β APP-Expression und DynaminK44A-induzierter Endozytosehemmung eine deutliche Zunahme der sAPP α -Spaltung sowie eine moderate Zunahme der sAPP β - und A β -Bildung nachweisen (Chyung and Selkoe, 2003). Mit Hilfe dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass die β -Prozessierung von β APP sowie die A β -Bildung auch an der Zelloberfläche stattfinden können (Chyung and Selkoe, 2003; Kinoshita *et al.*, 2003). Möglicherweise führt eine generelle Endozytosehemmung, ausgelöst durch Inhibition von Dynamin, neben einer Akkumulation von β APP auch zu einer Anreicherung der β -Sekretase BACE1 an der Plasmamembran, was eine Zunahme der sAPP β -Sekretion erklären würde. Dieser Befund entspricht der SNX33-Überexpression in HEK293-Zellen unter endogener β APP-Expression als auch unter β APP-Überexpression, die ebenfalls zu einer starken Zunahme der sAPP α -Bildung sowie zu einer leichten Zunahme der sAPP β -Bildung führt (Abb. 25 und Abb. 26B).

Die beobachtete leichte Zunahme von sAPP β unter exogener SNX33 Expression in HEK293-Zellen sowie die beobachteten Effekte auf die sAPP β -Bildung unter β APP-Überexpressionsbedingungen stehen teilweise im Widerspruch mit bereits publizierten Modellen der β APP-Prozessierung unter Endozytosehemmung (Carey *et al.*, 2005; Koo and Squazzo, 1994; Neumann *et al.*, 2006). Was sind mögliche Ursachen für die unterschiedlichen beobachteten Effekte? Generell müssen bei der Betrachtung solcher Studien einige Unterscheidungen getroffen werden. Zunächst werden unterschiedliche Zelllinien verwendet, des Weiteren arbeiten einige Gruppen mit endogenem β APP, wohingegen andere Gruppen mit überexprimiertem β APP arbeiten. Durch die exogene Expression von β APP wird in der Zelle eine artifizielle Situation generiert, die möglicherweise nicht dem physiologisch relevanten Zustand entspricht. Dennoch sind solche Systeme notwendig, um beispielsweise die A β -Bildung verfolgen zu können, die unter endogener β APP-Expression nicht detektierbar ist. Allerdings müssen Erkenntnisse, die unter der Verwendung von β APP-

überexprimierenden Zelllinien gewonnen werden, vorsichtig interpretiert werden. Des Weiteren muss die Art der Endozytose-Inhibition unterschieden werden: einige Gruppen untersuchen die β APP-Proteolyse unter genereller Endozytose-Inhibition, beispielsweise durch die Transfektion der dominant-negativen DynaminK44A-Mutante (Carey *et al.*, 2005; Chyung and Selkoe, 2003), andere Gruppen führen eine spezifische β APP-Endozytose-Inhibition durch (Koo and Squazzo, 1994; Neumann *et al.*, 2006). Es ist wahrscheinlich, dass bei einer generellen Endozytoseinhibition nicht nur die Internalisierung von β APP, sondern auch zahlreicher anderer Proteine, wie beispielsweise der α - und β -Sekretasen inhibiert ist, was möglicherweise zu unterschiedlichen Effekten im Vergleich mit einer selektiven β APP-Endozytoseinhibition führen kann. Spezifische Inhibition der β APP-Endozytose durch Überexpression einer β APP-Deletionsmutante, deren C-Terminus (einschließlich des β APP-Endozytosemotivs YPTNY) deletiert wurde, führte in CHO-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der A β -Bildung (Koo and Squazzo, 1994) sowie zu einer deutlichen Zunahme der β APP-Gesamtsekretion (Koo *et al.*, 1996). Es muss beachtet werden, dass es sich hierbei nicht um eine generelle Endozytoseinhibition handelt, wie sie bei SNX33-Überexpression hervorgerufen wird. Eine Reduktion der A β -Mengen bei Endozytose-Inhibition durch SNX33-Überexpression konnte in keinem der in dieser Doktorarbeit getesteten Zellkultursysteme beobachtet werden. Selektive β APP-Endozytoseinhibition, hervorgerufen durch APLP1-Überexpression, führte in unserem Labor ebenfalls zu einer Abnahme der sAPP β -Generierung, da β APP nicht mehr in endosomale Kompartimente internalisiert werden kann, wo die Prozessierung durch die β -Sekretase statt findet (Neumann *et al.*, 2006), jedoch konnte in diesem Experiment auch eine deutliche Zunahme der sAPP α -Spaltung nachgewiesen werden. Dabei gilt zu beachten, dass bei Neumann *et al.* die Analyse der β APP-Proteolyse unter endogener β APP-Expression durchgeführt wurde, wohingegen Koo *et al.* mit überexprimiertem β APP arbeiten (Tab. 18). In einer weiteren Studie führt die Überexpression von β APP in HEK293-Zellen zu einer Reduktion der A β -Mengen sowie zu einer deutlichen Zunahme der sAPP α -Sekretion nach DynK44A-induzierter Endozytose-Inhibition (Carey *et al.*, 2005). Auch im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte unter β APP-Überexpressionsbedingungen eine deutliche Zunahme der sAPP α -Sekretion nach SNX33-induzierter Endozytoseinhibition festgestellt werden, jedoch wurde ebenfalls eine leichte Zunahme der A β -Bildung sowie eine deutliche Steigerung der sAPP β -Sekretion beobachtet (Abb. 26B). In COS7-Zellen, die β APP695 überexprimieren, konnte in Übereinstimmung mit Carey *et al.* eine deutliche Zunahme der sAPP α -Bildung sowie eine minimale Abnahme der sAPP β -Bildung detektiert werden, jedoch waren in diesem Experiment die A β -Mengen nicht

signifikant verändert (Abb. 26A). Möglicherweise sind β APP-Expressionsmengen in diesen Versuchen für unterschiedliche Effekte verantwortlich.

Anhand dieser hier erwähnten Studien wird deutlich, dass je nach verwendetem Zellsystem, β APP-Expressionssystem und induzierter Endozytoseinhibition sehr unterschiedliche Aussagen bezüglich der β APP-Prozessierung getroffen werden können. Allen Arbeiten gemeinsam ist eine minimale bis deutliche Zunahme der sAPP α -Bildung bei Endozytose-Inhibition, bezüglich der sAPP β -Bildung wurden jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. Eine Zusammenfassung diskutierter relevanter Publikationen ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Übersicht über relevante Publikationen, die eine β APP-Proteolyse unter Endozytosehemmung untersuchen.

Angegeben ist der Name der Publikation, die in dieser Publikation verwendete Zelllinie, die β APP-Expression, die Art der Endozytoseinhibition sowie der Effekt auf die sAPP α - bzw. sAPP β - und A β -Bildung. Das Peptid p3 entsteht bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung von β APP nach Ektodomänenspaltung durch α -Sekretasen und anschließender Intramembranproteolyse durch die γ -Sekretase (Abb. 4) und ist somit ein Maß für die Zunahme der α -Sekretase-Spaltung (bei unbeeinträchtigter γ -Sekretase-Funktion).

Publikation	Zelllinie	β APP-Expression	Endozytoseinhibition	sAPP α	A β / sAPP β
(Koo and Squazzo, 1994)	CHO	β APP751	Kalium-Mangel <i>generelle Endozytoseinhibition</i>	↗ minimale Zunahme von p3	↓ deutliche Reduktion von A β
(Carey <i>et al.</i> , 2005)	HEK	β APP695	DynK44A <i>generelle Endozytoseinhibition</i>	↑ deutliche Zunahme von sAPP α	↓ deutliche Reduktion von A β
(Chyung and Selkoe, 2003)	HeLa	endogen	DynK44A <i>generelle Endozytoseinhibition</i>	↑ deutliche Zunahme von sAPP α	↑ moderate Zunahme von sAPP β und A β
(Koo and Squazzo, 1994; Koo <i>et al.</i> , 1996)	CHO	β APP751	Deletion des β APP-C-Terminus <i>spezifische βAPP-Endozytoseinhibition</i>	↑ deutliche Zunahme an sAPP (keine Unterscheidung sAPP α und sAPP β)	↓ deutliche Reduktion von A β
(Neumann <i>et al.</i> , 2006)	HEK	endogen	APLP1 <i>spezifische βAPP-Endozytoseinhibition</i>	↑ deutliche Zunahme von sAPP α	↓ Reduktion der sAPP β -Bildung

Alle hier aufgelisteten Publikationen, welche die Proteolyse von β APP bei einer generellen Endozytoseinhibition unter der Verwendung von Wildtyp- β APP untersuchen, beschreiben

eine Zunahme der sAPP α -Generierung (Carey *et al.*, 2005; Chyung and Selkoe, 2003; Koo and Squazzo, 1994), die Aussagen über die sAPP β - und A β -Bildung sind jedoch sehr divergent. Arbeiten, die mit überexprimierten „schwedischen β APP“ (β APP_{swe}) durchgeführt worden sind, sind in Tabelle 18 nicht aufgelistet. Bei β APP_{swe} liegt eine Doppelmutation in β APP vor (K595N/M596L), die dazu führt, dass β APP_{swe} in einem größeren Ausmaß von der β -Sekretase geschnitten wird. Da dies eine artifizielle Situation in der Zelle generiert, wurden solche Studien (Eehalt *et al.*, 2003) nicht in die nähere Diskussion mit einbezogen. Tabelle 19 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Doktorarbeit generierten Ergebnisse bezüglich der β APP-Spaltung.

Tabelle 19: Übersicht über die in dieser Doktorarbeit generierten Daten, welche eine β APP-Proteolyse unter Endozytosehemmung untersuchen.

Angegeben ist die verwendete Zelllinie, die β APP-Expression, die Art der Endozytoseinhibition sowie der Effekt auf die sAPP α - bzw. sAPP β - und A β -Bildung.

	Zelllinie	β APP-Expression	Endozytoseinhibition	sAPP α	A β / sAPP β
Ergebnisse der Doktorarbeit	HEK	endogen	SNX33 <i>generelle Endozytoseinhibition</i>	\uparrow deutliche Zunahme von sAPP α	\nearrow minimale Zunahme der sAPP β -Bildung
Ergebnisse der Doktorarbeit	HEK	β APP695	SNX33 <i>generelle Endozytoseinhibition</i>	\uparrow deutliche Zunahme von sAPP α	\uparrow deutliche Zunahme der sAPP β -Bildung
Ergebnisse der Doktorarbeit	COS	β APP695	SNX33 <i>generelle Endozytoseinhibition</i>	\uparrow deutliche Zunahme von sAPP α	\searrow minimale Abnahme der sAPP β -Bildung

Allen hier getesteten Zellkultursystemen gemeinsam ist eine deutliche Zunahme der α -Spaltung bei SNX33-Überexpression (Abb. 25 und 26). Da die Proteolyse von β APP durch α -Sekretasen vornehmlich an der Zelloberfläche erfolgt (Sisodia, 1992), wurde ein β APP-Internalisierungs-Experiment durchgeführt (Abb. 29). In diesem Versuch führte SNX33 zu einer Reduktion der Internalisierung von β APP um ca. 50% (Abb. 30), was eine Zunahme der sAPP α -Bildung erklären kann. Da aber auch eine Reduktion der Transferrin-Rezeptor-Endozytose beobachtet werden konnte (Abb. 31), liegt der Verdacht Nahe, dass es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um einen β APP-spezifischen Effekt, sondern um eine generelle Inhibition der Endozytose handelt. Abbildung 41 zeigt ein Modell der möglichen Funktionsweise des SNX33-Funktionsmechanismus in Bezug auf die β APP-Proteolyse. SNX33-Überexpression führt in diesem Modell zu einer Inhibition Dynamin-abhängiger

Endozytose. In Folge dessen akkumuliert β APP an der Zelloberfläche, wo es vor allem durch α -Sekretasen prozessiert werden kann (Abb. 41).

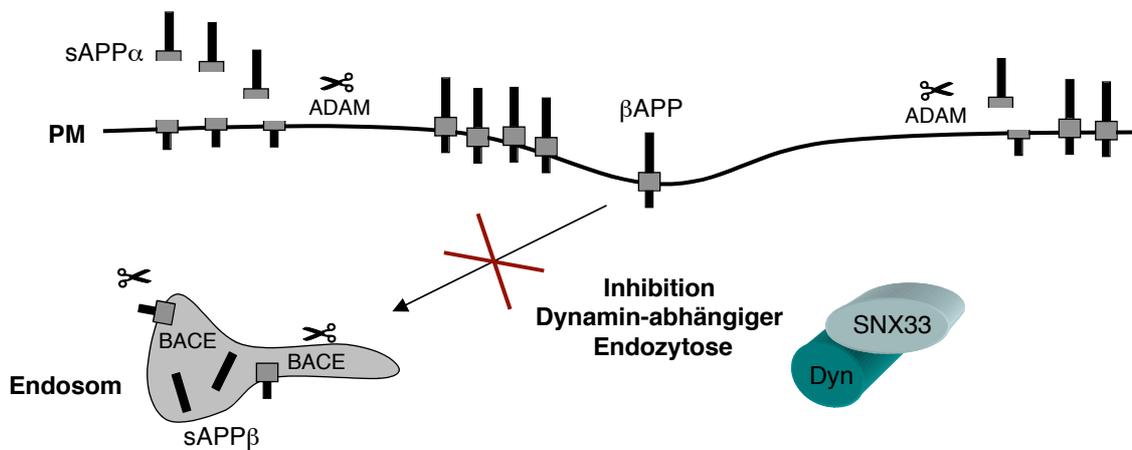


Abbildung 41: Modell der Funktion von SNX33 unter Überexpressionsbedingungen.

SNX33 interagiert mit Dynamin und reguliert seine Funktion. Bei exogener SNX33 Expression liegt Dynamin in einem inaktiven Komplex mit SNX33 vor, Dynamin-abhängige Endozytose ist inhibiert. In Folge dessen akkumuliert β APP an der Plasmamembran (PM) und ist dort vor allem den sogenannten α -Sekretasen zugänglich, sAPP α wird verstärkt gebildet. Die Menge an sAPP β , das vor allem in den Endosomen gebildet wird, wird von diesem Prozess nur leicht beeinflusst.

Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass eine generelle Endozytosehemmung, vermittelt durch SNX33-Überexpression, kaum einen Einfluss auf die Regulation der Spaltung von TNFR2 bzw. L-Selektin ausübte (Abb. 14). Verglichen mit diesen beiden Transmembranproteinen, die auch durch α -Sekretasen prozessiert werden können, scheint β APP einer veränderten Endozytoserate gegenüber besonders empfindlich zu sein. Möglicherweise besitzen die Endozytose-Motive von TNFR2 und L-Selektin unterschiedliche Eigenschaften als β APP, es ist möglich, dass die Endozytoserate von L-Selektin und TNFR2 unter SNX33-Überexpressionsbedingungen nicht in dem Ausmaß gestört war, wie es bei β APP der Fall war. Die Endozytoserate von β APP bei SNX33-Expression war um ca. 50% reduziert (Abb. 30), es wurde jedoch nicht die Endozytoserate des TNFR2 und L-Selektins untersucht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass SNX33 zwar auch zu einer deutlichen Endozytosehemmung der beiden Transmembranproteine führt, möglicherweise ist diese Inhibition bezüglich der Proteolyse der Proteine weniger relevant als es für β APP der Fall ist.

Die in dieser Doktorarbeit gezeigten und diskutierten Daten weisen darauf hin, dass nicht nur eine Regulation der β APP-spaltenden Proteasen, sondern auch grundlegende Prozesse in der Zelle, wie zum Beispiel Endozytose, einen großen Einfluss auf die Bildung von sAPP α , sAPP β und A β haben können. Interessanterweise gibt es einige Hinweise darauf, dass eine

Störung endosomaler Funktionen bereits in frühen Stadien der Alzheimer Krankheit beobachtet werden kann (Cataldo *et al.*, 1997; Cataldo *et al.*, 2000). Dieser Befund verdeutlicht die Notwendigkeit regulierter Endozytoseprozesse in der Zelle.

5.2 Die Funktion von SNX33 bei der Endozytose

SNX33-Überexpression führte zu einer deutlichen Zunahme der sAPP α -Bildung, die durch eine generelle Endozytoseinhibition (Abb. 30 und Abb. 31) verursacht wurde. β APP wird über das Endozytosemotiv YENPTY in Dynamin-abhängiger Weise endozytiert (Chen *et al.*, 1990) und auch der Transferrin-Rezeptor wird unter der Beteiligung von Dynamin über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert (Altschuler *et al.*, 1998; Kasai *et al.*, 1999). Koimmunpräzipitationen zeigten eine Interaktion von SNX33 mit Dynamin, die über die SH3-Domäne des Proteins vermittelt wurde (Abb. 32). Des Weiteren war eine partielle Aufhebung des β APP-Spaltungs-induzierenden Effekts von SNX33 möglich, wenn Dynamin mit SNX33 koexprimiert wurde (Abb. 33 und 34). Es wäre denkbar, dass unter physiologischen Bedingungen nur ein Teil der Dynamin-Population in der Zelle im Komplex mit SNX33 vorliegt, möglicherweise kann dieses Gleichgewicht bei SNX33-Überexpression verschoben werden, so dass es zu einer Inhibition der natürlichen Dynamin-Funktion kommt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für SNX9 gezeigt. SNX9 interagiert ebenfalls über seine SH3-Domäne mit Dynamin und reguliert über diese Interaktion die Menge an verfügbarem Dynamin an Membranen, wo Dynamin-abhängige Endozytose stattfindet (Lundmark and Carlsson, 2004). Eine Membranassoziiierung des SNX9/Dynamin-Komplexes könnte durch die Lipidbindungsaffinität der PX-Domäne und der BAR-Domäne vermittelt werden. Auch in unserer Studie wurde eine Interaktion von SNX33 mit Dynamin durch die SH3-Domäne vermittelt. SH3-Domänen interagieren spezifisch mit kurzen, Prolin-reichen Sequenzen (PXXP), wobei sich Zielsequenzen oft in Prolin-reichen Domänen (PRD) befinden (Mayer, 2001). Die große GTPase Dynamin besitzt eine solche PRD, die mit SH3-Domänen interagieren kann. Es ist bekannt, dass Dynamin eine wichtige Funktion in der Clathrin-vermittelten Endozytose, vornehmlich bei der Abschnürung endozytotischer Vesikel spielt (Hinshaw, 2000; Schmid *et al.*, 1998), jedoch ist bislang sehr wenig über den Transport von Dynamin zur Plasmamembran bekannt (Schmid *et al.*, 1998; Song and Schmid, 2003). Wahrscheinlich ist SNX9 nur für die Regulation einer definierten Dynamin-Menge verantwortlich, da nur etwa 25% des Dynamins im Komplex mit SNX9 nachgewiesen werden konnten (Lundmark and Carlsson, 2004). Möglicherweise handelt es sich bei SNX9 und SNX33 um Proteine, die in einen regulierten Transport von Dynamin zur Plasmamembran

bzw. dessen Membranassoziiierung involviert sind. Diese Vermutung impliziert jedoch, dass die Expression von SNX33 bzw. SNX9 im Organismus reguliert werden muss. Eine detaillierte Expressionsanalyse von SNX33 und SNX9 wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt. Es ist jedoch aus dem Modellorganismus *C. elegans* bekannt, dass die Expression des homologen Proteins Lst-4/SNX33 während der Vulva-Entwicklung des Fadenwurms je nach Zelltyp streng reguliert ist (Yoo *et al.*, 2004).

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit produzierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass SNX33 durch eine Interaktion mit Dynamin dessen natürliche Funktion moduliert. Die durchgeführten Koimmunpräzipitations-Experimente unter der Verwendung einer SNX33- Δ SH3-Mutante (Abb. 32) sowie die durchgeführten „Rescue“-Experimente bei Dynamin-Überexpression (Abb. 33 und 34) verstärken den Verdacht einer direkten Interaktion der beiden Proteine. Da auch dem homologen Protein SNX9 eine direkte Interaktion mit Dynamin sowie eine regulatorische Funktion Dynamin-abhängiger Endozytose nachgewiesen werden konnte (Lundmark and Carlsson, 2003), erscheint eine Wechselwirkung von SNX33 mit Dynamin wahrscheinlich.

Neben Dynamin konnte auch N-WASP (neuronales Wiscott Syndrom Aldrich-Protein) bzw. WASP als Interaktionspartner von SNX9 nachgewiesen werden (Badour *et al.*, 2007; Worby *et al.*, 2001). WASP ist eine wichtige Komponente der Aktin-Polymerisierung, indem es Aktin-Monomere bindet und zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führt, der eine Aktin-Polymerisierung einleitet (Machesky and Insall, 1998; Zhang *et al.*, 1999). SNX9 interagiert mittels seiner SH3-Domäne mit der Prolin-reichen Domäne von WASP bzw. N-WASP (Worby *et al.*, 2001). Eine Dimerisierung von SNX9, die über die BAR-Domäne des Proteins vermittelt wird, erlaubt eine gleichzeitige Interaktion von SNX9 mit Dynamin und N-WASP. Es wurde ein Modell postuliert, in welchem SNX9 eine wichtige Verbindung zwischen Clathrin-vermittelter Endozytose und der Aktin-Polymerisierung herstellt (Abb. 42; Kim and Chang, 2006).

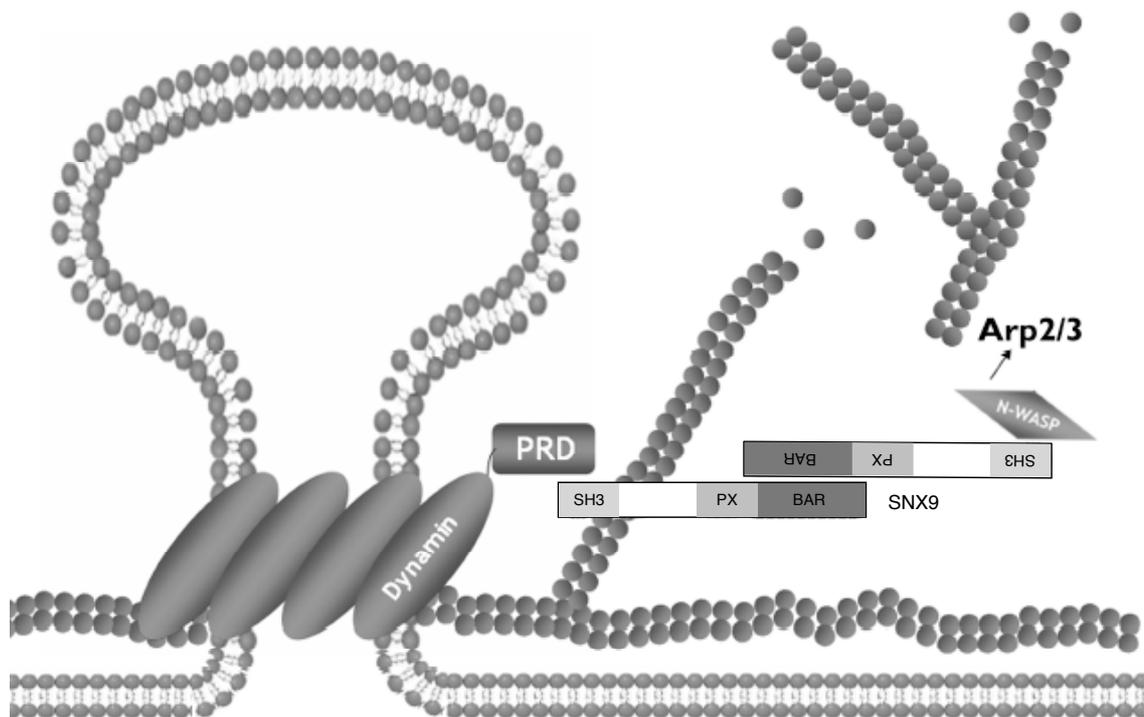


Abbildung 42: SNX9 verbindet als zentrale Komponente die Clathrin-vermittelte Endozytose mit dem Prozess der Aktin-Polymerisierung

SNX9 interagiert mittels seiner SH3-Domäne mit der Prolin-reichen-Domäne von Dynamin sowie mit N-WASP. Dies ist möglich, da SNX9 mittels der BAR-Domäne Dimere ausbilden kann. N-WASP führt in Folge dessen zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes, der eine Aktin-Polymerisierung einleiten kann. SNX9 ist in diesem Modell zentrales Protein, das eine Clathrin-vermittelte Endozytose mit dem Aktin-Netzwerk verbinden kann (Modell modifiziert nach Kim and Chang, 2006).

Aufgrund der Homologie zwischen SNX9 und SNX33 ist es möglich, dass auch SNX33 einen ähnlichen Funktionsmechanismus besitzt. Es muss jedoch beachtet werden, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit keine endogene Interaktion zwischen SNX33 und Dynamin nachgewiesen werden konnte, eine Immunpräzipitation mit N-WASP wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht überprüft. Es ist auch vorstellbar, dass die in dieser Doktorarbeit verwendeten HEK293-Zellen nicht das ideale Zellsystem darstellen, möglicherweise ist eine Dynamin-SNX33 bzw. WASP-SNX33-Interaktion nicht in allen Zelltypen von Bedeutung bzw. gut nachweisbar. Als weiterer Faktor muss die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass eine endogene Interaktion der Proteine SNX9 und Dynamin nur nach dem Einsatz sehr hoher Proteinkonzentrationen erfolgen konnte (Lundmark and Carlsson, 2005), möglicherweise waren die in dieser Doktorarbeit eingesetzten Proteinkonzentrationen für einen endogenen Nachweis einer SNX33/Dynamin-Interaktion nicht ausreichend. Es ist auch möglich, dass SNX33 und Dynamin eine transiente Interaktion eingehen, die beispielsweise nach einem Stimulus erfolgt und in den in dieser Doktorarbeit durchgeführten endogenen Koimmunpräzipitations-Experimenten nicht erfasst werden konnte.

Letztlich muss man berücksichtigen, dass die in diesem Abschnitt diskutierten Experimente größtenteils zwar unter endogener β APP-Expression durchgeführt worden sind, jedoch wurde SNX33 in diesen Studien überexprimiert. Überexpression von SNX33 in HEK293 Zellen führt zu einer Vervielfachung der SNX33-Mengen in der Zelle, die nicht der physiologischen Situation entspricht. Zahlreiche Studien von Sorting Nexinen aus Säugern zeigen eine Interaktion der PX-Domäne mit Phosphatidyl Inositol3-Phosphat (PtdIns3P) auf, ein Lipid, das eine wichtige Rolle in der endosomalen Sortierung einnimmt (Petiot *et al.*, 2003). Starke Überexpression von Sorting Nexinen kann zu einer Interaktion der PX-Domäne mit PtdIns3P und zu einer Inhibition der natürlichen PtdIns3P-Funktion führen, was eine artifizielle Endozytoseänderung zur Folge hat (Carlton *et al.*, 2005). Es kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass die Überexpression von SNX33 zu einer artifiziellen Endozytoseänderung und möglicherweise zu einer artifiziellen Interaktion mit Dynamin führt. Um das zu überprüfen, sind weitere Studien nötig, die eine Koimmunpräzipitation der beiden Proteine unter endogenen Bedingungen zeigen. Es gibt allerdings auch zahlreiche Hinweise, dass die von SNX33 beschriebene Interaktion mit Dynamin tatsächlich physiologisch relevant ist. So konnte beispielsweise eine Interaktion von SNX33 und Dynamin nachgewiesen werden, diese Interaktion konnte jedoch nicht unter der Verwendung der SNX33- Δ SH3-Mutante beobachtet werden (Abb. 32). Wäre alleine die PX-Domäne Ursache für eine veränderte Endozytoserate, so sollte auch die Expression der SNX33- Δ SH3-Mutante zu einer Endozytoseinhibition führen. Dies konnte jedoch weder im β APP-Proteolyse-Experiment (Abb. 23) noch in der Koimmunpräzipitation (Abb. 32) beobachtet werden. Des Weiteren führte die Expression von SNX1, welches ebenfalls eine PX-Domäne exprimiert, nicht zu einer Zunahme der sAPP α -Spaltung (siehe Abb. 22). Auch die publizierten Daten einer SNX9/Dynamin-Interaktion (Lundmark and Carlsson, 2003) deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei der SNX33/Dynamin-Interaktion und dem postulierten Mechanismus nicht um ein Überexpressions-Artefakt handelt.

Des Weiteren konnte in einer Kooperation mit Dr. Maren Hertweck der Universität Freiburg eine *in vivo* Analyse der SNX33-Funktion im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*; *C.e.*) durchgeführt. *C. elegans* besitzt im Gegensatz zum humanen Zellsystem nur ein Mitglied der SNX9/18/33-Untergruppe, welches die größte Homologie zu SNX33 aufweist (Abb. 16) und Ist-4 genannt wird (Yoo *et al.*, 2004) bzw. in dieser Diskussion als Ist-4/SNX33 bezeichnet wird. Interessanterweise führt die Überexpression von Ist-4/SNX33 im Fadenwurm zu einem Phänotyp, der dem Phänotyp von Dynamin-Knock-Down-

Fadenwürmern ähnlich ist. Das bedeutet, dass auch in diesem Modellorganismus die Überexpression von Ist-4/SNX33 zu einem Funktionsverlust Dynamin-abhängiger Endozytose führt (Manuskript in Vorbereitung), was sehr gut in Einklang mit den erhaltenen SNX33-Zellkultur-Daten steht.

5.3 Knock-Down von SNX33 hat keinen Einfluss auf die β APP-Proteolyse

SNX33 konnte unter Überexpressionsbedingungen als Aktivator der β APP α -Spaltung identifiziert werden, weshalb untersucht wurde, ob ein Knock-Down dieses Proteins ebenfalls einen Einfluss auf Dynamin-abhängige Endozytose und folglich auch auf die Spaltung von β APP ausübt. Geht man anhand der unter Überexpression generierten Daten davon aus, dass SNX33 ein essentieller Modulator Dynamin-abhängiger Endozytose der Zelle ist, sollte auch unter Knock-Down-Bedingungen eine Änderung der Endozytose-Rate, beispielsweise von β APP, zu beobachten sein. Im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Experimente zeigten, dass ein siRNA-vermittelter Einzel-Knock-Down von SNX33 zu keiner signifikanten Änderung der Endozytoserate von β APP und auch zu keiner Änderung der Menge an sekretiertem sAPP α , sAPP β und A β in HEK293-Zellen führte (Abb. 36). Mögliche Ursachen für diese Beobachtung sollen in diesem Abschnitt der Diskussion erläutert werden.

Der Knock-Down von SNX33 in HEK293-Zellen führte zu keiner signifikanten Reduktion der β APP-Endozytose (Abb. 37), auch eine Reduktion der Transferrinrezeptor-Endozytose konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse dieser Knock-Down-Studien deuten darauf hin, dass SNX33 kein essentieller Modulator der Dynamin-abhängigen Endozytose ist, auch wenn die Resultate der SNX33-Überexpressionsstudie einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einer Dynamin- und SNX33-Funktion aufweisen konnten. Es ist durchaus vorstellbar, dass ein Verlust von SNX33 in humanen Zellen transient durch die homologen Proteine SNX9 und SNX18 kompensiert werden kann und in Folge dessen keine bemerkenswerten Folgen mit sich bringt. Für nachfolgende Studien ist es unbedingt notwendig, die Durchführung effizienter Doppel- und Dreifach-Knock-Downs zu etablieren, um Aufschluss über die endogene Funktion der SNX33/SNX9/SNX18-Gruppe zu erlangen. Für das homologe Protein SNX9 konnte bereits eine regulatorische Funktion im Rahmen der Dynamin-abhängigen Endozytose von Zelloberflächenproteinen nachgewiesen werden. Der Knock-Down von SNX9 führt in besagter Studie zu einer Reduktion, nicht aber zu einer vollständigen Inhibition der Transferrin-Rezeptor Endozytose (Soulet *et al.*, 2005), des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SNX9 für eine Membran-Assoziierung von Dynamin

benötigt wird (Lundmark and Carlsson, 2004). Auch wenn SNX33 für eine Dynamin-Funktion bei Clathrin-abhängiger Endozytose nicht essentiell zu sein scheint, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es Funktionen bei der Modulation von Dynamin einnimmt, die unabhängig von dessen Funktion in der Endozytose sind. Dynamin konnte - neben seiner Rolle bei der Vermittlung Clathrin-abhängiger Endozytose - beispielsweise auch als essentielle Komponente der Aktin-Polymerisierung nachgewiesen werden (Kessels and Qualmann, 2006). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein Einfluss von SNX33 auf die Aktin-Polymerisierung nicht untersucht. Immunfluoreszenz-Analysen unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen sind notwendig, um dieser Fragestellung zu folgen. Letztendlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass SNX33 dennoch eine wichtige Funktion bei Endozytosevorgängen in der Zelle einnimmt, die unter Knock-Down-Bedingungen von den homologen Proteinen SNX9 und SNX18 kompensiert werden können.

Auch wenn ein Knock-Down von SNX33 in humanen Zellen zu keiner generellen Einschränkung Dynamin-abhängiger Endozytose und in Folge dessen zu einer veränderten β APP-Spaltung führte, ist es vorstellbar, dass SNX33 eine wichtige Rolle für modulatorische Vorgänge in der Zelle einnimmt. Aufgrund der bekannten Eigenschaften der Sorting Nexin Proteinfamilie ist beispielsweise eine Funktion von SNX33 im endosomalen Transport gut vorstellbar (Worby and Dixon, 2002). Es könnte potentiell auch in die Sortierung von Proteinen der frühen Endosomen zur Plasmamembran oder aber bei dem Transport endosomaler Proteine zu den Lysosomen beteiligt sein. Die Domänenstruktur von SNX33 lässt eine Funktion des Proteins in endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten in der Zelle vermuten. Die PX-Domäne ist in der Lage, mit Membranlipiden zu interagieren (Carlton and Cullen, 2005), die Durchführung eines Lipidblot-Experiments unter der Verwendung von SNX33-GST könnte dabei Aufschluss über mögliche Lipide geben, die mit der PX-Domäne von SNX33 interagieren. BAR-Domänen sind ebenfalls dafür bekannt, mit Membranen zu interagieren, Membrankrümmung zu registrieren, als auch zu induzieren (Dawson *et al.*, 2006). Auch SNX33 besitzt eine solche BAR-Domäne (Abb. 15). Die Tatsache, dass SNX33 in der Membranfraktion von HEK293-Zellen (Abb. 17B) als auch in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 21), unterstreicht eine mögliche Funktion von SNX33 im „membrane trafficking“. Immunfluoreszenzstudien mit detaillierter Untersuchung der endosomalen und lysosomalen Kompartimente unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen könnten auch Aufschluss über eine mögliche generelle Funktion von SNX33 in diesen Organellen geben.

Nachfolgende Studien müssen durchgeführt werden, um den genauen Funktionsmechanismus von SNX33 aufzuklären. Die bislang durchgeführten Experimente erlauben keinen Rückschluss des SNX33 Knock-Downs auf die β APP-Modulation. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass SNX33 als genereller Sortierungs- und Transport-Faktor in der Zelle fungiert und auf andere, in dieser Studie nicht untersuchte Proteine, einen regulatorischen Effekt ausübt.

5.4 SNX33 beeinflusst die Insulin-Signaltransduktion

In Kooperation mit Dr. Maren Hertweck und Prof. Ralf Baumeister der Universität Freiburg wurde eine Analyse der *in vivo* Funktion von Ist-4/SNX33 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* durchgeführt. Großer Vorteil in diesem Modellorganismus ist die Tatsache, dass *C. elegans* mit Ist-4 nur ein Mitglied der SNX9/18/33-Untergruppe besitzt, welches die größte Homologie zu SNX33 aufweist. Da im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Zellkultursystem überwiegend SNX33 mittels siRNA herunter reguliert wurde („Einzel-Knock-Down“), kann man nicht ausschließen, dass die Homologen SNX9 und SNX18 durch eine Funktionsübernahme den Verlust von SNX33 in humanen Zellen kompensieren können. Durch Studien der Funktion von Ist-4 in *C. elegans* ist es möglich, mit dem Knock-Down eines einzigen Proteins die komplette funktionelle SNX9/18/33-Untergruppe auszuschalten und mögliche Effekte zu beobachten. Knock-Down von Ist-4 in *C. elegans* führte zu einer Störung der Insulin-Signaltransduktion im Fadenwurm, die sich dadurch äußerte, dass ein Großteil der behandelten Würmer während ihrer Entwicklung in das sogenannte „partielle Dauerstadium“ eintreten (siehe Abb. 39). Interessanterweise entsprach der beobachtete Effekt keinem kompletten Funktionsverlust der Insulin-Signaltransduktion sondern vielmehr einer Einschränkung dieses Signalweges, was darauf hinweist, dass Ist-4/SNX33 kein essentielles Protein, sondern eine modulatorische Komponente dieses Signalwegs ist.

Im Gegensatz zu den *in vivo* generierten Daten konnte im humanen Zellkultursystem keine Änderung des Insulinsignalweges unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen nachgewiesen werden. Reduktion an endogenem SNX33 in HEK293-Zellen führte nach Insulinstimulierung zu keiner Änderung der Phosphatidyl-Inositol 3 (PI3)-Kinase-Aktivität, eine Assoziierung der PI3-Kinase-Untereinheit p85 mit dem Insulinrezeptorsubstrat (IRS) konnte unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen uneingeschränkt erfolgen (Daten nicht gezeigt). Parallel wurde die Phosphorylierung der Akt-Kinase überprüft. Die Akt-Kinase ist ebenfalls ein zentrales Protein der Insulin-Signal-Kaskade und wird durch Insulin-Stimulierung durch die Phosphatidyl-Inositol 3 (PI3)-Kinase über Phosphorylierung von PDK1 („Phosphinositide

dependent kinase 1“) phosphoryliert und aktiviert. Phosphorylierte Akt-Kinase führt dann zur Phosphorylierung und Regulation zahlreicher Proteine, wie zum Beispiel FOXO-Proteinen, dem Transkriptionsfaktor BAD oder der Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3- β). Es konnte keine Änderung der Akt-Phosphorylierung unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da eine defekte Insulin-Signaltransduktion auch durch eine Reduktion an aktiviertem Insulinrezeptor verursacht werden kann (Ceresa *et al.*, 1998), wurde die Grundgesamtheit an bereitgestelltem Insulinrezeptor an der Zelloberfläche sowie im Zelllysat untersucht, es konnte jedoch keine Änderung unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Einige Publikationen weisen einen Zusammenhang der Insulin-Signaltransduktion und der Regulation von β APP-Spaltung nach. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Aktivierung der PI3-Kinase durch Insulin-Stimulierung zu einer verstärkten β APP-Sekretion führt (Solano *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass eine gestörte Insulinaktivität zu einer Zunahme an sekretiertem A β sowie zu einer Abnahme von sAPP α führt (Gasparini *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass unter SNX33-Knock-Down Bedingungen keine veränderten sAPP α - sowie sAPP β -Mengen nachgewiesen werden konnte (Abb. 36), stehen in Einklang mit der beobachteten unveränderten Insulin-Signaltransduktion. Gleiche Mengen an Insulinrezeptor an der Zelloberfläche, eine unveränderte PI3-Kinase-Aktivität, eine gleich bleibende Akt-Phosphorylierung und eine unveränderte β APP-Proteolyse konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen beobachtet werden. Die gezeigten Ergebnisse erlauben drei unterschiedliche Diskussions-Ansätze, die im folgenden Abschnitt erörtert werden sollen.

Anhand der in dieser Doktorarbeit präsentierten Daten kann man annehmen, dass SNX33 keinen modulatorischen Einfluss auf die Insulin-Signaltransduktionskaskade in humanen Zellen ausübt, folglich wäre SNX33 keine modulatorische Komponente des Insulinsignalweges. Der Insulinsignalweg in humanen Zellen wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine und Signalwege beeinflusst, die im wesentlich simpleren Organismus *C. elegans* nicht vorliegen. Das bedeutet, dass die Regulation der Insulin-Signaltransduktion in humanen Zellen wesentlich komplexer organisiert ist als in *C. elegans*, möglicherweise haben sich im Laufe der Evolution auch unterschiedliche Regulationsmechanismen entwickelt. Es ist denkbar, dass Ist-4/SNX33 eine wichtige modulatorische Funktion des Insulinsignalweges in *C. elegans* einnimmt, die im humanen

Organismus von anderen Proteinen übernommen wird. Demnach wäre SNX33 keine modulatorische Komponente des Insulinsignalweges in humanen Zellen.

Es ist jedoch auch möglich, dass SNX33 eine wichtige modulatorische Komponente der Insulin-Signaltransduktion in humanen Zellen ist, möglicherweise kann aber dessen Funktion unter Knock-Down-Bedingungen von den homologen Proteinen SNX9 und SNX18 übernommen werden. Einige bereits publizierte Studien unterstützen diese Vermutung. Für das homologe Protein SNX9 konnte bereits eine Interaktion mit dem Insulin-Rezeptor beschrieben werden (MaCaulay *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SNX9 in T-Zellen nach T-Zellen-Antigenrezeptor/CD28-Stimulierung in einem Komplex mit WASP, CD28 und der kleinen PI3-Kinase-Untereinheit p85 vorliegt (Badour *et al.*, 2007). Aufgrund der Homologie zwischen SNX9 und SNX33 sowie aufgrund des Ist-4/SNX33-Knock-Down-Phänotyps in *C. elegans* ist es denkbar, dass auch SNX33 eine wichtige Rolle in der Regulation der Insulinrezeptor-Funktion spielt. Die Tatsache, dass Ist-4/SNX33 aus *C. elegans* eine etwas höhere Homologie zu SNX33 als zu SNX9 besitzt, spricht wiederum für eine Funktion von SNX33 in der Insulin-Modulation. Weiterer Hinweis für eine Beteiligung von SNX33 in der Insulinregulation ist sein Expressionsmuster: neben einer starken Expression im Pankreas und im Herz konnte vor allem in der Leber sowie im Muskelgewebe eine deutliche SNX33-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 20), Gewebe, in welchen die Insulinsignal-Transduktion eine sehr wichtige Funktion einnimmt (MaCaulay *et al.*, 2003).

Dritte Möglichkeit ist, dass SNX33 kein Insulinsignalweg-spezifischer Modulator in der Zelle ist, aber durch eine Interaktion mit Dynamin an der Regulation unterschiedlicher zellulärer Endozytoseprozesse beteiligt ist und durch eine generelle veränderte Endozytoserate in der Zelle einen eher indirekten Einfluss auf die Insulinsignaltransduktion Zelle ausübt. Es ist durchaus vorstellbar, dass die Insulin-Signaltransduktion in *C. elegans* ein gegenüber veränderten Endozytoseraten sehr empfindlicher Signalweg ist, und eine Störung in diesem Signalweg in der Embryonalentwicklung des Fadenwurms besonders deutliche Auswirkungen mit sich bringt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Ist-4/SNX33 eine modulatorische Komponente des Insulin-Signaltransduktionswegs in *C. elegans* ist und somit einen wichtiger Faktor in der embryonalen Entwicklung des Fadenwurms darstellt. Ein direkter Nachweis einer SNX33-

Funktion in humanen Zellen konnte im Rahmen der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Studien nicht erfolgen. Letztendlich gilt zu beachten, dass der Insulin-Signalweg in *C. elegans* wesentlich einfacher aufgebaut ist als in humanen Zellen. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass im humanen System eine kompliziertere, höher entwickelte Regulation des Insulin-Signalsystems vorliegt und somit auch zahlreiche weitere Faktoren einen Einfluss auf die Funktion dieses Signalweges besitzen. Für die hier diskutierten Daten ist die Tatsache von großer Bedeutung, dass in humanen Zellen die homologen Proteine SNX9 und SNX18 vorhanden sind. Bei der Untersuchung der Funktion von Rab5 bezüglich der Insulin-Signaltransduktion konnte beispielsweise erst nach einem Dreifach-Knock-Down aller Mitglieder der Genfamilie ein Effekt beobachtet werden (Hunker *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden ausschließlich SNX33-Einzel-Knock-Down-Experimente durchgeführt. Dies liegt vor allem an einer technischen Limitierung, da bislang kein zufriedenstellender SNX33/SNX9/SNX18-Dreifach-Knock-Down durchgeführt werden konnte. Des Weiteren erwies sich ein Nachweis von SNX18 in humanen Zellen als extrem schwierig, da kommerziell erwerbliche Antikörper sowie selbst generierte Antikörper keinen endogenen Nachweis dieses Proteins erlauben. Ein Nachweis eines SNX18-Knock-Downs kann folglich ausschließlich über Taqman-Analyse erfolgen, die gegenwärtig von Kollegin Stefanie Neumann etabliert wird. Für nachfolgende Experimente zur Aufklärung der endogenen SNX33-Funktion sowie dessen mögliche Rolle in der Insulin-Signaltransduktion ist es unabdinglich, einen effizienten Dreifach-Knock-Down der SNX33/SNX9/SNX18-Subgruppe zu etablieren.

5.5 Darstellung eines SNX33-Funktionsmechanismus

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten zahlreiche neue Eigenschaften von SNX33 beschrieben werden. In Kombination mit den publizierten Daten über mögliche SNX9-Funktionen soll in diesem Abschnitt ein möglicher Funktionsmechanismus von SNX33 diskutiert und postuliert werden. Überexpression von SNX33 führte zu einer ca. 4-5-fachen Zunahme der sAPP α -Bildung (Abb. 22, 23, 25), die durch eine Inhibition Dynamin-abhängiger Endozytose verursacht wurde (Abb. 30 und 31). Knock-Down von SNX33 führte zu keiner generellen Inhibition Dynamin-abhängiger Endozytoseprozesse in HEK293-Zellen, auch in *C. elegans* konnte nach Ist-4/SNX33-Knock-Down kein „Dynamin-Funktionsverlust“-Phänotyp beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SNX33 keine essentielle Komponente für eine regulierte Dynaminfunktion ist. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass SNX33 einen modulatorischen, wenn auch nicht essentiellen Einfluss auf die Funktion von Dynamin ausübt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Funktion

von Dynamin über die Endozytoserate von β APP bzw. dem Transferrinrezeptor (Abb. 30 und 31), sowie über eine Analyse der β APP-Proteolyse ausgewertet. Dynamin ist in die Abschnürung Clathrin-ummantelter Vesikel der Plasmamembran (Hinshaw, 2000; Schmid *et al.*, 1998) involviert, dabei interagiert es mit zahlreichen Proteinen, die ebenfalls für eine Clathrin-vermittelte Endozytose essentiell sind, wie beispielsweise Amphiphysin, Endophilin oder α -Adaptin. Dynamin ist aber auch für zahlreiche weitere Funktionen in der Zelle verantwortlich. So interagiert Dynamin beispielsweise mit einer Vielzahl an Proteinen, die für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich sind, wie zum Beispiel Cortactin (Schafer *et al.*, 2002), Syndapin-1 oder Synaptojanin (McNiven *et al.*, 2000a; McNiven *et al.*, 2000b; Qualmann *et al.*, 1999). Es ist also möglich, dass SNX33 einen modulatorischen Einfluss auf die Dynamin-Aktivität ausübt, auch wenn sich das nicht in zu einer generellen Änderung der Clathrin-vermittelten Endozytose von Transmembranproteinen der Zelloberfläche auswirkt. Die Tatsache, dass auch das homologe Protein SNX9 mit Dynamin interagiert (Lundmark and Carlsson, 2003; Lundmark and Carlsson, 2004; Soulet *et al.*, 2005) unterstützt die Vermutung, dass SNX33 in die Regulation der Dynamin-Funktion verwickelt sein könnte. Aufgrund der in dieser Doktorarbeit gezeigten und diskutierten Daten kann ein Modell postuliert werden, in welchem SNX33 für eine Anzahl, jedoch nicht für alle Dynamin-abhängige Prozesse von wichtiger Bedeutung ist. In diesem Modell bindet SNX33 gemeinsam mit weiteren endozytotischen Adaptorproteinen wie z.B. Amphiphysin, Endophilin oder α -Adaptin an Dynamin und kontrolliert die Endozytose ausgewählter Proteine, wie beispielsweise den Insulinrezeptor, Komponenten der EGFR-Signalkaskade oder möglicherweise β APP. Neben der potentiellen SNX33-abhängigen Endozytose gibt es allerdings auch endozytotische Vorgänge, die ohne eine Beteiligung von SNX33 ablaufen können. Abbildung 43 zeigt ein schematisches Modell der SNX33-Funktion unter endogenen Bedingungen.

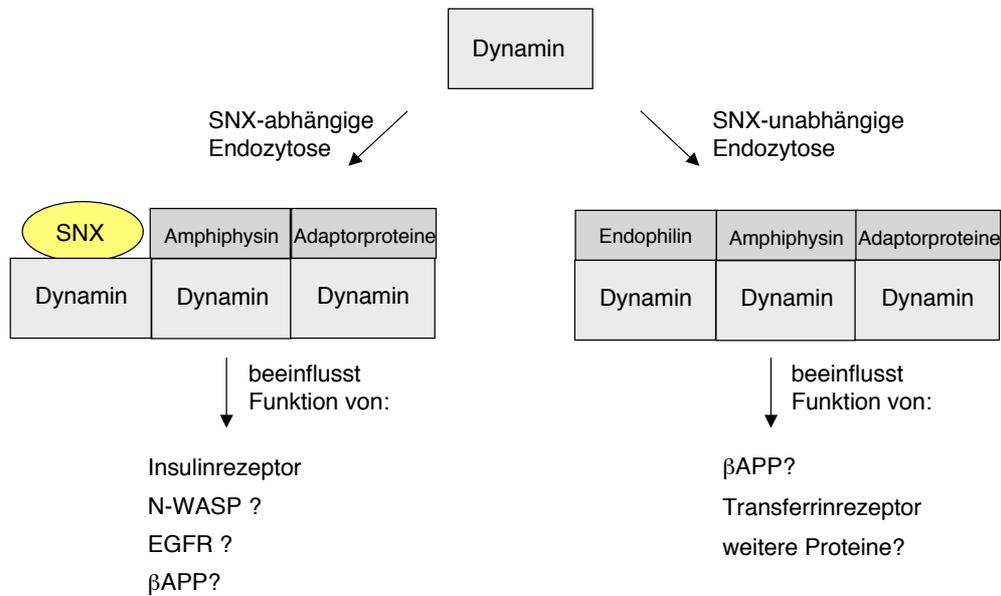


Abbildung 43: Modell eines möglichen SNX33/SNX9/SNX18-Funktionsmechanismus unter endogenen Bedingungen

Im Zusammenspiel mit weiteren endozytotischen Adaptorproteinen wie Amphiphysin oder Endophilin ist SNX33, SNX9 und SNX18 eine modulatorische Komponente definierter Dynamamin-Funktionen, jedoch nicht aller Dynamamin-abhängigen Endozytoseprozesse. Ein direkter Nachweis einer Modulation der Funktion von N-WASP sowie eine Beteiligung im EGFR-Signalweg sind im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht erfolgt und sind deswegen mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Eine Aussage, ob βAPP in einer Sorting-Nexin-abhängigen oder Sorting Nexin-unabhängigen Weise internalisiert wird, kann anhand der durchgeführten Experimente nicht gemacht werden, weshalb βAPP mit einem Fragezeichen gekennzeichnet ist. Die Durchführung von Dreifach-Knock-Down-Experimenten von SNX33/SNX9/SNX18 könnte darüber Aufschluss geben. SNX: SNX33/SNX9/SNX18-Subgruppe; EGFR: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; N-WASP: neuronales Wiscott-Aldrich Syndrom-Protein.

Für SNX9 konnte gezeigt werden, dass unter endogenen SNX9-Expression etwa 25% des Dynamamins im Komplex mit Dynamamin vorliegen (Lundmark and Carlsson, 2004), in Übereinstimmung mit dem in Abbildung 43 gezeigten Modell wird nur ein definierter Teil des Dynamamins in der Zelle durch eine Interaktion mit SNX9 moduliert. Zwar kann für SNX33 keine Abschätzung getroffen werden, wieviel Prozent mit Dynamamin im Komplex vorliegen, jedoch ist eine Interaktion beider Proteine aufgrund der gezeigten Daten sehr wahrscheinlich. Unter SNX33-Überexpressionsbedingungen liegt in der Zelle jedoch eine veränderte Situation vor. Überexpression von SNX33 führt zu einem Überangebot an SNX33 in der Zelle, wesentlich mehr Dynamamin interagiert in Folge dessen mit SNX33, als es unter endogenen Bedingungen der Fall ist. In Folge dessen wird auch die Bindung der endozytotischen Adaptorproteine inhibiert. Konsequenz ist eine generelle Dynamamin-abhängige Endozytose-Inhibition, die eine Vielzahl von Proteinen - beispielsweise βAPP und den Transferrinrezeptor - betrifft. Abbildung 44 zeigt ein Modell der SNX33-Funktion unter Überexpressionsbedingungen.

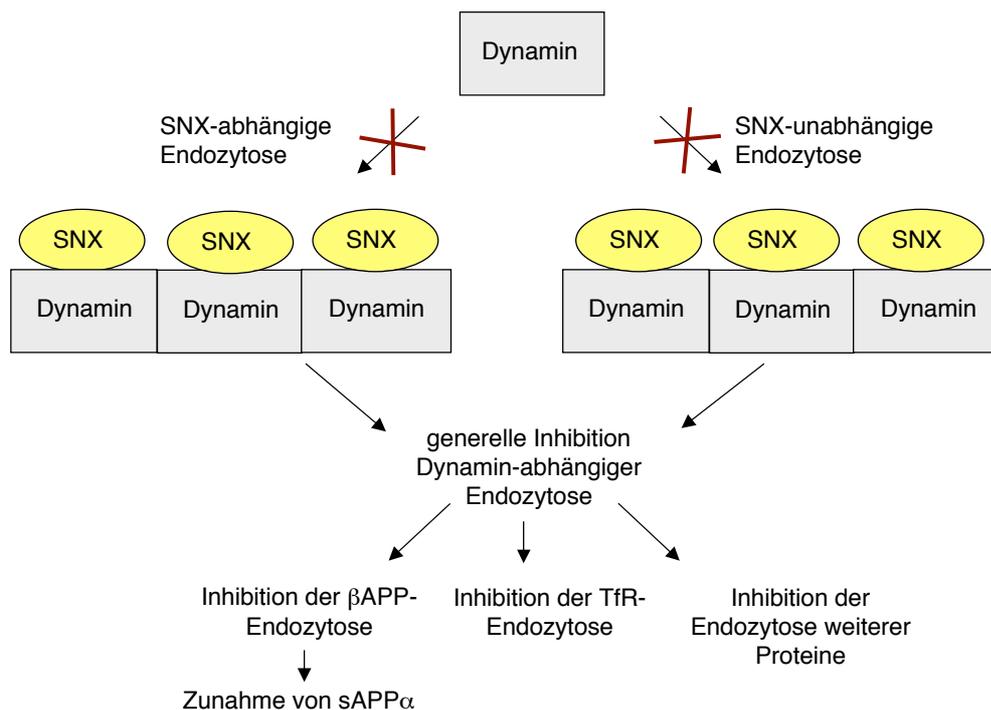


Abbildung 44: Modell eines möglichen SNX33-Funktionsmechanismus unter Überexpressions-Bedingungen.

Überexpression von SNX33, SNX9 oder SNX18 führt zu einer generellen Inhibition Dynamamin-abhängiger Endozytoseprozesse in der Zelle. Durch den vorhandenen Überschuss von SNX33 wird das natürliche Dynamamin-SNX33-Gleichgewicht verschoben, es liegen nun wesentlich mehr SNX33-Dynamamin-Komplexe vor. Da durch ein Überangebot von SNX33 auch die Bindung endozytotischer Adaptorproteine beeinflusst wird, kann eine generelle Dynamamin-abhängige Endozytosehemmung beobachtet werden. Konsequenz ist eine Inhibition der Transferrinrezeptor-Endozytose und der β APP-Endozytose. SNX: SNX33/SNX9/SNX18-Subgruppe; TfR: Transferrinrezeptor.

Überexpression von SNX33 führt also zu einer generellen Dynamamin-abhängigen Endozytoseinhibition, in Folge dessen ist auch eine Endozytoseinhibition von β APP und dem Transferrinrezeptor zu beobachten (siehe auch Abb. 30 und Abb. 31).

Ein Knock-Down von SNX33 führt anhand des diskutierten Modells hingegen nicht zu einer generellen Dynamamin-abhängigen Endozytoseinhibition, es werden nur Prozesse beeinträchtigt, die eine SNX33-Dynamamin-Interaktion für eine regulierte Endozytose verlangen. Solch ein Prozess könnte beispielsweise Komponenten der Insulin-Signaltransduktion beinhalten, da ein Knock-Down von SNX33 in *C. elegans* zu einer gestörten Insulin-Signalkaskade führte (Tab. 17). Abbildung 45 zeigt einen möglichen Mechanismus der Dynamamin-Funktion unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen.

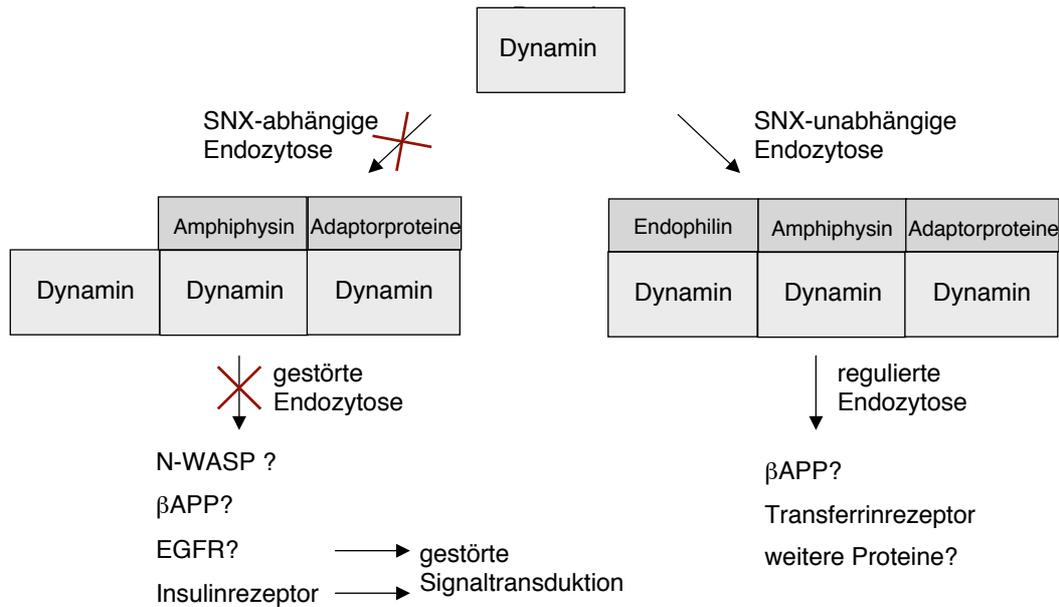


Abbildung 45: Modell eines möglichen SNX33/SNX9/SNX18-Funktionsmechanismus unter Knock-Down-Bedingungen.

Mitglieder der SNX33/SNX9/SNX18-Gruppe sind kein essentieller Modulator aller Dynamin-abhängigen Endozytoseprozesse, in Folge dessen beeinflusst ein Knock-Down dieser Proteine nur ausgewählte Funktionen in der Zelle. Eine gestörte Funktion des Insulinrezeptorsignalweges konnte nach einem SNX33-Knock-Down gezeigt werden, Knock-Down des homologen Proteins SNX9 führte zu einer Fehlfunktion der EGFR-Signaltransduktion in *C. elegans* (Yoo *et al.*, 2004). Ob βAPP in SNX-abhängiger oder -unabhängiger Weise endozytiert wird, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht geklärt werden, weshalb βAPP mit einem Fragezeichen versehen ist. SNX: SNX33/SNX9/SNX18-Subgruppe; EGFR: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; N-WASP: neuronales Wiscott-Aldrich Syndrom-Protein.

Anhand der in dieser Arbeit gezeigten und diskutierten Daten kann davon ausgegangen werden, dass SNX33 in eine definierte Anzahl Dynamin-abhängiger Endozytose-Prozesse involviert ist, es ist jedoch kein essentieller Bestandteil sämtlicher Dynamin-abhängigen Endozytosevorgänge in der Zelle. Lst-4/SNX33 konnte als modulatorische Komponente des Insulinsignalweges in *C. elegans* identifiziert werden (Tab. 17), dabei muss die Frage geklärt werden, ob eine reduzierte Insulinrezeptor-Endozytose Ursache für die beobachteten Effekte ist. Eine weitere Studie konnte Ist-4/SNX33 eine Funktion als negativer Regulator des EGFR (Epidermal Growth Factor Rezeptor)-Signalweges bei der Vulva-Entwicklung nachweisen (Yoo *et al.*, 2004). Auch hierbei wurde allerdings nicht untersucht, ob eine veränderte EGFR-Internalisierung Ursache dieser Beobachtung ist.

Letztendlich muss noch folgender Punkt berücksichtigt werden: SNX33 bzw. Ist-4/SNX33 konnte als modulatorische Komponente des Insulin-Signalweges, des EGFR-Signalweges sowie als Interaktor mit Dynamin beschrieben werden. Dynamin ist jedoch nicht nur in der

Abschnürung bei Clathrin-vermittelter Endozytose beteiligt, Dynamin ist auch in die Organisation des Aktin-Zytoskeletts involviert (Schafer *et al.*, 2002). Möglicherweise führt eine Interaktion von SNX33 mit Dynamin auch zu einer gestörten Funktion des Aktin-Zytoskeletts und in Folge dessen zu einer Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege in der Zelle. Interessanterweise führt ein durch Latrunkulin depolymerisiertes Aktin-Netzwerk zu einer reduzierten EGF-Internalisierung (Benesch *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2000). Auch eine Störung der Insulin-Signaltransduktion bei Ist-4/SNX33-Knock-Down könnte durch eine Änderung des Aktin-Netzwerks in der Zelle erklärt werden. Einige Studien postulieren, dass ein Insulin-stimulierter Transport von Glukose in Fett- und Muskelgewebe nach Insulinrezeptor-Autophosphorylierung eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts erfordert (Emoto *et al.*, 2001). Man geht davon aus, dass ein funktionierendes Aktin-Zytoskelett benötigt wird, um eine subzelluläre Verteilung der Signalmoleküle des Insulinsignalweges in der Zelle zu regulieren (Eyster *et al.*, 2005; Tsakiridis *et al.*, 1999). Da Dynamin auch an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Schafer *et al.*, 2002), könnte eine gestörte Dynamin-Funktion, die als Konsequenz eine veränderte Aktin-Struktur mit sich bringt, folglich auch Auswirkungen auf die Insulin-Signaltransduktion als auch auf den EGFR-Signalweg ausüben. Dieses Szenario ist jedoch sehr spekulativ, da im Rahmen dieser Doktorarbeit keine Analyse der Aktin-Funktion unter SNX33-Knock-Down-Bedingungen erfolgt ist.

Aufgrund der generellen Eigenschaften der Sorting Nexine (Worby and Dixon, 2002), aufgrund der publizierten Studien von SNX9 sowie aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten bezüglich der Funktion von SNX33 kann man folgern, dass das Protein und seine Homologen eine wichtige generelle Funktion in der Zelle einnehmen. Überexpression des Proteins führt zu einer generellen Inhibition Dynamin-abhängiger-Endozytose, Analysen der endogenen Funktion von SNX33 zeigen eine Beteiligung des Proteins in der Insulin-Signaltransduktion sowie im EGFR-Signalweg (Yoo *et al.*, 2004). Aufgrund der in dieser Arbeit generierten Daten kann man davon ausgehen, dass SNX33 seine Funktion über eine Interaktion mit Dynamin ausübt. SNX33 besitzt dabei einen modulatorischen Einfluss auf ausgewählte Prozesse in der Zelle, es handelt sich jedoch nicht um einen generellen Modulator Dynamin-abhängiger Endozytose. Mit Sicherheit sind für nachfolgende Studien die Durchführung von SNX33/SNX9 bzw. SNX33/SNX18-Doppel-Knock-Down-Experimenten sowie die Analyse eines SNX9/18/33-Triple-Knock-Downs von großer Bedeutung, um Aufschluss über die Funktion dieser Proteine zu bekommen.

6. Zusammenfassung

Die Familie der Sorting Nexine (SNX) umfasst 33 bekannte Mitglieder, jedoch ist der Funktionsmechanismus vieler Sorting Nexine bislang nicht aufgeklärt. Auf der Suche neuer Modulatoren der β APP-Proteolyse konnte im Rahmen eines Expressionsklonierungs-Screens (Schobel *et al.*, 2006) ein bislang nicht beschriebenes Protein, Sorting Nexin 33 (SNX33), als Aktivator der β APP-Proteolyse identifiziert werden.

SNX33 ist ein phosphoryliertes Protein, das ubiquitär exprimiert wird und zudem eine hohe Homologie zu den Proteinen SNX9 und SNX18 aufweist. SNX33 ist im Zytosol lokalisiert, kann jedoch auch Membran-assoziiert vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression von SNX33 zu einer Inhibition Dynamin-abhängiger Endozytose und in Folge dessen zu einer etwa 50% -igen Reduktion der β APP-Endozytose führt. Die von SNX33 induzierte Endozytosehemmung wird durch die SH3-Domäne des Proteins vermittelt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Koimmunpräzipitationsstudien zeigten, dass SNX33 mittels seiner SH3-Domäne mit Dynamin interagiert und auf diese Weise möglicherweise dessen Funktion moduliert. In Übereinstimmung mit den durchgeführten Zellkultur-Experimenten führte eine Überexpression von SNX33 im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* ebenfalls zu einem Dynamin-Funktionsverlust.

Da SNX33 Expression zu einer generellen Inhibition Dynamin-abhängiger Endozytose führt, handelt es sich dabei nicht um einen spezifischen β APP-Modulator. Konsequenz einer reduzierten β APP-Internalisierung ist eine starke Zunahme der neurotrophen sAPP α -Bildung sowie - je nach verwendeter Zelllinie - ein leichter Anstieg bzw. eine geringe Reduktion der pathogenen sAPP β -Generierung. Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression der homologen Proteine SNX9 und SNX18 ebenfalls zu einer Zunahme der β APP-Spaltung führt. Es handelt sich also um einen Effekt, der von der ganzen Sorting Nexin-Subgruppe (SNX33/SNX9/SNX18) vermittelt wird. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass diese Funktion innerhalb dieser Subgruppe konserviert ist. Transfektion von SNX1 führte zu keiner Änderung der β APP-Proteolyse, was bedeutet, dass dieser Effekt nicht von der gesamten Sorting Nexin-Familie vermittelt wird. Interessanterweise ist die Spaltung von β APP besonders sensitiv bezüglich einer veränderten Endozytose-Rate, da die Proteolyse der Transmembranproteine L-Selektin und des Tumornekrosisfaktor-Rezeptors 2 (TNFR2) unter SNX33 Überexpressionsbedingungen nicht signifikant verändert war.

Ein siRNA-vermittelter Knock-Down von SNX33 führte zu keiner generellen Endozytoseinhibition in HEK293 Zellen, es konnte keine veränderte β APP-Endozytoserate beobachtet werden. Die Bildung von sAPP α - und sAPP β war in Folge dessen unverändert. Auch ein Ist-4/SNX33-Knock-Down in *C. elegans* führte überraschenderweise zu keiner Inhibition der Dynamin-Funktion, äußerte sich jedoch in einer Fehlfunktion der Insulin-Signaltransduktion. SNX33-Knock-Down in humanen Zellen brachte keine nachweisbare Beeinträchtigung des Insulinsignalweges mit sich, jedoch besteht die Möglichkeit, dass die Homologen SNX9 und SNX18 einen Verlust von SNX33 kompensieren können. Dabei gilt zu beachten, dass eine Funktionsübernahme durch homologe Proteine in *C. elegans* nicht möglich ist, da dieser Organismus nur ein einziges homologes Protein der SNX33/SNX9/SNX18-Subgruppe besitzt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit präsentierten sowie diskutierten Daten zeigen, dass SNX33 in unterschiedliche zellulärer Prozesse involviert ist. SNX33 ist ein neu identifizierter Modulator der Zelle, der für zentrale Signalwege und Vorgänge, wie zum Beispiel der Insulinrezeptor-Signaltransduktion und Endozytose, von Bedeutung ist. Im Gegensatz zum Modellorganismus *C. elegans* kann im humanen Zellkultursystem ein durch siRNA induzierter Funktionsverlust von SNX33 durch die homologen Proteine SNX9 und SNX18 kompensiert werden.

7. Literaturverzeichnis

- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E. and White, M.F. (2002) Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*, **277**, 1531-1537.
- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J. and Hooper, N.M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, **74**, 342-352.
- Altschuler, Y., Barbas, S.M., Terlecky, L.J., Tang, K., Hardy, S., Mostov, K.E. and Schmid, S.L. (1998) Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J Cell Biol*, **143**, 1871-1881.
- Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin*, **64**, 146-148.
- Armstrong, R.A. (2006) Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, **44**, 1-11.
- Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A. and Bennett, D.A. (2004) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*, **61**, 661-666.
- Badour, K., McGavin, M.K., Zhang, J., Freeman, S., Vieira, C., Filipp, D., Julius, M., Mills, G.B. and Siminovitch, K.A. (2007) Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1593-1598.
- Benesch, S., Polo, S., Lai, F.P., Anderson, K.I., Stradal, T.E., Wehland, J. and Rottner, K. (2005) N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, **118**, 3103-3115.
- Blennow, K., de Leon, M.J. and Zetterberg, H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet*, **368**, 387-403.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J. and Reintjes, R. (1996) Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **210**, 87-90.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71-94.
- Brunnsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Jeune, B., Pedersen, A.N., Skinhoj, P. and Pedersen, B.K. (1999) A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **54**, M357-364.
- Busciglio, J., Gabuzda, D.H., Matsudaira, P. and Yankner, B.A. (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2092-2096.

- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P. and Black, R.A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*, **273**, 27765-27767.
- Cao, X. and Sudhof, T.C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**, 115-120.
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D.J. and Haass, C. (1998) The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem*, **273**, 3205-3211.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G. and Haass, C. (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem*, **275**, 30849-30854.
- Carey, R.M., Balcz, B.A., Lopez-Coviella, I. and Slack, B.E. (2005) Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol*, **6**, 30.
- Carlton, J., Bujny, M., Rutherford, A. and Cullen, P. (2005) Sorting nexins--unifying trends and new perspectives. *Traffic*, **6**, 75-82.
- Carlton, J.G. and Cullen, P.J. (2005) Sorting nexins. *Curr Biol*, **15**, R819-820.
- Carro, E. and Torres-Aleman, I. (2004a) Insulin-like growth factor I and Alzheimer's disease: therapeutic prospects? *Expert Rev Neurother*, **4**, 79-86.
- Carro, E. and Torres-Aleman, I. (2004b) The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*, **490**, 127-133.
- Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D. and Torres-Aleman, I. (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med*, **8**, 1390-1397.
- Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Pieroni, C. and Nixon, R.A. (1997) Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci*, **17**, 6142-6151.
- Cataldo, A.M., Hamilton, D.J., Barnett, J.L., Paskevich, P.A. and Nixon, R.A. (1996) Abnormalities of the endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease: relationship to disease pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*, **389**, 271-280.
- Cataldo, A.M., Peterhoff, C.M., Troncoso, J.C., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T. and Nixon, R.A. (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol*, **157**, 277-286.

- Ceresa, B.P., Kao, A.W., Santeler, S.R. and Pessin, J.E. (1998) Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*, **18**, 3862-3870.
- Chen, W.J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, **265**, 3116-3123.
- Chyung, J.H. and Selkoe, D.J. (2003) Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem*, **278**, 51035-51043.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. and Selkoe, D.J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, **360**, 672-674.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, **261**, 921-923.
- Craft, S., Peskind, E., Schwartz, M.W., Schellenberg, G.D., Raskind, M. and Porte, D., Jr. (1998) Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology*, **50**, 164-168.
- Davenpeck, K.L., Brummet, M.E., Hudson, S.A., Mayer, R.J. and Bochner, B.S. (2000) Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro. *J Immunol*, **165**, 2764-2772.
- Dawson, J.C., Legg, J.A. and Machesky, L.M. (2006) Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol*, **16**, 493-498.
- Dickson, D.W. (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 321-339.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H. and Haass, C. (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*, **5**, 486-488.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. and Simons, K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, **160**, 113-123.
- Emoto, M., Langille, S.E. and Czech, M.P. (2001) A role for kinesin in insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **276**, 10677-10682.

- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D. and Ward, P.J. (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, **248**, 1122-1124.
- Eyster, C.A., Duggins, Q.S. and Olson, A.L. (2005) Expression of constitutively active Akt/protein kinase B signals GLUT4 translocation in the absence of an intact actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **280**, 17978-17985.
- Farzan, M., Schnitzler, C.E., Vasilieva, N., Leung, D. and Choe, H. (2000) BACE2, a beta - secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9712-9717.
- Felsenstein, K.M., Ingalls, K.M., Hunihan, L.W. and Roberts, S.B. (1994) Reversal of the Swedish familial Alzheimer's disease mutant phenotype in cultured cells treated with phorbol 12,13-dibutyrate. *Neurosci Lett*, **174**, 173-176.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E. and Sczufca, M. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, **366**, 2112-2117.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiesch, R., Ruble, C., Nye, J.S. and Curtis, D. (2002) *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, **3**, 85-97.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (2000) Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta*, **1502**, 122-132.
- Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M. and Mattson, M.P. (1996) Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem*, **67**, 1882-1896.
- Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J. and Raines, E.W. (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*, **276**, 37993-38001.
- Gasparini, L., Gouras, G.K., Wang, R., Gross, R.S., Beal, M.F., Greengard, P. and Xu, H. (2001) Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci*, **21**, 2561-2570.
- Giaccone, G., Tagliavini, F., Linoli, G., Bouras, C., Frigerio, L., Frangione, B. and Bugiani, O. (1989) Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett*, **97**, 232-238.

- Glabe, C. (2001) Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, **17**, 137-145.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V. and Eanes, E.D. (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol*, **2**, 357-369.
- Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J. and Younkin, S.G. (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, **255**, 728-730.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U. and Gajdusek, D.C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, **235**, 877-880.
- Gouras, G.K., Xu, H., Jovanovic, J.N., Buxbaum, J.D., Wang, R., Greengard, P., Relkin, N.R. and Gandy, S. (1998) Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons. *J Neurochem*, **71**, 1920-1925.
- Goutte, C. (2002) Genetics leads the way to the accomplices of presenilins. *Dev Cell*, **3**, 6-7.
- Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A. and Cataldo, A.M. (2003) Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem*, **278**, 31261-31268.
- Grilli, M., Ribola, M., Alberici, A., Valerio, A., Memo, M. and Spano, P. (1995) Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem*, **270**, 26774-26777.
- Grodstein, F., Chen, J., Wilson, R.S. and Manson, J.E. (2001) Type 2 diabetes and cognitive function in community-dwelling elderly women. *Diabetes Care*, **24**, 1060-1065.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S. and Wisniewski, H.M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, **261**, 6084-6089.
- Haass, C. (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J*, **23**, 483-488.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B. and Selkoe, D.J. (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*, **268**, 3021-3024.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y. and Selkoe, D.J. (1992a) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, **357**, 500-503.

- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B. and *et al.* (1992b) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, **359**, 322-325.
- Haass, C. and Selkoe, D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 101-112.
- Haass, C. and Steiner, H. (2002) Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol*, **12**, 556-562.
- Habermann, B. (2004) The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep*, **5**, 250-255.
- Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353-356.
- Hardy, J.A. and Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, **256**, 184-185.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S. and Muller, U. (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J*, **23**, 4106-4115.
- Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W. and De Strooper, B. (2003) gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci*, **116**, 1127-1136.
- Hinshaw, J.E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 483-519.
- Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L. and Evin, G. (2002) Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **51**, 783-786.
- Hong, M. and Lee, V.M. (1997) Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem*, **272**, 19547-19553.
- Hu, X., Hicks, C.W., He, W., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D. and Yan, R. (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*, **9**, 1520-1525.
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qiu, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H. and Selkoe, D.J. (1993) Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem*, **268**, 22959-22962.
- Hunker, C.M., Kruk, I., Hall, J., Giambini, H., Veisaga, M.L. and Barbieri, M.A. (2006) Role of Rab5 in insulin receptor-mediated endocytosis and signaling. *Arch Biochem Biophys*, **449**, 130-142.

- Jacobsen, J.S., Spruyt, M.A., Brown, A.M., Sahasrabudhe, S.R., Blume, A.J., Vitek, M.P., Muenkel, H.A. and Sonnenberg-Reines, J. (1994) The release of Alzheimer's disease beta amyloid peptide is reduced by phorbol treatment. *J Biol Chem*, **269**, 8376-8382.
- Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H. and Haass, C. (2002) Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol*, **158**, 551-561.
- Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G. and Ahringer, J. (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, **2**, RESEARCH0002.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S. and Malinow, R. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron*, **37**, 925-937.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-736.
- Kasai, K., Shin, H.W., Shinotsuka, C., Murakami, K. and Nakayama, K. (1999) Dynamin II is involved in endocytosis but not in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *J Biochem (Tokyo)*, **125**, 780-789.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G. and Emr, S.D. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 893-905.
- Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., Born, J. and Fehm, H.L. (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology*, **74**, 270-280.
- Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2006) Syndapin oligomers interconnect the machineries for endocytic vesicle formation and actin polymerization. *J Biol Chem*, **281**, 13285-13299.
- Kim, Y. and Chang, S. (2006) Ever-expanding network of dynamin-interacting proteins. *Mol Neurobiol*, **34**, 129-136.
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y. and Ruvkun, G. (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **277**, 942-946.
- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C.M., Irizarry, M.C. and Hyman, B.T. (2003) Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci*, **116**, 3339-3346.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C. and Hashimoto, Y. (2001) Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13554-13559.

- Knops, J., Lieberburg, I. and Sinha, S. (1992) Evidence for a nonsecretory, acidic degradation pathway for amyloid precursor protein in 293 cells. Identification of a novel, 22-kDa, beta-peptide-containing intermediate. *J Biol Chem*, **267**, 16022-16024.
- Koo, E.H. and Squazzo, S.L. (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, **269**, 17386-17389.
- Koo, E.H., Squazzo, S.L., Selkoe, D.J. and Koo, C.H. (1996) Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci*, **109** (Pt 5), 991-998.
- Kurten, R.C., Cadena, D.L. and Gill, G.N. (1996) Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science*, **272**, 1008-1010.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3922-3927.
- Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A.K., Lichtenthaler, S.F. and Haass, C. (2004) Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep*, **5**, 620-625.
- Lee, R.K., Wurtman, R.J., Cox, A.J. and Nitsch, R.M. (1995) Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8083-8087.
- Leibson, C.L., Rocca, W.A., Hanson, V.A., Cha, R., Kokmen, E., O'Brien, P.C. and Palumbo, P.J. (1997) The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Ann N Y Acad Sci*, **826**, 422-427.
- Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B. and Seed, B. (2003) The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem*, **278**, 48713-48719.
- Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S.J., Creemers, J., Seidah, N. and Checler, F. (2001) Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem*, **76**, 1532-1539.
- Lundmark, R. and Carlsson, S.R. (2003) Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components. *J Biol Chem*, **278**, 46772-46781.
- Lundmark, R. and Carlsson, S.R. (2004) Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *J Biol Chem*, **279**, 42694-42702.
- Lundmark, R. and Carlsson, S.R. (2005) Expression and properties of sorting nexin 9 in dynamin-mediated endocytosis. *Methods Enzymol*, **404**, 545-556.

- Lunn, J.A., Wong, H., Rozengurt, E. and Walsh, J.H. (2000) Requirement of cortical actin organization for bombesin, endothelin, and EGF receptor internalization. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C2019-2027.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M. and Vassar, R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*, **4**, 231-232.
- Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, **21**, 375-382.
- MaCaulay, S.L., Stoichevska, V., Grusovin, J., Gough, K.H., Castelli, L.A. and Ward, C.W. (2003) Insulin stimulates movement of sorting nexin 9 between cellular compartments: a putative role mediating cell surface receptor expression and insulin action. *Biochem J*, **376**, 123-134.
- Machesky, L.M. and Insall, R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, **8**, 1347-1356.
- Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, **8**, 425-427.
- Marambaud, P., Chevallier, N., Ancolio, K. and Checler, F. (1998) Post-transcriptional contribution of a cAMP-dependent pathway to the formation of alpha- and beta/gamma-secretases-derived products of beta APP maturation in human cells expressing wild-type and Swedish mutated beta APP. *Mol Med*, **4**, 715-723.
- Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N. and Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J*, **4**, 2757-2763.
- Maxfield, F.R. and McGraw, T.E. (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 121-132.
- Mayer, B.J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci*, **114**, 1253-1263.
- Mayeux, R., Honig, L.S., Tang, M.X., Manly, J., Stern, Y., Schupf, N. and Mehta, P.D. (2003) Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology*, **61**, 1185-1190.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R. and Yoon, Y. (2000a) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci*, **25**, 115-120.
- McNiven, M.A., Kim, L., Krueger, E.W., Orth, J.D., Cao, H. and Wong, T.W. (2000b) Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol*, **151**, 187-198.

- Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, **431**, 343-349.
- Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M. and Ungerer, A. (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12683-12688.
- Milward, E.A., Papadopoulos, R., Fuller, S.J., Moir, R.D., Small, D., Beyreuther, K. and Masters, C.L. (1992) The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*, **9**, 129-137.
- Morris, H.R., Khan, M.N., Janssen, J.C., Brown, J.M., Perez-Tur, J., Baker, M., Ozansoy, M., Hardy, J., Hutton, M., Wood, N.W., Lees, A.J., Revesz, T., Lantos, P. and Rossor, M.N. (2001) The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Arch Neurol*, **58**, 1813-1816.
- Müller U., V.G., J. Steinbach, A. Aguzzi, J.T. Herms, S.S. Sisodia, D.P. Wolfer, H.-P. Lipp. (1998) Single and combined gene deficiencies of APP/APLP1-family members. *Neurobiol. Aging*, **16**, 1174.
- Neumann, S., Schobel, S., Jager, S., Trautwein, A., Haass, C., Pietrzik, C.U. and Lichtenthaler, S.F. (2006) Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, **281**, 7583-7594.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y. and Ogata, E. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*, **362**, 75-79.
- Nixon, R.A. (2005) Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, **26**, 373-382.
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A. and Ruvkun, G. (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*, **389**, 994-999.
- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A. and Breteler, M.M. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*, **53**, 1937-1942.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J. and Black, R.A. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, **282**, 1281-1284.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, **303**, 495-499.

- Petiot, A., Faure, J., Stenmark, H. and Gruenberg, J. (2003) PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *J Cell Biol*, **162**, 971-979.
- Pike C.J., C.B.J., Monzavi R. and Cotman C.W. (1994) Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **63**, 517-531.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. and Gauthier, S. (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, **342**, 697-699.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H.A. and Herms, J. (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, **26**, 7212-7221.
- Prokop, S., Haass, C. and Steiner, H. (2005) Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem*, **94**, 57-62.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C. and Steiner, H. (2004) Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem*, **279**, 23255-23261.
- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P.J. and Kelly, R.B. (1999) Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell*, **10**, 501-513.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P. and Simons, K. (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11172-11177.
- Robakis, N.K., Wisniewski, H.M., Jenkins, E.C., Devine-Gage, E.A., Houck, G.E., Yao, X.L., Ramakrishna, N., Wolfe, G., Silverman, W.P. and Brown, W.T. (1987) Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet*, **1**, 384-385.
- Roberds, S.L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S., Freedman, S.B., Frigon, N.L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K.E., Kawabe, T.T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N.F., Power, M., Robertson, D.W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G.M., Shuck, M.E., Sinha, S., Svensson, K.A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S. and McConlogue, L. (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet*, **10**, 1317-1324.
- Rogers, G.W., Jr., Edelman, G.M. and Mauro, V.P. (2004) Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2794-2799.

- Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J.M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., Oltersdorf, T. and Schenk, D.B. (1989) Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*, **58**, 615-622.
- Sambrook J., a.D.W.R. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B.O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D.R., Landreth, G., Walter, J., Klockgether, T., van Leuven, F. and Heneka, M.T. (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 443-448.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B. and Haass, C. (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*, **2**, 835-841.
- Schafer, D.A., Weed, S.A., Binns, D., Karginov, A.V., Parsons, J.T. and Cooper, J.A. (2002) Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Curr Biol*, **12**, 1852-1857.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A. and De Camilli, P. (1998) Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 504-512.
- Schobel, S., Neumann, S., Seed, B. and Lichtenthaler, S.F. (2006) Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int J Dev Neurosci*, **24**, 141-148.
- Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Alber, J., Galldik, N., Kustermann, E., Arndt, S., Jacobs, A.H., Krone, W., Kahn, C.R. and Bruning, J.C. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3100-3105.
- Seet, L.F. and Hong, W. (2006) The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 878-896.
- Selkoe, D.J. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, **6**, 487-498.
- Selkoe, D.J. (1994) Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 373-403.
- Selkoe, D.J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, **8**, 447-453.
- Selkoe, D.J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, **399**, A23-31.

- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, **81**, 741-766.
- Selkoe, D.J., Podlisny, M.B., Joachim, C.L., Vickers, E.A., Lee, G., Fritz, L.C. and Oltersdorf, T. (1988) Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7341-7345.
- Selkoe, D.J. and Schenk, D. (2003) Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 545-584.
- Seto, E.S., Bellen, H.J. and Lloyd, T.E. (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev*, **16**, 1314-1336.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M.G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D.L., Bryant, K., Fritz, L.C., Galasko, D., Thal, L.J. and *et al.* (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*, **361**, 260-263.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C. and *et al.* (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, **359**, 325-327.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S.M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. and John, V. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, **402**, 537-540.
- Sisodia, S.S. (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6075-6079.
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A. and Price, D.L. (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*, **248**, 492-495.
- Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W. and Lee, V.M. (2000) Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem*, **275**, 2568-2575.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L. and Mobley, W.C. (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1217-1281.
- Solano, D.C., Sironi, M., Bonfini, C., Solerte, S.B., Govoni, S. and Racchi, M. (2000) Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway. *Faseb J*, **14**, 1015-1022.

- Solerte, S.B., Cravello, L., Ferrari, E. and Fioravanti, M. (2000) Overproduction of IFN-gamma and TNF-alpha from natural killer (NK) cells is associated with abnormal NK reactivity and cognitive derangement in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **917**, 331-340.
- Song, B.D. and Schmid, S.L. (2003) A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry*, **42**, 1369-1376.
- Soriano, S., Chyung, A.S., Chen, X., Stokin, G.B., Lee, V.M. and Koo, E.H. (1999) Expression of beta-amyloid precursor protein-CD3gamma chimeras to demonstrate the selective generation of amyloid beta(1-40) and amyloid beta(1-42) peptides within secretory and endocytic compartments. *J Biol Chem*, **274**, 32295-32300.
- Sorkin, A. and Von Zastrow, M. (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 600-614.
- Soulet, F., Yarar, D., Leonard, M. and Schmid, S.L. (2005) SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, **16**, 2058-2067.
- Sprecher, C.A., Grant, F.J., Grimm, G., O'Hara, P.J., Norris, F., Norris, K. and Foster, D.C. (1993) Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry*, **32**, 4481-4486.
- Stein, T.D., Anders, N.J., DeCarli, C., Chan, S.L., Mattson, M.P. and Johnson, J.A. (2004) Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci*, **24**, 7707-7717.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M.L., Baumeister, R., Fichteler, K. and Haass, C. (2000) Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol*, **2**, 848-851.
- Steiner, H., Than, M., Bode, W. and Haass, C. (2006) Pore-forming scissors? A first structural glimpse of gamma-secretase. *Trends Biochem Sci*, **31**, 491-493.
- Strooper, B.D. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*, **38**, 9-12.
- Struhl, G. and Adachi, A. (2000) Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell*, **6**, 625-636.
- Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M. and Neve, R.L. (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, **235**, 880-884.
- Toliver-Kinsky, T., Wood, T. and Perez-Polo, J.R. (2000) Nuclear factor kappaB/p49 is a negative regulatory factor in nerve growth factor-induced choline acetyltransferase promoter activity in PC12 cells. *J Neurochem*, **75**, 2241-2251.

- Torres-Aleman, I. (2000) Serum growth factors and neuroprotective surveillance: focus on IGF-1. *Mol Neurobiol*, **21**, 153-160.
- Tsakiridis, T., Tong, P., Matthews, B., Tsiani, E., Bilan, P.J., Klip, A. and Downey, G.P. (1999) Role of the actin cytoskeleton in insulin action. *Microsc Res Tech*, **47**, 79-92.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, **13**, 3191-3197.
- Vassar, R. (2001) The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, **17**, 157-170.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, **286**, 735-741.
- Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B. and Haass, C. (2000) Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J Biol Chem*, **275**, 23523-23529.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E. and Sisodia, S.S. (1996) The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem*, **271**, 31894-31902.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E. and Solomon, F. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10758-10762.
- Watson, G.S. and Craft, S. (2003) The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs*, **17**, 27-45.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, **57**, 115-126.
- Wertkin, A.M., Turner, R.S., Pleasure, S.J., Golde, T.E., Younkin, S.G., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (1993) Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9513-9517.
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C. and Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science*, **314**, 664-666.

- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T. and Selkoe, D.J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, **398**, 513-517.
- Worby, C.A. and Dixon, J.E. (2002) Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 919-931.
- Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Clemens, J.C., Kruger, R.P., Muda, M. and Dixon, J.E. (2001) The sorting nexin, DSH3PX1, connects the axonal guidance receptor, Dscam, to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **276**, 41782-41789.
- Xu, H., Sweeney, D., Greengard, P. and Gandy, S. (1996) Metabolism of Alzheimer beta-amyloid precursor protein: regulation by protein kinase A in intact cells and in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4081-4084.
- Xu, W.L., Qiu, C.X., Wahlin, A., Winblad, B. and Fratiglioni, L. (2004) Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Neurology*, **63**, 1181-1186.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrichson, R.L. and Gurney, M.E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, **402**, 533-537.
- Yoo, A.S., Bais, C. and Greenwald, I. (2004) Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development. *Science*, **303**, 663-666.
- Zhang, J., Shehabeldin, A., da Cruz, L.A., Butler, J., Somani, A.K., McGavin, M., Koziaradzki, I., dos Santos, A.O., Nagy, A., Grinstein, S., Penninger, J.M. and Siminovitch, K.A. (1999) Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med*, **190**, 1329-1342.
- Zheng, B., Ma, Y.C., Ostrom, R.S., Lavoie, C., Gill, G.N., Insel, P.A., Huang, X.Y. and Farquhar, M.G. (2001) RGS-PX1, a GAP for GalphaS and sorting nexin in vesicular trafficking. *Science*, **294**, 1939-1942.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Haass für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, für die nette Arbeitsatmosphäre sowie die großartige Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit.

Bei Herrn Professor Dr. Thomas Cremer möchte ich mich herzlich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Stefan Jentsch für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Stefan Lichtenthaler für die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Sein großes Interesse an meiner Doktorarbeit sowie die fortlaufende Unterstützung, die stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit haben einen großen Anteil zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen.

Ohne Stephanie Neumann wäre meine Doktoranden-Zeit nur halb so schön gewesen. Danke für die gute Zusammenarbeit, danke für zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen, vor allem aber danke für die vielen privaten Gespräche und deine Freundschaft. Werde dich sehr vermissen!

Besonderer Dank gilt meinen weiteren Laborkollegen, ohne die es im Labor nur halb so lustig gewesen wäre: Sylvia Fischer für offene Worte, ganz viele Süßigkeiten und München-Insider-Tipps; Katrin Moschke für die exzellente technische Unterstützung im Labor, für ihre große Hilfsbereitschaft und für ihr wirklich gutes Gedächtnis; Stefan Mitterreiter, Peer-Henrik Kuhn und Bastian Dislich danke ich für die gute Stimmung im Labor sowie für motivierende Worte, wenn es mal nicht so gut lief.

Des Weiteren möchte ich mich bei Philipp Kahle und Harald Steiner für ihre andauernde Diskussionsbereitschaft und ihrem Interesse an meiner Arbeit, aber auch an meiner Person, bedanken. Danke auch an Anja Capell, Sven Lammich und Christof Haffner für ihre große Hilfsbereitschaft und eine sehr nette Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an Dr. Maren Hertweck, ohne die eine Analyse von Ist-4/SNX33 in *C. elegans* nicht möglich gewesen wäre. Danke für eine erfolgreiche und nette Zusammenarbeit!

Ich danke allen weiteren Mitgliedern des Labors, ganz besonders Ann-Kathrin-Ludwig, Karin Görner, Sonja Zillow, Katrin Fellerer, Angelika Rambold, Margit Miesbauer und Anita Schlierf für zahlreiche lustige „Mädel-Abende“. Danke an Bozo Novak für ein mehrfaches Umziehen meiner Möbel und eine lustige Zeit, vor allem in der Zellkultur. Ein herzlicher Dank gilt auch Regina Fluhrer für eine nicht-enden-wollende Hilfsbereitschaft und Motivation, lustige Kletterabende und fürs Zuhören.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und Richard Page, die mich immer unterstützt haben, immer an mich geglaubt haben, bedingungslos hinter meinen Entscheidungen stehen und mein großer Rückhalt sind.

Lebenslauf

Susanne Schöbel

Persönliche Daten:

Adresse: Susanne Schöbel
Stiftsbogen 49
81375 München
email: susanne.schoebel@med.uni-muenchen.de

Geburt: 15.05.1979 in Nürnberg
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig

Promotion:

Seit April 2003 Promotion in Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Prof. Dr. T. Cremer und Prof. Dr. C. Haass
Titel: *Analyse eines neuen Sorting Nexins und seiner Funktion in der β APP-Prozessierung*

Studium:

Nov. 1998 – Feb. 2003 Studiengang Biochemie Diplom (Note: 1,3)
Universität Bayreuth

Jul. 2002 – Feb. 2003 Diplomarbeit im Fach Genetik (Note: 1,3)
Universität Bayreuth
Prof. Dr. W. Schumann
Titel: *Analyse der Modulation des Sigma- Faktors σ^W aus Bacillus subtilis*

Schulbildung

Juli 1998 Abitur am Hans-Sachs-Gymnasium in Nürnberg (Note 1,3)

Stipendien und Preise

Nov. 2005 – Dez. 2006 Mitglied des NeuroNE-Netzwerks
("European consortium for research in neurodegenerative diseases")

März 2006 Vortragspreis des Roche-Symposiums in Basel, Schweiz
("Symposium for leading bioscientists of the next decade")

Apr. 2003 – Apr. 2005 DFG-Graduiertenstipendium: Neurotraumatologie und Neurorehabilitation

Publikationen

Neumann, S., **Schobel, S.**, Jäger, S., Haass, C., Pietrzik, C.U. and Lichtenthaler, S.F. APLP1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein. *JBC*. (2005)

Schobel, S., Neumann, S., Seed, B. and Lichtenthaler, S.F. Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *IJDN*. (2005)

Lammich, S., **Schobel, S.**, Zimmer, A.-K., Lichtenthaler, S. F. and Haass C. Expression of the Alzheimer protease BACE1 is regulated by translational control. *EMBO Rep*. (2004)

Schobel, S., Zellmeier, S., Schumann, W. and Wiegert, T. The Bacillus subtilis σ W Anti-Sigma Factor is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *M. Microbiology* (2004)

Vorträge

Nov. 2006
Vortrag im Rahmen des SFB596: Molekulare Mechanismen der Neurodegeneration
Titel: *SNX33 limits amyloid beta generation*
München, Deutschland

März 2006
Roche Symposium für "Leading Bioscientists of the Next Decade"
Titel: *Characterization of a novel sorting nexin and its role in Alzheimer's Disease*
Basel, Schweiz

Mai 2005
Gast sprecher am Institut für Chirurgische Forschung
Titel: *SNX30 – a novel protein involved in APP processing*
München, Deutschland

Okt. 2003
Konferenz des DFG-Graduiertenkollegs 688:
Neurotraumatologie und Neurorehabilitation
Titel: *Regulation of the aspartyl protease BACE1*
Venedig, Italien

Posterpräsentationen

Jul. 2006
10. Internationale Alzheimer-Konferenz
("The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders")
Titel: *Sorting Nexin 31 is a novel activator of the α -cleavage of the amyloid precursor protein*
Madrid, Spanien

Feb. 2006
Erste jährliche Tagung des NeuroNE-Vereinigung
("First annual meeting of the NeuroNE consortium")
Titel: *A novel Sorting Nexin involved in endocytosis and the proteolytic processing of the amyloid precursor protein*
London, Großbritannien

Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding

Susanne Schöbel^a, Stephanie Neumann^a,
Brian Seed^b, Stefan F. Lichtenthaler^{a,*}

^a *Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany*

^b *Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA*

Received 1 November 2005; accepted 10 November 2005

Abstract

Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein (APP) is a key regulatory step in the generation of the amyloid β peptide ($A\beta$), which is thought to provoke the pathogenesis of Alzheimer's disease. To better understand the cellular processes that regulate ectodomain shedding of APP we used human embryonic kidney 293 cells and applied a sib-selection expression cloning approach. In addition to a known activator of APP shedding – protein kinase A – the following cDNAs were identified: the endocytic proteins endophilin A1 and A3, the metabotropic glutamate receptor 3 (mGluR3), palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1), Numb-like and the kinase MEKK2. Endophilins A1 and A3, as well as mGluR3 activated APP shedding relatively specifically. They had little or no effect on the shedding of the unrelated membrane proteins TNF receptor 2 and P-selectin glycoprotein ligand-1. In contrast, MEKK2 and PKA also increased shedding of TNF receptor 2, suggesting that these kinases contribute to a general program regulating ectodomain shedding. The strongest activator of APP shedding, endophilin A3, reduced the rate of APP endocytosis and specifically increased APP shedding by the protease α -secretase, as measured in an antibody uptake assay and by immunoblot analysis. This suggests that endophilin A3 is a novel modulator of APP trafficking affecting access of APP to α -secretase. In summary, this study shows that expression cloning is a suitable way to identify proteins controlling ectodomain shedding of membrane proteins.

© 2005 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ectodomain shedding; Amyloid precursor protein; Alzheimer's disease; Endocytosis

A large number of membrane proteins are proteolytically converted to their soluble counterparts. This process is referred to as ectodomain shedding and is an important way of regulating the biological activity of membrane proteins (Blobel, 2005; Huovila et al., 2005). This process has been described for type I, type II and GPI-anchored membrane proteins (reviewed in Blobel, 2005; Hooper et al., 1997; Huovila et al., 2005) and is found in many multicellular organisms. Ectodomain shedding is required in various biological processes, such as contact-mediated axon repulsion (Hattori et al., 2000), during embryonic development (Hartmann et al., 2002; Peschon et al., 1998) and in the immune system (for an overview see Schlondorff and Blobel, 1999), but also in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). In AD, shedding of the amyloid precursor protein (APP) is an essential

regulatory step in the formation of the amyloid β peptide ($A\beta$). Generation and subsequent deposition of $A\beta$ are assumed to be the first events in the pathogenesis of AD (for a review see Selkoe and Schenk, 2003). The shedding of APP may occur through two different protease activities termed α - and β -secretase, which cleave APP within its ectodomain close to its transmembrane domain (Fig. 1A). The β -secretase is the aspartyl protease BACE1 and cleaves APP at the N-terminus of the $A\beta$ peptide domain, thus catalyzing the first step in $A\beta$ peptide generation (reviewed in Citron, 2004). After the initial cleavage of APP by BACE1, the remaining C-terminal APP-fragment is cleaved by γ -secretase within its transmembrane domain at the C-terminus of the $A\beta$ domain, leading to the secretion of the $A\beta$ -peptide (for an overview see Haass, 2004). In contrast to β -secretase, α -secretase cleaves within the $A\beta$ -sequence and thereby precludes $A\beta$ peptide generation. The α -secretase is a member of the ADAM-family of proteases and may be ADAM10, ADAM17 (TACE) or ADAM9 (Allinson et al., 2003). The α -secretase cleavage of APP is assumed to take place at or

* Corresponding author. Tel.: +49 89 218075453; fax: +49 89 218075415.

E-mail address: Stefan.Lichtenthaler@med.uni-muenchen.de (S.F. Lichtenthaler).

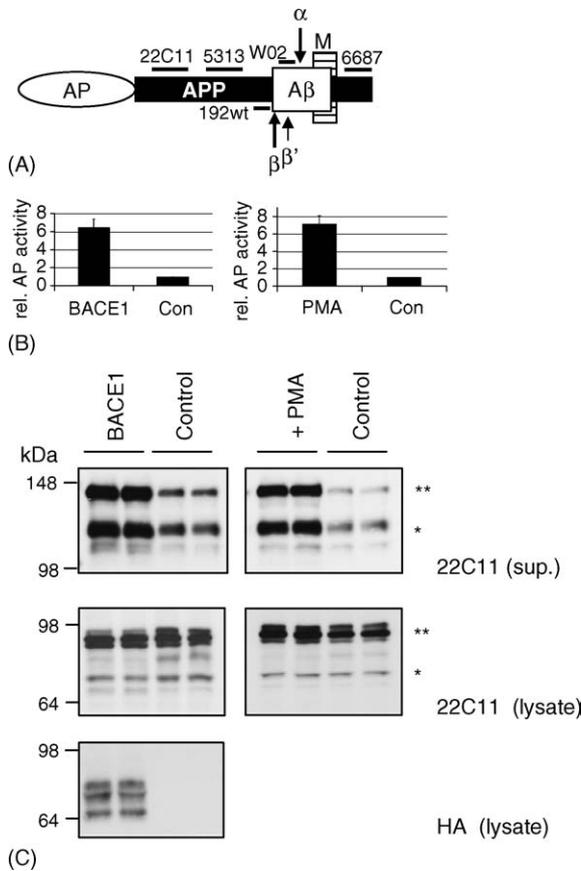


Fig. 1. Alkaline phosphatase reporter assay for the ectodomain shedding of APP. (A) Schematic drawing of APP695 fused to the ectodomain of the reporter enzyme alkaline phosphatase (AP), resulting in the AP-APP fusion protein. Horizontal bars show the epitopes recognized by the indicated antibodies. Arrows point to the proteolytic α -, β - and β' -cleavage sites within the APP ectodomain. The β' -cleavage site is an additional cleavage site of the β -secretase BACE1. M: membrane. (B) Human embryonic kidney 293 cells stably expressing AP-APP (clone SABC70) were transiently transfected with a BACE1-encoding plasmid or control vector (left panel) or treated with the phorbol ester PMA (1 μ M, right panel). PMA and the overexpression of BACE1 stimulate the secretion of AP-APP as determined by the increased AP activity in the conditioned medium relative to control cells. The AP activity represents the mean and standard deviation of two independent experiments, each one carried out in duplicate. (C) Aliquots of the experiments in (B) were separated by electrophoresis and analyzed by immunoblot for secreted APP (upper panels, using antibody 22C11), for cellular APP (middle panels, using antibody 22C11) and for BACE1 expression (lower panel, detected with an antibody against the C-terminal HA epitope tag of BACE1). * Endogenous APP; ** AP-APP; sup.: supernatant.

close to the cell surface, whereas β -secretase cleavage takes place after endocytosis of APP into endosomes.

α -Secretase and β -secretase compete for the ectodomain cleavage of APP (Skovronsky et al., 2000), but have opposite effects on A β generation. Additionally, α - but not β -secretase cleavage generates a secreted form of APP (APPs α), which has neurotrophic and neuroprotective properties (Furukawa et al., 1996; Meziane et al., 1998; Stein et al., 2004). Thus, shifting APP shedding away from β - towards α -secretase cleavage may be therapeutically beneficial for AD. In order to do so, it is essential to understand the cellular pathways that regulate the activity of both proteases. However, to date little is known

about such cellular pathways (for reviews see Huovila et al., 2005; Lichtenthaler and Haass, 2004). To explore the contributory pathways systematically, we employed sib-selection expression cloning, which is a powerful genetic screening method to identify cDNAs by their function. A human brain cDNA library was used to obtain seven cDNAs that stimulate the ectodomain shedding of APP. To control for specificity, the influence of the identified cDNAs was analyzed on the shedding of the two unrelated membrane proteins TNF receptor 2 (TNFR2) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). Like APP, both proteins are subject to ectodomain shedding by ADAM proteases. Two of the proteins that strongly and specifically activated shedding of APP are members of the endophilin family of endocytic and signal transducing proteins (for reviews see Huttner and Schmidt, 2002; Reutens and Glenn Begley, 2002).

1. Experimental procedures

1.1. Reagents

The following antibodies were used: anti-HA epitope antibody HA.11 (Covance), HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (DAKO), HRP-coupled goat anti-mouse (DAKO). Antibodies 5313 (against APP ectodomain) and 6687 (against APP C-terminus) were described previously (Steiner et al., 2000) and provided by Christian Haass. Antibody 192 wt specific for the C-terminus of APPs β (Seubert et al., 1993) was provided by Dale Schenk. Antibodies 22C11 (anti APP ectodomain) and W02 (against amino acids 5–8 of A β) (Ida et al., 1996) were provided by Konrad Beyreuther. Antibody sc-10880 against endophilin A3 was from Santa Cruz Biotechnology. Alexa555-coupled secondary anti-rabbit antibody was from Molecular Probes. PMA was obtained from Sigma. The metalloprotease inhibitor TAPI was purchased from Peptides International.

1.2. Plasmid construction

Generation of vector peak12 expressing BACE1 and ADAM10 has been described (Lichtenthaler et al., 2003). The following cDNAs in the peak8 expression vector were obtained from a human brain cDNA library (Edgebio): endophilin A1 and A3, catalytic α -subunit of PKA, Numb-like, MEKK2 (lacking 707 nucleotides at the 5' end of the coding sequence), PPT1 (lacking the first four nucleotides of the coding sequence and having an insertion of one adenosine into the stretch of seven adenosines within the 5' half of the coding sequence), mGluR3. The cDNAs of endophilin A1, A2 and A3 tagged with N- or C-terminal epitope tags (HA, GFP) were cloned into the expression vector peak12. The identity of all constructs obtained by PCR was confirmed by DNA sequencing. Peak12 vectors encoding the alkaline phosphatase (AP) fusion proteins AP-APP, AP-PSGL-1 and AP-TNFR2 as well as the vector encoding Bcl-X_L, CrmA and RIP were described previously (Lichtenthaler et al., 2003; Pimentel-Muinos and Seed, 1999). AP-APP consists of the ectodomain of AP fused to full-length APP695 lacking its signal peptide.

1.3. Cell culture, transfections, Western blot

293-EBNA cells were cultured in DMEM (Gibco) containing 10% FBS (Hyclone). Clonal 293 cells expressing AP-APP and Bcl-X_L/CrmA (clone SABC70) were generated and cultured as described (Lichtenthaler et al., 2003). Transfections were carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). One day after transfection, the medium was replaced with fresh medium. After over-night incubation conditioned medium and cell lysate (in 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40) were collected. AP activity was measured as described previously (Lichtenthaler et al., 2003). Aliquots of the conditioned medium were treated for 30 min at 65 $^{\circ}$ C to heat-inactivate the endogenous alkaline phosphatase activity.

To analyze the effect of PMA and TAPI on shedding, cells were treated as described previously (Lichtenthaler et al., 2003). For the detection of secreted and cellular APP by immunoblot, the protein concentration in the cell lysate was measured, and corresponding aliquots of lysate or conditioned medium were directly loaded onto an electrophoresis gel. Immunoblot detection was carried out using the indicated antibodies.

1.4. Expression cloning

Individual bacterial clones from a human adult brain cDNA library (Edgebio) were arrayed into 384-well plates using the Qbot (Genetix, UK). Subsequently, 96 clones were pooled using the Biomek FX Workstation (Beckman Coulter). Miniprep DNA of the pools was generated with the Biorobot 9600 (Qiagen) and transfected into the AP-APP reporter cell line using lipofectamine 2000 (Invitrogen). One day after transfection the medium was replaced with fresh medium. Two days after transfection, supernatants were collected and assayed for AP activity. In cDNA pools leading to an increased AP activity, the individual cDNA was isolated with two more rounds of screening: first, the initial 96 clones were arrayed into pools of 8 clones, which were tested as above for an increased AP activity. In the positive pool, all eight individual clones were tested. The identified cDNAs were sequenced from both ends for several hundred base pairs.

1.5. APP antibody uptake assay

COS cells plated on coverslips were cotransfected with wild-type APP695 and C-terminally GFP-tagged endophilin A3 or GFP as a control. APP endocytosis was determined as described previously (Kaether et al., 2002). In brief, transfected COS cells were washed with ice cold PCM (PBS supplemented with 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂), and incubated on ice in a 1:200 dilution of antibody 5313 in PCM. After 20 min, cells were washed in PCM on ice and then PCM was replaced by prewarmed culture medium and cells were placed for the indicated time points (see Fig. 4A) in a 37 °C incubator. Afterwards, coverslips were transferred to 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in PBS, fixed for 20 min and processed for standard immunofluorescence using Alexa555-coupled secondary anti-rabbit antibodies. Fixed cells were analyzed on a Zeiss Axioskop2 plus microscope equipped with a 63×/1.25 objective and standard FITC and TRITC fluorescence filter sets. Images were obtained using a Spot Camera (Zeiss AxioCam HRm) and the MetaView Imaging software (Universal Imaging Corp.) Experiments were performed at least three times, and around 100 cells were scored per cell line and time point.

1.6. Transferrin uptake assay

COS cells plated on coverslips were transfected with C-terminally GFP-tagged endophilin A3 or GFP as a control. Transferrin receptor endocytosis was performed as described previously (Leprince et al., 2003) under slightly modified conditions. The seeded COS cells were preincubated for 1 h in serum-free DMEM containing 20 mM HEPES pH 7.5 at 37 °C. Endocytosis of AlexaFluor555 conjugated transferrin was performed at 37 °C for different time points (see Fig. 4B) in endocytosis medium (DMEM, 20 mM HEPES pH 7.5, 1 mg/ml BSA) containing 50 µg/ml Alexa555-conjugated transferrin (Molecular Probes). After the incubation with the conjugate, cells were rapidly cooled at 4 °C, washed twice with ice cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in PBS for 20 min at 4 °C. Cells were then processed for standard immunofluorescence as above.

2. Results

2.1. Reporter cell line for the analysis of APP ectodomain shedding

For the expression cloning screen a reporter cell line was generated that allows a rapid detection of APP shedding in a high-throughput format. To this aim human embryonic kidney

293 cells were used, which stably express a fusion protein (AP-APP) consisting of secretory alkaline phosphatase (AP) upstream of full-length APP (Fig. 1A). To protect the cells against possible cell death induced by proapoptotic genes represented in the cDNA pools, the 293 cells were additionally transfected with a plasmid encoding the cDNA of two antiapoptotic proteins, Bcl-X_L and CrmA. Clonal cell lines were established and analyzed for protection against apoptosis as well as for the secretion of AP-APP. Clone SABC70 was resistant to apoptosis induced by overexpression of the proapoptotic kinase RIP (receptor-interacting protein; not shown) and was used for further analysis throughout this study (referred to as AP-APP cells). As a positive control, the AP-APP cells were transiently transfected with control vector or with the cDNA of the β-secretase BACE1, which controls the shedding of APP. Transfection of BACE1 strongly increased AP-APP shedding, as determined by AP activity measurement in the conditioned medium (Fig. 1B). The increase in AP-APP shedding was also observed by immunoblot analysis, where both AP-APP and the endogenous APP were detected (Fig. 1C). As an additional control, the AP-APP cells were treated with the phorbol ester PMA, a known inducer of the ADAM protease mediated ectodomain shedding of APP. PMA increased AP-APP shedding as measured in the AP activity assay (Fig. 1B) and by immunoblot analysis (Fig. 1C). The PMA and BACE1-induced increase in secreted AP-APP (as determined by immunoblot analysis) correlated well with the increase of AP activity in the conditioned medium (Fig. 1B and C), showing that the measurement of AP activity is a reliable means of detecting the amount of the secreted AP-APP fusion protein regardless of whether the cleavage occurred through an ADAM protease or BACE1.

2.2. Expression cloning of shedding-activating cDNAs

For the sib-selection expression cloning we used an unamplified human adult brain cDNA library, which was arrayed into pools of 96 cDNAs each. Screening of >100,000 cDNAs yielded seven cDNAs that increased secretion of AP-APP. The strongest shedding-inducing activity was observed for the proteins endophilin A1 and A3, which increased the secretion at least four-fold (Fig. 2A). A 1.5–3-fold increase was observed for five additional proteins: the metabotropic glutamate receptor 3 (mGluR3), Numb-like (Nbl), which is a modulator of Notch signal transduction and binds to the APP cytoplasmic domain (Roncarati et al., 2002), the catalytic α-subunit of protein kinase A (PKA), palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1; two individual clones of this cDNA were obtained) and a N-terminally truncated form of the kinase MEKK2 (Fig. 2B). The identification of PKA is in agreement with previous publications showing that an activation of PKA by forskolin in rat pheochromocytoma PC12 cells (Xu et al., 1996) and in human embryonic kidney 293 cells (Marambaud et al., 1998) increased the shedding of APP. This validates the screening approach as it shows that physiologically relevant cDNAs can be obtained.

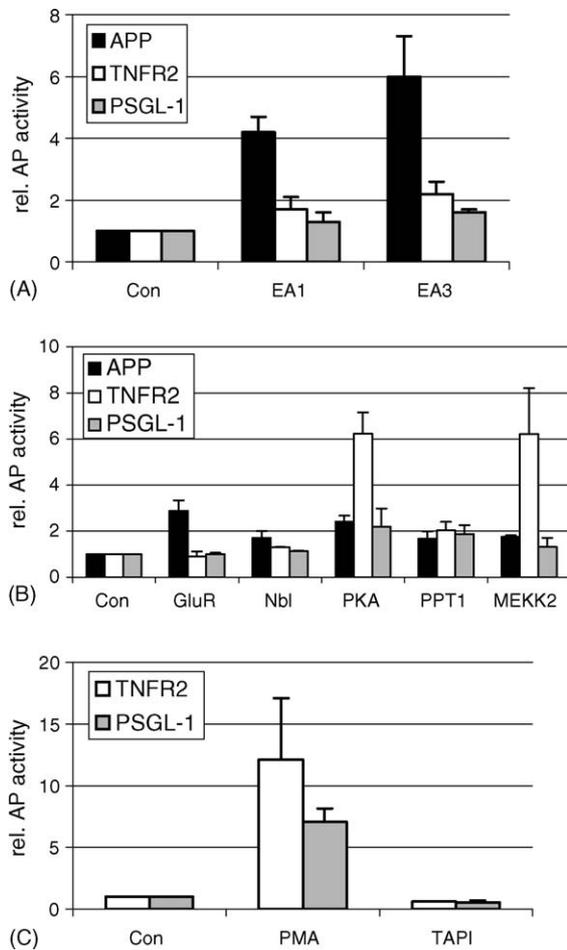


Fig. 2. Stimulatory effect of the identified cDNAs on the shedding of APP, TNFR2 and PSGL-1. (A and B) Kidney 293 cells stably expressing AP fusion proteins of APP, TNFR2 or PSGL-1 were transiently transfected with plasmids encoding the cDNAs indicated below the graphs. AP activity was measured in the conditioned medium and represents the mean and standard deviation of two to three independent experiments, each one carried out in duplicate. Con: control, EA1: endophilin A1; EA3: endophilin A3; GluR: mGluR3; Nbl: Numb-like. (C) Kidney 293 cells stably expressing AP-TNFR2 or AP-PSGL-1 were treated for 3 h with PMA (1 μ M) or with the metalloprotease inhibitor TAPI (25 μ M). AP activity was measured as above.

2.3. Shedding-inducing cDNAs stimulate the shedding of different membrane proteins

Several membrane proteins besides APP undergo ectodomain shedding. Therefore, we studied whether the identified seven cDNAs specifically influenced the shedding of APP or also stimulated the shedding of other type I membrane proteins and thus may be part of a cellular machinery regulating ectodomain shedding in general. To this aim, the TNF receptor 2 and the PSGL-1, which mediates leukocyte adhesion in inflammatory reactions (McEver and Cummings, 1997), were expressed as AP-fusion proteins in 293 cells. The AP-fusion proteins show the same regulation of their shedding as reported previously for the wild-type proteins (Davenpeck et al., 2000; Peschon et al., 1998), since the phorbol ester PMA stimulated the shedding of both AP-TNFR2 and AP-PSGL-1 (Fig. 2C). Moreover, the metalloprotease inhibitor TAPI inhibited the

shedding of both fusion proteins by \sim 40% (Fig. 2C), as expected for the cleavage by a metalloprotease of the ADAM-family.

Next, the seven cDNAs identified in the screen were transiently transfected into the AP-PSGL-1 and AP-TNFR2 cells in addition to the AP-APP cells. Measurement of AP activity revealed that they had differential effects on the shedding of TNFR2 and PSGL-1 (Fig. 2A and B). Endophilins A1 and A3 as well as mGluR3 clearly activated APP shedding, but had no or only little effect on the shedding of TNFR2 and PSGL-1. Likewise, Nbl weakly activated shedding of APP but not of TNFR2 and PSGL-1 (Fig. 2B). In contrast, PKA and MEKK2 strongly activated TNFR2 shedding, but only had a mild effect on the shedding of APP or PSGL-1. PPT1 mildly activated the cleavage of all three proteins. Taken together, the analysis of the shedding of the three fusion proteins shows that they fall into three different classes. Class I comprises endophilins A1, A3, mGluR3 and the weak activator Nbl, which activated APP shedding in a relatively specific manner. Class II consists of the kinases PKA and MEKK2 that are strong activators of TNFR2 shedding, but only modestly affected shedding of APP and PSGL-1. PPT1 belongs to the third class and seems to be a general stimulator of ectodomain shedding. Because endophilin A3 was the strongest and a relatively specific activator of APP cleavage, we focused on this protein to determine the mechanism underlying its shedding enhancing activity.

2.4. Endophilin A3 stimulates the shedding of endogenous APP

First, we tested whether endophilin A3 stimulated the shedding of APP by α - or by β -secretase. To this goal, human embryonic kidney 293 cells expressing the endogenous, wild-type APP were transiently transfected with endophilin A3 carrying a C-terminal HA epitope tag or with control vector. Soluble APP generated by α -secretase (APP α) or β -secretase (APP β) was detected in the conditioned medium using cleavage site-specific antibodies. Antibody 192 wt specifically detects APP β (Seubert et al., 1993), whereas antibody W02 binds to an epitope between the β - and the α -secretase cleavage sites (Ida et al., 1996) (Fig. 1A). Thus, W02 does not detect APP β , but instead APP α . Additionally, W02 detects APP β ', which starts at amino acid Glu11 of the A β sequence and represents a minor secondary cleavage site of BACE1. Compared to control cells W02 detected a strong increase in soluble APP in the endophilin A3 expressing cells (Fig. 3A). No increase in soluble APP β was detected with antibody 192 wt. In some experiments a slight reduction in APP β was observed (data not shown). This reveals that endophilin A3 mainly stimulated the α -secretase cleavage and only had a minor effect on the β -secretase cleavage of APP. Expression of endophilin A3 very slightly increased the amount of mature APP in the cell lysate, as determined using an antibody against the C-terminus of APP (Fig. 3A). Endophilin A3 was clearly expressed in the cell lysate with an apparent molecular weight of around 50 kDa (Fig. 3A).

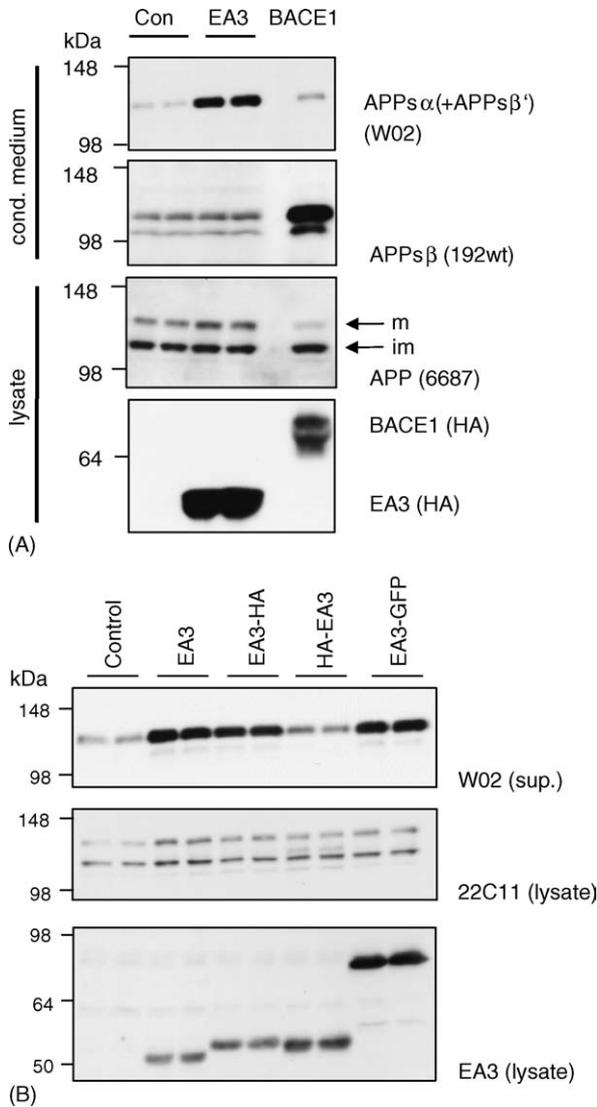


Fig. 3. Endophilin A3 increases α -secretase cleavage of endogenous APP. (A) 293 cells were transiently transfected with empty control vector (Con), endophilin A3 (EA3) or BACE1 as a control. Aliquots of the conditioned medium and the cell lysate were separated by electrophoresis. Soluble APP in the conditioned medium was detected by immunoblot analysis using antibody W02 (detecting soluble APP cleaved at the α - or β '-site) and antibody 192wt (against the β -cleaved soluble APP, APPs β). The total amount of APP in the cell lysate was detected using antibody 6687, which binds to the C-terminus of APP. Expression of endophilin A3 and BACE1 in the cell lysate is shown using a HA-antibody against their C-terminal epitope tag. Shown are representative blots of at least three independent experiments. m: mature APP; im: immature APP. (B) To test whether an epitope tag or a GFP fusion might alter the shedding stimulatory function of endophilin A3 (EA3), the indicated constructs were transiently transfected in 293 cells. Soluble APP in the conditioned medium was detected by immunoblot analysis using antibody W02 (detecting soluble APP cleaved at the α - or β '-site). APP in the cell lysate was detected with antibody 22C11 against the ectodomain of APP. Expression of endophilin constructs was shown using an antibody against endophilin A3. Experiments are shown in duplicate. sup.: supernatant; EA3-HA: EA3 with a C-terminal HA-tag; HA-EA3: EA3 with an N-terminal HA-tag; EA3-GFP: EA3 with a C-terminal fusion to GFP.

As a control, the kidney 293 cells were transiently transfected with the β -secretase BACE1. As expected, this led to a strong increase in APPs β secretion, as determined by immunoblot analysis using antibody 192 wt (Fig. 3A). Addi-

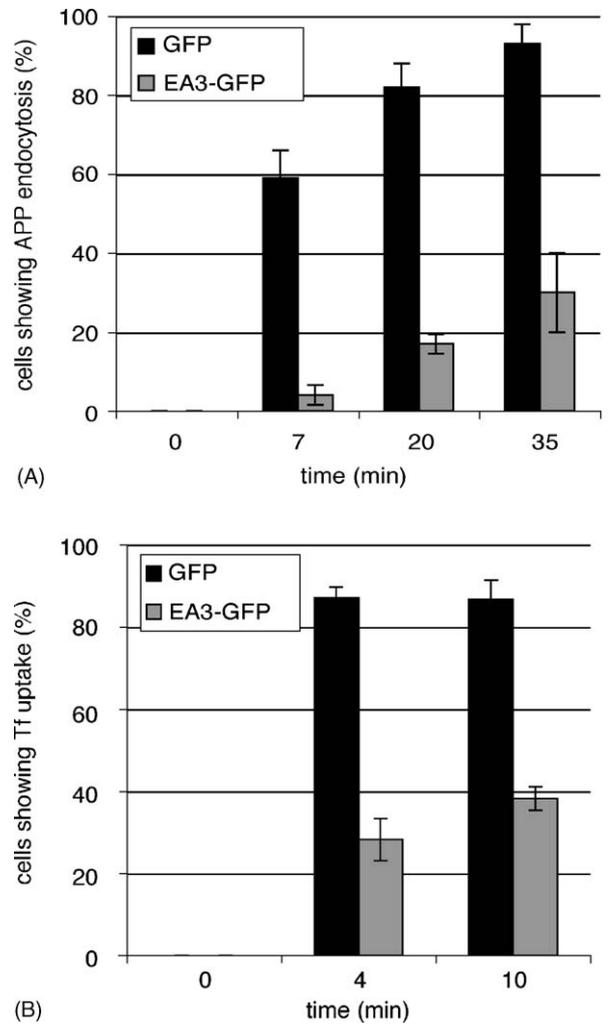


Fig. 4. Endophilin A3 reduces APP endocytosis and transferrin uptake. (A) COS cells were transiently cotransfected with APP695 and C-terminally GFP-tagged endophilin A3 (EA3-GFP) or GFP as a control. On ice, cells were incubated with antibody 5313 against the ectodomain of APP. Cells were returned to 37 °C for the indicated time points to allow endocytosis to occur. Cells were fixed, stained with a secondary antibody against the primary APP antibody and analyzed by fluorescence microscopy. Around 100 cells expressing GFP or EA3-GFP were analyzed at every time point and scored as showing or not showing endocytosis. Given are the mean and the standard deviation of two independent experiments. (B) COS cells were transiently transfected with EA3-GFP or GFP as a control. Cells were incubated with fluorescently labeled transferrin (Tf) for the indicated time periods as described in the methods section. Shown are the mean and the standard deviation of two independent experiments. Around 100 cells were analyzed at every time point and scored as showing or not showing endocytosis.

tionally, a slight increase in APP secretion was detected with antibody W02, presumably resulting from the increase in APP β '-cleavage (alternative β -secretase cleavage site as described above).

In an additional control experiment we verified that the C-terminal HA-epitope tag used for the above transfections did not alter the APP shedding-stimulatory function of endophilin A3. To this aim, kidney 293 cells were transiently transfected with control vector, with endophilin A3 without an epitope tag or with endophilin A3 carrying a C-terminal HA-tag (EA3-HA) or a C-terminal fusion to GFP (EA3-GFP). Both EA3-HA and

EA3-GFP stimulated APP shedding in a similar manner as untagged wild-type endophilin A3 (Fig. 3B), as detected by immunoblot analysis using antibody W02. Similar results were obtained when the tagged endophilin A3 proteins were expressed in the AP-APP reporter cell line (results not shown). In contrast, a N-terminal HA epitope tag (HA-EA3) completely abolished the shedding enhancing effect of endophilin A3 (Fig. 3B). This construct was not further used in this study.

2.5. Endophilin A3 inhibits APP endocytosis and transferrin uptake

APP α -cleavage occurs at or close to the plasma membrane (Sisodia, 1992), whereas β -cleavage of wild-type APP mainly occurs after endocytosis in the endosomes. Given that endophilin A3 increased the α - but not the β -cleavage of APP, we tested for a possible influence of endophilin A3 on APP endocytosis using an APP antibody uptake assay as described previously (Kaether et al., 2002). APP together with C-terminally GFP-tagged endophilin A3 or with GFP (as a control) was transiently cotransfected into COS cells. Surface APP was labeled on ice with an antibody against the APP ectodomain. Returning the cells to 37 °C allowed APP to be endocytosed together with the prebound antibody. After different time periods the cells were fixed, permeabilized and stained with a secondary antibody against the prebound anti-APP antibody. Using immunofluorescence analysis the transfected cells were identified by their green fluorescence (GFP or endophilin A3-GFP). Individual cells were scored as showing endocytosis, if the APP-staining revealed endocytic vesicles. In contrast, they were scored as not showing endocytosis if patchy cell surface APP staining was visible. At every time point 100 cells were analyzed. Compared to control transfected cells endophilin A3 strongly reduced the rate of APP endocytosis (Fig. 4A). In contrast to the specific effect of endophilin A3 on APP shedding (Fig. 2A), it did not only act on APP endocytosis, but it also reduced the rate of transferrin uptake (Fig. 4B), which is in agreement with a previous study (Sugiura et al., 2004).

3. Discussion

The ectodomain shedding of APP can be stimulated by several different proteins, including kinases and cytosolic adapter proteins, as well as by extracellular stimuli, such as phorbol esters, growth factors and estrogen (for a review see Allinson et al., 2003). Many of these stimuli activate the α -secretase cleavage of APP. However, the molecular and cellular processes, which are activated by these stimuli and which finally execute the increased cleavage of APP, remain largely unknown. To explore the contributory pathways systematically, we have undertaken a sib-selection expression cloning study to identify genes that might regulate the shedding of APP. The screening approach is validated by our identification of PKA, which is a known regulator of the shedding of APP (Marambaud et al., 1998; Xu et al., 1996). The other six proteins have not previously been reported to be involved in

APP shedding. Because the ectodomain shedding of APP by β -secretase, but not by α -secretase is tightly linked to the pathogenesis of Alzheimer's disease (Selkoe and Schenk, 2003), proteins that regulate this process may be useful targets for prophylaxis or treatment of the disease and might potentially allow to shift APP cleavage from the β - towards the α -secretase. Moreover, a comparative study of the shedding of unrelated proteins – as carried out in this study using PSGL-1 and TNFR2 – may lead to the discovery of cDNAs that strongly affect the shedding of APP but only have a minor effect on the shedding of other proteins. In this regard, mGluR3 may be particularly important, as it is one of the cDNAs showing a specific effect on the shedding of APP. Two members of the mGluR family, mGluR1 and mGluR5, have previously been shown to stimulate the secretion of APP (Lee et al., 1995). Both mGluRs activate phospholipase D. In contrast, the identified mGluR3 negatively regulates adenylate cyclase and thus, points to a role of this separate pathway in the control of APP shedding.

The strongest activators of APP shedding were the endocytic proteins endophilin A1 and A3.

Together with endophilin A2 they form a family of evolutionarily conserved proteins that can associate with the cytoplasmic surface of membranes. Additionally, two distantly related family members, endophilin B1 and B2, have been described. Of the three endophilins A (A1, A2 and A3), the neuron-specific endophilin A1 has been best studied (for reviews see Huttner and Schmidt, 2002; Reutens and Glenn Begley, 2002). It is a cytoplasmic protein essential for the budding and fission of synaptic vesicles from the plasma membrane. Through its C-terminal SH3 domain endophilin A1 interacts with proline-rich domains of other endocytic proteins, such as synaptojanin and dynamin. The N-terminal domain of endophilin A1 possesses lysophosphatidic acid acyl transferase activity, which is implicated in the generation of membrane curvature during the endocytic process. Endophilins A2 and A3 are highly homologous to endophilin A1 and share the same domain structure. In contrast to the neuron-specific endophilin A1, endophilin A2 is ubiquitously expressed, whereas endophilin A3 is expressed in brain, thymus and testis. The endophilins are also linked to signal transduction of the tyrosine kinase receptors for hepatocyte and epidermal growth factor (Petrelli et al., 2002; Soubeyran et al., 2002) and of c-Jun N-terminal kinase (Ramjaun et al., 2001). Interestingly, endophilin A3 has been shown to bind to the Huntington's disease protein huntingtin and to promote the formation of polyglutamine containing aggregates (Sittler et al., 1998).

In this study we show that endophilin A3 strongly activates APP α -cleavage, but does not have a major effect on APP β -cleavage. Concerning the molecular mechanism underlying this shedding-stimulatory effect, we found that transfection of endophilin A3 inhibits APP endocytosis. As a result, more APP may be available for an increased α -secretase cleavage, which is assumed to occur at or close to the cell surface (Sisodia, 1992). This fits with previous studies showing that an inhibition of dynamin-dependent endocytosis resulted in more APP at the cell surface and in an increased APP shedding, mainly by α -secretase (Carey et al., 2005; Chung and Selkoe, 2003; Koo

and Squazzo, 1994). Conversely, a reduction of APP presence at the cell surface lowers APP shedding, such as in Munc13-1 deficient neurons (Rossner et al., 2004) and upon retention of APP in early compartments of the secretory pathway (Suga et al., 2005).

Endophilin A3 also inhibited transferrin endocytosis, which is in agreement with a recent study (Sugiura et al., 2004). Taken together, our data suggest that transfection of endophilin A3 negatively regulates endocytosis – including the endocytosis of APP – and thereby increases the access of APP to α -secretase, resulting in more APP α -secretase cleavage. Despite their more general role in endocytosis, the endophilins acted relatively specifically on APP shedding and not on the shedding of TNFR2 or PSGL-1. This finding suggests that APP stands out among other shedding substrates, in that its shedding is particularly sensitive to changes in the rate of endocytosis.

Besides the inhibition of endocytosis an additional mechanism might contribute to endophilin A3's stimulatory effect on APP shedding. Endophilin A3 and its homologs A1 and A2 bind to the metalloproteases ADAM9 and ADAM15 (Howard et al., 1999). The endophilins have been suggested to be involved in the intracellular trafficking and maturation of these ADAM proteases (Howard et al., 1999), but it remains unknown whether this interaction affects the ADAM protease activity. Since ADAM9 is one of the candidate α -secretases for APP (Koike et al., 1999), it is tempting to speculate that endophilin A3 may not only increase APP shedding by inhibiting APP endocytosis but additionally by increasing ADAM protease activity.

Currently it is unclear how Nbl, PPT1 and MEKK2 influence the shedding of APP. However, some clues may be inferred from what is already known about them. For example, Nbl is a modulator of Notch signaling and may play a role in Notch endocytosis (Santolini et al., 2000). Moreover, Nbl has recently been shown to bind to APP, but the effect of this interaction on APP shedding has not been explored (Roncarati et al., 2002). Nbl binds to the NPXY amino acid motif in the cytoplasmic domain of APP. Other cytoplasmic proteins, such as FE65 and X11 bind to the same site and are known to affect APP shedding, potentially by altering APP trafficking. Thus, Nbl may compete with such proteins for binding to APP and thereby influence APP shedding.

Activation of the Erk- and p38-MAP-kinase pathways increases the shedding of different membrane proteins (Fan and Derynck, 1999). Since MEKK2 is one of the kinases activating the MAP-kinase pathway, it is possible that MEKK2 exerts its shedding-stimulatory function through an activation of the MAP-kinase pathway. A similar mechanism may hold for PPT1, which is a thioesterase that removes palmitoyl modifications from proteins in the lysosome. However, the two PPT1 cDNAs identified in this study differ from the published sequence of wild-type PPT1: both lack the start codon and contain a one-nucleotide insertion, giving rise to a mutant PPT1 protein without a signal peptide. Because the library used for arraying was unamplified, these are likely to be independent isolates of a relevant *in vivo* species. The predicted protein is not expected to localize to the lysosomes, but instead

may act as a cytosolic thioesterase and mimic the function of the cytosolic palmitoyl-protein thioesterase APT1 (Resh, 1999). One possible mechanism by which the variant PPT1 may exert its shedding-inducing effect might be through H-Ras, which upon depalmitoylation moves from lipid rafts to the bulk plasma membrane and can activate the Map-kinase pathway (Prior et al., 2001), which in turn can activate the shedding of various proteins (Fan and Derynck, 1999). This proposal is consistent with the finding that the variant PPT1 also stimulates the shedding of TNFR2 and PSGL-1.

In summary, we have shown that it is possible to identify proteins that are able to regulate ectodomain shedding. Besides the proteolytic processing of APP, ectodomain shedding regulates a variety of diverse biological processes, among them embryonic development (Peschon et al., 1998) and axonal pathfinding (Hattori et al., 2000). To date the pathways that regulate these processes have not been explored in much detail. Our study suggests that a relatively well-conserved set of proteins with connections to central signaling pathways, such as PKA and MEKK2, may be involved in the shedding of many, if not all shedding substrates, whereas other proteins, such as the endophilins or mGluR3, may preferentially control the shedding of a small number of membrane proteins.

Acknowledgements

Antibodies were kindly provided by Konrad Beyreuther, Christian Haass and Dale Schenk. We are grateful to the following institutions for financial support: the Boehringer Ingelheim foundation for a fellowship to S.N., the Deutsche Forschungsgemeinschaft for projects LI862/4-1 and SFB596-B12 to S.F.L. and the ENNaB to S.F.L.

References

- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* 74, 342–352.
- Blobel, C.P., 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32–43.
- Carey, R.M., Balcz, B.A., Lopez-Coviella, I., Slack, B.E., 2005. Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol.* 6, 30.
- Chyung, J.H., Selkoe, D.J., 2003. Inhibition of receptor mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J. Biol. Chem.*
- Citron, M., 2004. beta-Secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease—promise and challenge. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 92–97.
- Davenpeck, K.L., Brummet, M.E., Hudson, S.A., Mayer, R.J., Bochner, B.S., 2000. Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin *in vitro*. *J. Immunol.* 165, 2764–2772.
- Fan, H., Derynck, R., 1999. Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J.* 18, 6962–6972.
- Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., Mattson, M.P., 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J. Neurochem.* 67, 1882–1896.

- Haass, C., 2004. Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 23, 483–488.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., Saftig, P., 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Mol. Genet.* 11, 2615–2624.
- Hattori, M., Osterfield, M., Flanagan, J.G., 2000. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360–1365.
- Hooper, N.M., Karran, E.H., Turner, A.J., 1997. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321, 265–279.
- Howard, L., Nelson, K.K., Maciewicz, R.A., Blobel, C.P., 1999. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J. Biol. Chem.* 274, 31693–31699.
- Huovila, A.P., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Karkkainen, I., Ortiz, R.M., 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 413–422.
- Huttner, W.B., Schmidt, A.A., 2002. Membrane curvature: a case of endofeelin' em leader. *Trends Cell Biol.* 12, 155–158.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1996. Analysis of heterogeneous β A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J. Biol. Chem.* 271, 22908–22914.
- Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H., Haass, C., 2002. Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 158, 551–561.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., Ishiura, S., 1999. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* 343 Pt 2, 371–375.
- Koo, E.H., Squazzo, S.L., 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 17386–17389.
- Lee, R.K., Wurtman, R.J., Cox, A.J., Nitsch, R.M., 1995. Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8083–8087.
- Leprince, C., Le Scolan, E., Meunier, B., Fraissier, V., Brandon, N., De Gunzburg, J., Camonis, J., 2003. Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J. Cell Sci.* 116, 1937–1948.
- Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., Seed, B., 2003. The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J. Biol. Chem.* 278, 48713–48719.
- Lichtenthaler, S.F., Haass, C., 2004. Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113, 1384–1387.
- Marambaud, P., Chevallier, N., Ancolio, K., Checler, F., 1998. Post-transcriptional contribution of a cAMP-dependent pathway to the formation of alpha and beta/gamma-secretases-derived products of beta APP maturation in human cells expressing wild-type and Swedish mutated beta APP. *Mol. Med.* 4, 715–723.
- McEver, R.P., Cummings, R.D., 1997. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* 100, 485–491.
- Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M., Ungerer, A., 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12683–12688.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., et al., 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281–1284.
- Petrelli, A., Gilestro, G.F., Lanzardo, S., Comoglio, P.M., Migone, N., Giordano, S., 2002. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 416, 187–190.
- Pimentel-Muinos, F.X., Seed, B., 1999. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 11, 783–793.
- Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G., Hancock, J.F., 2001. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat. Cell Biol.* 3, 368–375.
- Ramjaun, A.R., Angers, A., Legendre-Guillemin, V., Tong, X.K., McPherson, P.S., 2001. Endophilin regulates JNK activation through its interaction with the germinal center kinase-like kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 28913–28919.
- Resh, M.D., 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1–16.
- Reutens, A.T., Glenn Begley, C., 2002. Endophilin-1: a multifunctional protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1173–1177.
- Roncarati, R., Sestan, N., Scheinfeld, M.H., Berechid, B.E., Lopez, P.A., Meucci, O., McGlade, J.C., Rakic, P., D'Adamo, L., 2002. The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7102–7107.
- Rosner, S., Fuchsbrunner, K., Lange-Dohna, C., Hartlage-Rubsamen, M., Bigl, V., Betz, A., Reim, K., Brose, N., 2004. Munc13-1-mediated vesicle priming contributes to secretory amyloid precursor protein processing. *J. Biol. Chem.* 279, 27841–27844.
- Santolini, E., Puri, C., Salcini, A.E., Gagliani, M.C., Pelicci, P.G., Tacchetti, C., Di Fiore, P.P., 2000. Numb is an endocytic protein. *J. Cell Biol.* 151, 1345–1352.
- Schlondorff, J., Blobel, C.P., 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* 112, 3603–3617.
- Selkoe, D.J., Schenk, D., 2003. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 545–584.
- Seubert, P., Oltsdorf, T., Lee, M.G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D.L., Bryant, K., Fritz, L.C., Galasko, D., Thal, L.J., et al., 1993. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361, 260–263.
- Sisodia, S.S., 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6075–6079.
- Sittler, A., Walter, S., Wedemeyer, N., Hasenbank, R., Scherzinger, E., Eickhoff, H., Bates, G.P., Lehrach, H., Wanker, E.E., 1998. SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyglutamine-containing protein aggregates. *Mol. Cell* 2, 427–436.
- Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W., Lee, V.M., 2000. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* 275, 2568–2575.
- Soubeyran, P., Kowanez, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y., Dikic, I., 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416, 183–187.
- Stein, T.D., Anders, N.J., DeCarli, C., Chan, S.L., Mattson, M.P., Johnson, J.A., 2004. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J. Neurosci.* 24, 7707–7717.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M.L., Baumeister, R., et al., 2000. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* 2, 848–851.
- Suga, K., Saito, A., Tomiyama, T., Mori, H., Akagawa, K., 2005. Syntaxin 5 interacts specifically with presenilin holoproteins and affects processing of betaAPP in neuronal cells. *J. Neurochem.* 94, 425–439.
- Sugiura, H., Iwata, K., Matsuoka, M., Hayashi, H., Takemiya, T., Yasuda, S., Ichikawa, M., Yamauchi, T., Mehlen, P., Haga, T., Yamagata, K., 2004. Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 23343–23348.
- Xu, H.X., Sweeney, D., Greengard, P., Gandy, S., 1996. Metabolism of Alzheimer beta-amyloid precursor protein: regulation by protein kinase A in intact cells and in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4081–4084.

Amyloid Precursor-like Protein 1 Influences Endocytosis and Proteolytic Processing of the Amyloid Precursor Protein*

Received for publication, July 29, 2005, and in revised form, December 8, 2005 Published, JBC Papers in Press, December 12, 2005, DOI 10.1074/jbc.M508340200

Stephanie Neumann[‡], Susanne Schöbel[‡], Sebastian Jäger[§], Anna Trautwein[§], Christian Haass[‡], Claus U. Pietrzik[§], and Stefan F. Lichtenthaler^{‡1}

From the [‡]Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstrasse 44, 80336 Munich and the [§]Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Duesbergweg 6, 55128 Mainz, Germany

Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein (APP) is a key regulatory step in the generation of the Alzheimer disease amyloid β peptide (A β). The molecular mechanisms underlying the control of APP shedding remain little understood but are in part dependent on the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP), which is involved in APP endocytosis. Here, we show that the APP homolog APLP1 (amyloid precursor-like protein 1) influences APP shedding. In human embryonic kidney 293 cells expression of APLP1 strongly activated APP shedding by α -secretase and slightly reduced β -secretase cleavage. As revealed by domain deletion analysis, the increase in APP shedding required the NPTY amino acid motif within the cytoplasmic domain of APLP1. This motif is conserved in APP and is essential for the endocytosis of APP and APLP1. Unrelated membrane proteins containing similar endocytic motifs did not affect APP shedding, showing that the increase in APP shedding was specific to APLP1. In LRP-deficient cells APLP1 no longer induced APP shedding, suggesting that in wild-type cells APLP1 interferes with the LRP-dependent endocytosis of APP and thereby increases APP α -cleavage. In fact, an antibody uptake assay revealed that expression of APLP1 reduced the rate of APP endocytosis. In summary, our study provides a novel mechanism for APP shedding, in which APLP1 affects the endocytosis of APP and makes more APP available for α -secretase cleavage.

The amyloid precursor protein (APP)² is one of a large number of membrane proteins that are proteolytically converted to their soluble counterparts. This process is referred to as ectodomain shedding and is an important way of regulating the biological activity of membrane proteins (1, 2). The shedding of APP may occur through two different protease activities termed α - and β -secretase, which cleave APP within its ectodomain close to its transmembrane domain (for a review, see Ref.

3) (see Fig. 1A). APP cleavage by α - or β -secretase is a key regulatory process in the generation of the amyloid β peptide (A β). Generation and subsequent deposition of A β are assumed to be the first events in the pathogenesis of Alzheimer disease. β -Secretase has been identified as the aspartyl protease BACE1 and cleaves APP at the N terminus of the A β peptide domain, thus catalyzing the first step in A β peptide generation (4). After the initial cleavage of APP by BACE1, the remaining C-terminal APP fragment is cleaved by γ -secretase within its transmembrane domain at the C terminus of the A β domain, leading to the secretion of the A β peptide (5). In contrast to β -secretase, α -secretase cleaves within the A β sequence and thereby precludes the generation of the A β peptide. α -Secretase is a member of the ADAM family of proteases. Candidate α -secretases are ADAM10, ADAM17 (TACE), or ADAM9 (6). α -Secretase cleavage of APP is assumed to take place at or close to the cell surface, whereas β -secretase cleavage takes place after endocytosis of wild-type APP into endosomes. Endocytosis of APP requires the cytoplasmic amino acid motif NPTY, which belongs to the NPXY class of endocytic motifs found in a small number of type I membrane proteins (7), including the two mammalian APP homologs APLP1 and APLP2 (amyloid precursor-like protein 1 and 2). Like APP, APLP2 is ubiquitously expressed, whereas expression of APLP1 is strongest in brain (for an overview, see Ref. 8). Both proteins undergo protease cleavage events similar to those of APP (9–12). Whether the three APP family members can mutually affect their proteolytic processing is unknown. Despite a high degree of similarity to APP, APLP1 and APLP2 lack the A β peptide domain. However, both proteins have been found in the amyloid plaques in the brain of Alzheimer patients (13) and thus may potentially contribute to the pathogenesis.

Although the ectodomain shedding of APP by α - or β -secretase has opposite effects on A β generation, little is known about the molecular mechanisms that control to what extent APP shedding occurs by either protease. Different kinases, including protein kinase C, mitogen-activated protein kinases, and protein kinase A, can stimulate APP α -cleavage, but downstream molecular target proteins remain to be identified (6). Additionally, cytoplasmic adapter proteins, such as FE65, have been reported to bind to the cytoplasmic domain of APP and to alter APP shedding (for reviews, see Refs. 14 and 15). The FE65 family of cytoplasmic multidomain adapter proteins consists of three family members, FE65, FE65L1, and FE65L2 (for a review, see 15). FE65 colocalizes with APP in actin-rich lamellipodia in neuronal growth cones (16) and may link APP to cellular motility (17). Moreover, it may be involved in the potential transcriptional regulation of the γ -secretase-cleaved APP intracellular domain (18, 19). According to a recently suggested model, FE65 links APP to the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP), which is a multifunctional cell surface receptor for proteins involved in lipoprotein metabolism (20) and which modulates APP processing and A β generation (21, 22). The complex of APP, FE65, and LRP seems to be required for efficient endocytosis of APP (23–25). In

* This work was supported by a Boehringer Ingelheim foundation fellowship (to S. N. and S. J.), Deutsche Forschungsgemeinschaft SPP1085/2 and SFB596 Project B12 (to S. F. L.), SPP1085/2 (to C. H.), and Pi379/1–3 (to C. U. P.), European Commission Project NeuroNE (to C. H.), and the Excellence Network Nano Biotechnology and the Fonds der Chemischen Industrie (to S. F. L.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-89-218-075-453; Fax: 49-89-218-075-415; E-mail: Stefan.Lichtenthaler@med.uni-muenchen.de.

² The abbreviations used are: APP, amyloid precursor protein; A β , amyloid β peptide; APLP1 and APLP2, amyloid precursor-like protein 1 and 2, respectively; AP-APP, alkaline phosphatase-amyloid precursor protein fusion protein; APP α and APP β , soluble APP generated by α -secretase or by β -secretase, respectively; CHO, Chinese hamster ovary; CTF, C-terminal fragment; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ER, endoplasmic reticulum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GFP, green fluorescent protein; HA, hemagglutinin; HEK, human embryonic kidney; ICD, intracellular domain; IR, insulin receptor; LRP, low density lipoprotein receptor-related protein; sIg, secreted immunoglobulin; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate. ADAM, a disintegrin and metalloprotease.

APLP1 Influences APP Shedding

contrast, in cells lacking LRP, APP endocytosis was reduced (22). As a consequence, APP β -cleavage in the endosomes was also reduced, and APP α -cleavage was increased (21, 22).

In this study we identified APLP1 as a novel activator of APP α -cleavage. This activation required the endocytic GYENPTY motif in the cytoplasmic domain of APLP1. Concerning the underlying molecular mechanism, we show that APLP1 reduces APP endocytosis and that the increase in APP shedding occurs in an LRP-dependent manner. Thus, our study provides further evidence for a complex of LRP with APP which controls APP endocytosis and shedding.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—The following antibodies were used: anti-HA epitope antibody HA.11 (Covance), anti-FLAG (Sigma), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (DAKO), anti-insulin receptor (IR) (BD Transduction Laboratories), anti-EGFR (BD Transduction Laboratories), anti-EEA1 (BD Transduction Laboratories), horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse (DAKO), horseradish peroxidase-coupled goat anti-human IgG Fc (Cappel), Alexa 555-coupled secondary anti-rabbit and Alexa 488-coupled secondary anti-mouse (Molecular Probes). Antibodies 5313 (against APP ectodomain) and 6687 (against APP C terminus) were described previously (26). Monoclonal antibodies 1G7, 5A3 (against APP ectodomain) as well as LRP1704 against the LRP C terminus were described (22). Antibody 192wt specific for the C terminus of APPs β (27) was provided by Dale Schenk. Antibodies 22C11 (anti-APP ectodomain), W02 (against amino acids 5–8 of A β) (28), Ab150 (against A β -like domain of APLP1) (10), Ab57 (against C terminus of APLP1) were provided by Simone Eggert and Konrad Beyreuther. The specific γ -secretase inhibitor DAPT was provided by Boris Schmidt (University of Darmstadt, Germany).

Plasmid Construction—Generation of vector peak12 expressing human BACE1 and ADAM10 has been described (29). The cDNA of human APLP1 in the peak8 expression vector was obtained from a human brain cDNA library (Edgebio). The human cDNAs of BACE1 (1503-nucleotide open reading frame), APP (2085-nucleotide open reading frame), APLP1 (1950-nucleotide open reading frame), and APLP2 (2253-nucleotide open reading frame) tagged with a C-terminal HA epitope tag were cloned into the expression vector peak12. Likewise, human L-selectin (without its signal peptide; starting at nucleotide 154 of the open reading frame) carrying an N-terminal HA epitope tag and the signal peptide of CD5 was cloned into peak12. Rat dynamin 1 K44A was amplified from plasmid pCB1/dynamin1 K44A (obtained from Marc Caron) and cloned into the peak12 vector together with a C-terminal HA tag. Plasmid pRK5-hIR encoding the human insulin receptor was obtained from Axel Ullrich. Plasmid pcDNA3/EGFR was obtained from Gordon Gill. The plasmids pCEP4/APLP1, pCEP4/APLP1 Δ NPTY (carrying an N-terminal myc tag and lacking the cytoplasmic GYENPTY amino acid motif) and pCEP4/APLP2 were obtained from Simone Eggert and Konrad Beyreuther (10). The intracellular domains of human APLP1 (starting with nucleotide A1813 of the coding region) and TACE (starting with nucleotide G2083 of the coding region) were amplified by PCR, digested with MluI/NotI, and ligated into the peak12 expression vector (digested with HindIII/NotI) together with the slg7 HindIII/MluI fragment derived from vector cdm12/sl7 (obtained from Brian Seed). The resulting plasmids encode fusion proteins consisting of the human IgG1 constant region as ectodomain (secreted Ig, slg), followed by the transmembrane domain of CD7 and the cytoplasmic domain of the indicated proteins. The cDNA of TACE was amplified by PCR from an activated T cell library.

The peak12 vectors encoding the C-terminal fragments (CTF) of APLP1 (ectodomain deletion constructs) consist of the signal peptide of CD5 followed by an HA epitope tag and the C-terminal 106 amino acids of APLP1 (starting with residues QYERK). CTF106 Δ cyto has a deletion of the 42 cytoplasmic amino acids and stops after the membrane anchor sequence RRKKP. CTF106ER has an ER retention signal of the KKXX-type added to the C terminus of APLP1 (... EERP GKQKQN). Peak12/GFP-ICD encodes a fusion protein consisting of GFP fused to the N terminus of the 50 C-terminal amino acids of APLP1 (starting with LLLRRKKP, corresponding to an ϵ -cleavage-like fragment). Plasmid peak12/sl7-APLP1(Y/S) has tyrosine 638 mutated to serine. Plasmid pcNeo/LRP-CT (C-terminal fragment of LRP) was generated by subcloning the sequence that encodes for the C-terminal 370 amino acids of the LRP β -subunit together with a signal peptide from the LRP-CT/pBabeHygro vector (22) into the EcoRI and NotI sites of the pcNeo vector (Promega). Plasmid pcDNA3/FE65-FLAG (C-terminal FLAG tag) was described previously (24). The identity of all constructs obtained by PCR was confirmed by DNA sequencing.

Cell Culture, Transfections, Western Blot—Human embryonic kidney 293-EBNA cells (HEK293) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone), 50 units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. Clonal HEK293 cells expressing AP-APP and Bcl-X_L/CrmA were generated and cultured as described previously (29). Transfections were carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). One day after transfection, the medium was replaced with fresh medium. After overnight incubation the conditioned medium and the cell lysate (in 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) were collected. For AP measurements, aliquots of the conditioned medium were treated for 30 min at 65 °C to heat inactivate the endogenous AP activity. AP activity was measured in the conditioned medium and the cell lysate as described previously (29) and corrected for the protein concentration in the cell lysate.

To detect secreted and cellular APP or other cellular proteins, the protein concentration in the cell lysate was measured, and corresponding aliquots of lysate or conditioned medium were loaded directly onto an electrophoresis gel. Western blot detection was carried out using the indicated antibodies. HEK293 cells stably expressing APLP1 and BACE1 were generated using plasmids peak8/APLP1 and peak12/BACE1-HA, respectively, using 0.5 μ g/ml puromycin (Sigma). LRP-deficient Chinese hamster ovary (CHO) cell line (13-5-1) and corresponding LRP-expressing CHO K1 control cells (kind gift from Dr. S. Leppla, National Institutes of Health, Bethesda, MD), were grown in α -Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (24). CHO cells were transiently transfected with APLP1 and LRP-CT using Lipofectamine 2000.

Inhibition of γ -Secretase—HEK293 cells were transiently transfected with APLP1 or as a control with empty vector. Two days after transfection the cells were preincubated for 45 min in the presence of the inhibitor and then incubated for an additional 8 h with fresh medium containing the inhibitor. The specific γ -secretase inhibitor DAPT (1 μ M) (30) was dissolved in dimethyl sulfoxide. Control cells were treated with dimethyl sulfoxide alone. Aliquots of the cell lysate were analyzed by Western blotting. For the detection of the APLP1 C-terminal fragments the lysate was immunoprecipitated with antibody Ab57 against the C terminus of APLP1.

FE65 Coimmunoprecipitation—HEK293 cells were transiently cotransfected with FE65 and APP, the IR, wild-type and mutant APLP1, with slg7-APLP1 constructs or as a control with empty vector. Two days after transfection the cells were lysed in 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40. After preclearing cell lysates were incubated for

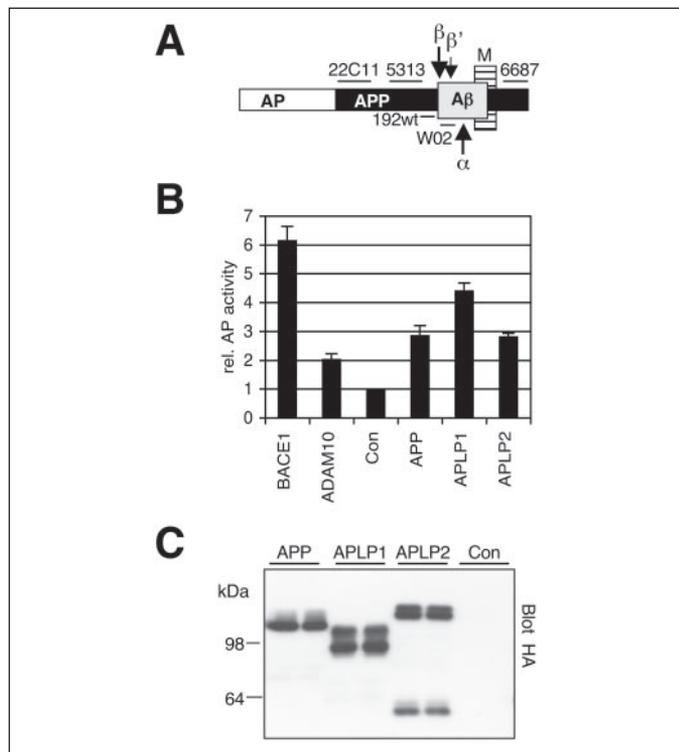


FIGURE 1. APLP1 stimulates the shedding of an AP-APP reporter protein. *A*, schematic drawing of the AP-APP fusion protein. The AP ectodomain was fused to the N terminus of full-length APP695 lacking its signal peptide. Horizontal bars show the epitopes recognized by the indicated antibodies. Arrows indicate the proteolytic α -, β -, and β' -cleavage sites within the APP ectodomain. The β' -cleavage site is an additional cleavage site of the β -secretase BACE1. M, membrane. *B* and *C*, HEK293 cells stably expressing AP-APP were transiently transfected with plasmids encoding the indicated cDNAs. AP activity was measured in the conditioned medium relative to the control (Con) transfected cells (*B*). Aliquots of the cell lysate were blotted for expression of the transfected APP, APLP1, and APLP2 using an antibody against their C-terminal HA epitope tag (*C*, from duplicate transfections). The AP activity represents the mean of two independent experiments, each one carried out in duplicate.

2 h with a 1:100 diluted anti-FLAG antibody and protein G-Sepharose or with protein G-Sepharose alone (for precipitation of sIg7-APLP1 constructs). After washing of the beads bound proteins were separated by electrophoresis and detected by immunoblot analysis with the indicated antibodies.

APP Antibody Uptake Assay—COS cells plated on coverslips were cotransfected with wild-type APP695 and C-terminally GFP-tagged APLP1 or GFP as a control. APP endocytosis was determined as described previously (31). In brief, transfected COS cells were washed in ice-cold PCM (phosphate-buffered saline supplemented with 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂), and incubated on ice in a 1:200 dilution of antibody 5313 in PCM. After 20 min, cells were washed in PCM on ice, and then PCM was replaced by prewarmed culture medium, and cells were placed in a 37 °C incubator. After the indicated time points, coverslips were transferred to 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in phosphate-buffered saline, fixed for 20 min, and processed for standard immunofluorescence using 1:500 diluted Alexa 555-coupled secondary anti-rabbit antibodies or 1:100 diluted EEA1 antibody followed by 1:500 diluted Alexa 488-coupled secondary anti-mouse antibodies. Fixed cells were analyzed on a Zeiss Axioskop2 plus microscope equipped with a 63 \times /1.25 objective and standard FITC and TRITC fluorescence filter sets. Images were obtained using a Spot Camera (Zeiss AxioCam HRm) and the MetaView Imaging software (Universal Imaging Corp.). APP and EEA1 costainings were analyzed using a Zeiss 510Meta confocal system

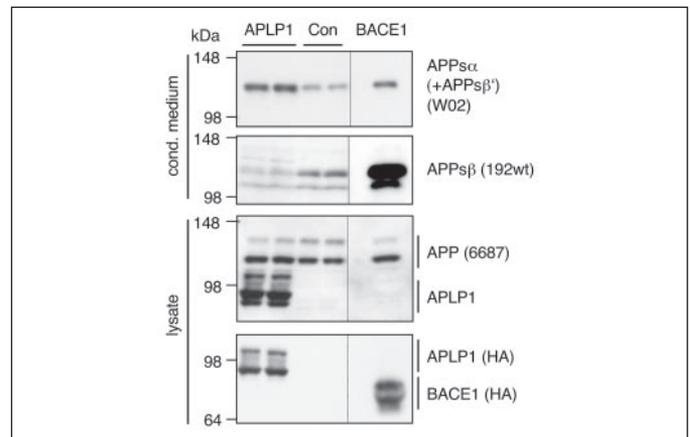


FIGURE 2. APLP1 stimulates the α -secretase cleavage of the endogenous APP of 293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with APLP1, BACE1, or control vector (Con). Aliquots of the conditioned medium and the cell lysate were loaded directly onto electrophoresis gels. By immunoblot analysis APP secreted into the conditioned medium (*top panels*) or APP in the cell lysate (*middle panel*) were detected using antibodies W02 (detecting soluble APP cleaved at the α - or β' -site, APPs α , APPs β'), 192wt (detecting the β -cleaved soluble APP, APPs β), or 6687 (binding to the C terminus of full-length APP), respectively. Antibody 6687 also detects the transfected APLP1. Expression of APLP1 and BACE1 was detected using an antibody against their C-terminal HA epitope tag. Shown are representative blots of two independent experiments. The vertical lines on the blots indicate that the samples were loaded on the same gel, but not directly next to each other.

equipped with an 100/1.3 objective. Experiments were performed at least three times and were carried out under double blind conditions. At time point 0 min all cells showed cell surface APP staining. At time points 7 min, 20 min, and 35 min some cells started undergoing endocytosis, whereas other cells had not yet started. Thus, around 100 cells were scored/cell line and time point. Statistical significance was determined with Student's *t* test.

RESULTS

APLP1 Stimulates the Shedding of APP—For the rapid detection of APP shedding we used the following reporter cell line. HEK293 cells were stably transfected with a cDNA expression vector encoding a fusion protein (AP-APP) consisting of secretory alkaline phosphatase (AP) upstream from full-length APP (Fig. 1A) (29). The expression level of AP-APP in this cell line is similar to the expression level of the endogenous APP (32). In an expression cloning approach, cDNAs from a human brain cDNA library were transfected into the AP-APP cell line and screened for activators of APP shedding. This way we identified the cDNA of APLP1 as a stimulator of APP shedding. Transfection of APLP1 into the AP-APP expressing cells resulted in a strong increase in AP-APP shedding compared with control vector transfected cells (>4-fold, Fig. 1B). Because APLP1 is a member of the APP gene family comprising APP, APLP1, and APLP2, we tested whether APP and APLP2 could also stimulate shedding in the AP-APP reporter cell line. Both APP and APLP2 stimulated APP shedding, although not as strongly as APLP1 (Fig. 1B). All three proteins were expressed at similar levels, as detected by immunoblotting of the cell lysates using an antibody against their C-terminal HA epitope tag (Fig. 1C). As a control, transfection of the β -secretase BACE1 strongly increased APP shedding (6-fold; Fig. 1B). Transfection of the α -secretase ADAM10 led to a moderate increase in APP shedding (2-fold), which is in agreement with a previous publication (29). Next, we tested the effect of APLP1 on APP shedding in HEK293 cells expressing the endogenous wild-type APP that is not fused to the AP reporter. To this aim, HEK293 cells were transiently transfected with APLP1, BACE1, or control vector. Soluble APP generated by α -secretase (APPs α) or by β -secretase (APPs β) was detected in

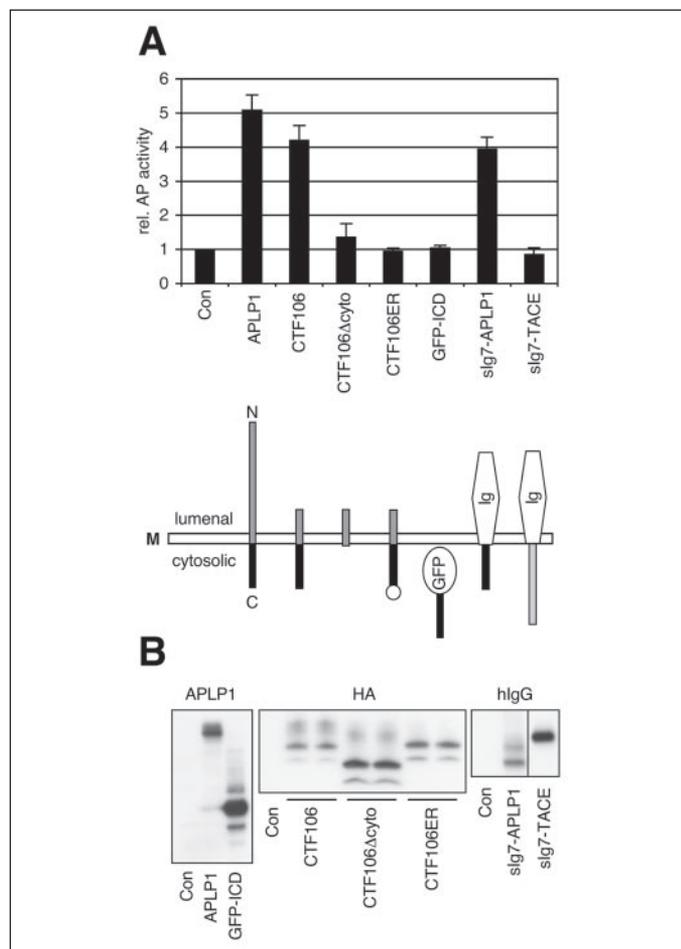


FIGURE 3. Domain deletion analysis of APLP1. The indicated APLP1 mutants were transiently transfected into AP-APP cells. *A*, AP activity was measured in the conditioned medium relative to the control cells and represents the mean \pm S.D. of two independent experiments, each one carried out in duplicate. A schematic drawing of the mutants is given below the AP diagram. The N and C termini of APLP1 are indicated (N, C) as well as the membrane (M) and the luminal and the cytosolic sides of the membrane. *B*, aliquots of the cell lysate were blotted for expression of the transfected constructs using antibodies against APLP1 (Ab57), the N-terminal HA epitope tag (shown in duplicate transfections), or human IgG1 (hlgG). The CTF106 proteins are visible as a major protein band and a minor one of a lower molecular mass, which may result from C-terminal truncation of the protein. The vertical line on the right panel indicates that the two lanes were on the same gel but not directly next each other. CTF106, C-terminal fragment comprising C-terminal 106 amino acids of APLP1; CTF106 Δ cyto, CTF106 lacking the cytoplasmic domain; CTF106ER, CTF106 with an ER retention signal; GFP-ICD, fusion protein of GFP and the intracellular domain of APLP1; slg7-APLP1/TACE, chimeric type I membrane protein consisting of the human IgG1 constant region as the ectodomain, followed by the transmembrane domain of CD7, followed by the intracellular domain of APLP1 or TACE.

the conditioned medium using cleavage site-specific antibodies. Antibody 192wt specifically detects APPs β (27), whereas antibody W02 binds to an epitope between the β - and the α -secretase cleavage sites (28). Therefore, W02 does not detect APPs β , but instead APPs α and APPs β' , which starts at residue Glu-11 of the A β sequence and represents a minor secondary cleavage site of BACE1 (Fig. 1A). Compared with control cells W02 detected a strong increase in soluble APP in the APLP1-expressing cells (Fig. 2). Antibody 192wt detected a mild decrease in soluble APP, which was not always seen. This reveals that APLP1 stimulates the α -secretase cleavage of APP, but only has a mild effect on β -cleavage. As a control, BACE1-expressing cells showed a strong increase in APPs β secretion detected by antibody 192wt (Fig. 2, 192wt blot). Antibody W02 also detected an increase in soluble APP in BACE1-transfected cells. This increase was much less pronounced than the one detected with 192wt and is likely to result from APPs β' generation, but not from APPs α . Expression of APLP1 and BACE1 did not

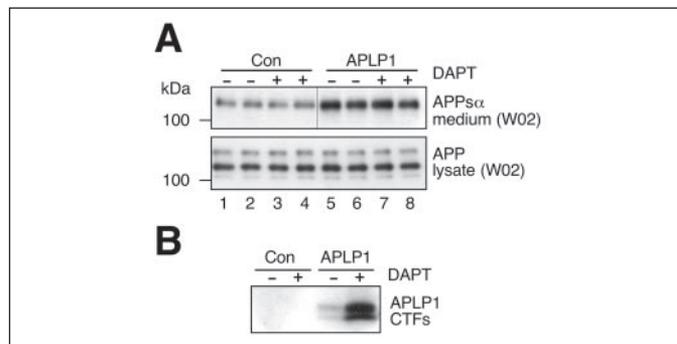


FIGURE 4. APLP1-induced APP shedding is independent of γ -secretase activity. HEK293 cells expressing endogenous APP were transiently transfected with control vector (Con) or APLP1 plasmid and treated for 8 h with dimethyl sulfoxide as a control or with the specific γ -secretase inhibitor DAPT. *A*, aliquots of the conditioned medium and the cell lysate were separated by electrophoresis and blotted for soluble APP in the conditioned medium or total APP in the cell lysate using antibody W02. The vertical bar on the upper panel indicates that the control and the APLP1 samples were on the same gel, but not directly next to each other. Lanes are numbered below the panels. *B*, cell lysates were blotted for C-terminal fragments of APLP1 (APLP1 CTFs), which are visible in the APLP1-transfected but not in the control transfected cells. The γ -secretase inhibitor DAPT increases the amount of CTFs.

alter the total amount of full-length APP in the cell lysate, as determined using an antibody against the C terminus of APP (Fig. 2). APLP1 and BACE1 were detected in the cell lysate with an antibody against their C-terminal HA epitope tag. Similar results were obtained in HEK293 cells stably transfected with BACE1 or APLP1 (data not shown). Interestingly, the APLP1-induced increase in APP shedding was only observed in HEK293 cells expressing low levels of APP, such as the endogenous APP (Fig. 2) or the AP-APP (Fig. 1B), which is expressed at levels similar to the endogenous APP (32). In contrast, in HEK293 cells stably transfected with APP the increased APP shedding was not seen, but instead an increased amount of mature APP was visible (data not shown).

Domain Deletion Analysis of APLP1—To start analyzing the mechanism by which APLP1 increases APP shedding, we carried out a domain deletion analysis and determined which APLP1 domains were required for the shedding-inducing effect. APLP1 and the deletion mutants were transiently transfected into the AP-APP reporter cell line. Mutant construct CTF106 (Fig. 3A) is a C-terminal fragment of APLP1 and roughly corresponds to the C99 fragment of APP. CTF106 consists of the C-terminal 106 amino acids of APLP1 and thus comprises a short fragment of the ectodomain, the transmembrane domain and the cytoplasmic domain of APLP1. CTF106 still increased APP shedding (Fig. 3A), revealing that most of the ectodomain is not required for the increase in APP shedding. In contrast, CTF106 lacking the cytoplasmic domain (CTF106 Δ cyto) had lost its ability to induce APP shedding, revealing an essential role for the cytoplasmic domain in stimulating APP shedding. Likewise, transfection of the APP C99 fragment increased APP secretion, but APP C99 lacking its cytoplasmic domain did not (data not shown). Addition of an ER retention motif to the C terminus of the APLP1 CTF106 abolished the APP shedding effect (Fig. 3A), demonstrating that CTF106 needs to be transported out of early cellular secretory compartments to increase APP shedding. Additionally, the cytoplasmic domain of APLP1 needs to be membrane-anchored to induce APP shedding. The cytoplasmic domain of APLP1 had no effect on APP shedding when fused to the soluble cytoplasmic protein GFP (GFP-ICD, Fig. 3A). In contrast, it strongly activated APP shedding when fused to a chimeric type I membrane protein comprising the human IgG1 constant region as ectodomain, followed by the CD7 transmembrane domain (slg7; fusion protein slg7-APLP1; Fig. 3A). To ensure that the slg7 fusion part did not affect APP shedding, an additional protein was

FIGURE 5. The cytoplasmic GYENPTY motif is required for the APLP1-induced increase in APP shedding. AP-APP cells were transfected with the indicated cDNAs. *A*, AP activity was measured in the conditioned medium relative to the control (*Con*) cells and represents the mean \pm S.D. of two independent experiments, each one carried out in duplicate. *APLP1* Δ NPTY, APLP1 lacking the cytoplasmic amino acid motif GYENPTY. *B*, experiments carried out as in *A*. *C*, cell lysates were separated and blotted for the indicated cDNAs. The asterisk denotes the endogenous LRP β . *IR fl.*, IR full-length. *D*, alignment of the NPXY amino acid motif of APP, APLP1, the IR, and LRP. LRP has two NPXY motifs denoted with (1) and (2), only LRP (2) binds FE65. The numbers on the left indicate the numbers of amino acids between the end of the transmembrane domain (*Tm*) and the start of the NPXY motif. The numbers on the right indicate the numbers of amino acids C-terminal to the NPXY motif before the C-terminal end of the protein (modified after Ref. 7). *E*, left panel, experiments carried out as in *A*. *slg7-APLP1* (Y/S), Tyr-638 is mutated to Ser. Right panel, cell lysates were separated and blotted for the indicated expressed cDNAs.

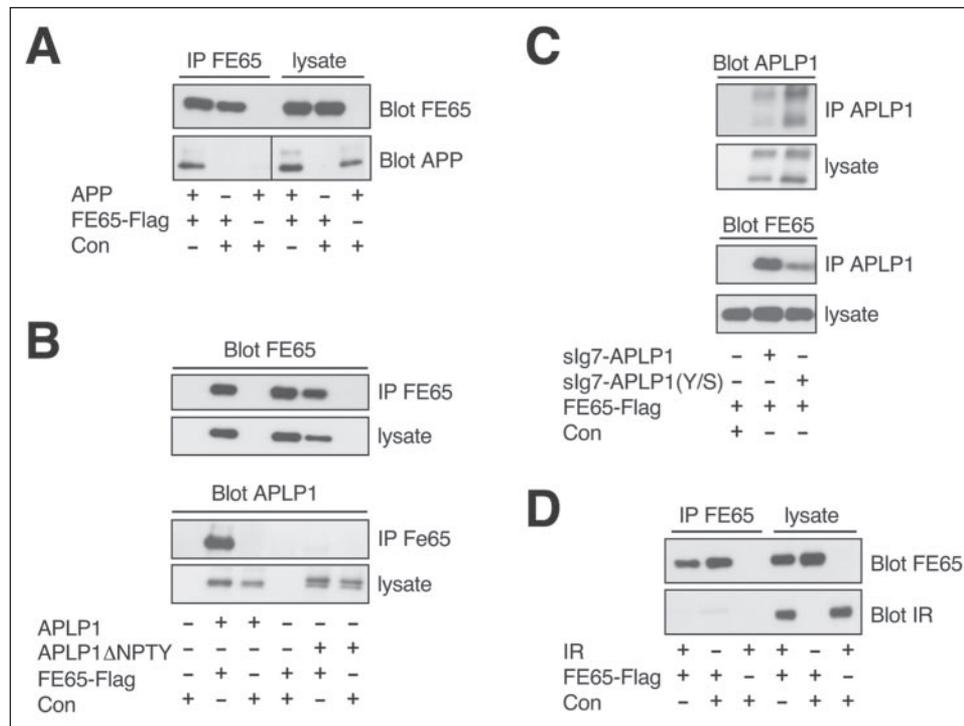
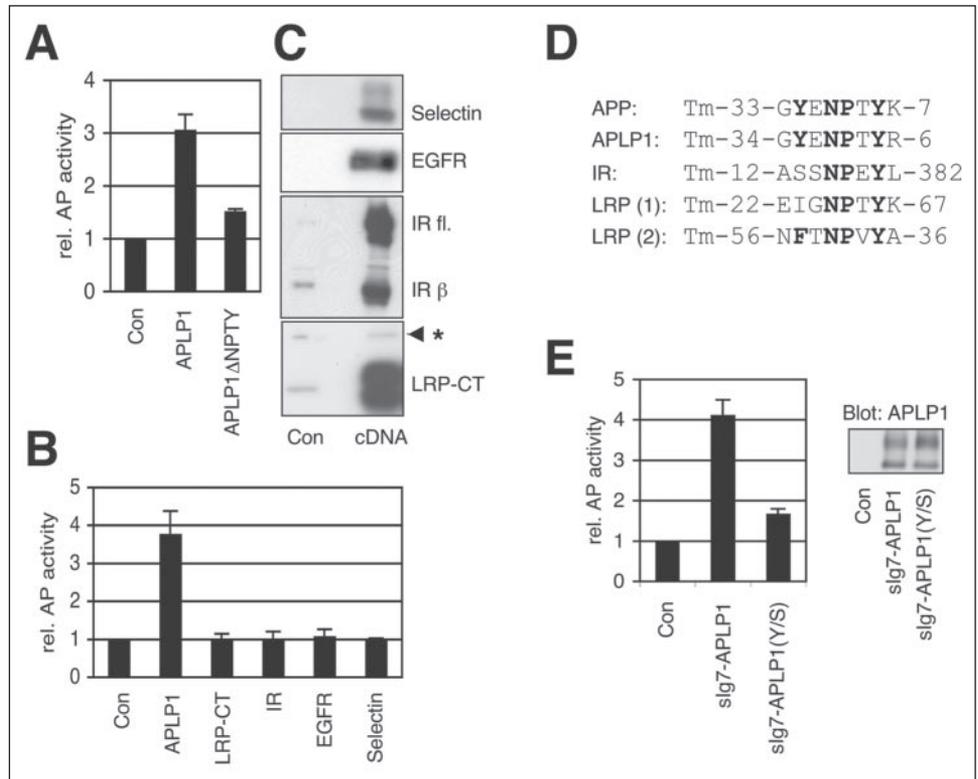


FIGURE 6. The cytoplasmic GYENPTY motif is necessary for binding of APLP1 to FE65. HEK293 cells were transiently cotransfected with FLAG-tagged FE65 and additionally APP, APLP1, mutants of APLP1 (APLP1 Δ NPTY, *slg7-APLP1*, *slg7-APLP1*(Y/S)), the IR, or as a control (*Con*) empty vector. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody (*A*, *B*, and *D*) or with protein G-Sepharose alone (*C*, directly binding the Ig part of the *slg7* proteins). Immunoprecipitated proteins were analyzed by gel electrophoresis and immunoblot using the indicated antibodies. For every immunoprecipitation two immunoblots are shown, one for the precipitated protein (e.g. FE65 in *A*) and one for the coprecipitated protein (e.g. APP in *A*). The vertical line in the lower blot in *A* indicates that the lanes were on the same gel but not directly next to each other. *IP*, immunoprecipitation with the indicated antibody. *Lysate*, to prove that the transfected cDNAs were expressed, aliquots of the cell lysate were loaded directly and analyzed by immunoblot using the indicated antibody. *slg7-APLP1* (Y/S), Tyr-638 is mutated to Ser.

tested, which carries the cytoplasmic domain of TACE fused to the same *slg7* transmembrane and ectodomain (*slg7-TACE*). This protein did not affect APP shedding. All deletion mutants and fusion proteins were expressed in the HEK293 cells as shown by immunoblot analysis in the cell lysate (Fig. 3*B*). Taken together, the domain deletion analysis reveals that the APLP1-induced APP shedding requires the APLP1 cyto-

plasmic domain to be membrane-anchored and to be present in a late compartment of the secretory pathway or in the endocytic pathway.

Stimulation of APP Shedding Is Independent of γ -Secretase Activity—Like APP, APLP1 is processed by γ -secretase (9, 10, 12), leading to the release of the cytoplasmic domain, which might translocate to the nucleus and stimulate the transcription of target genes, potentially

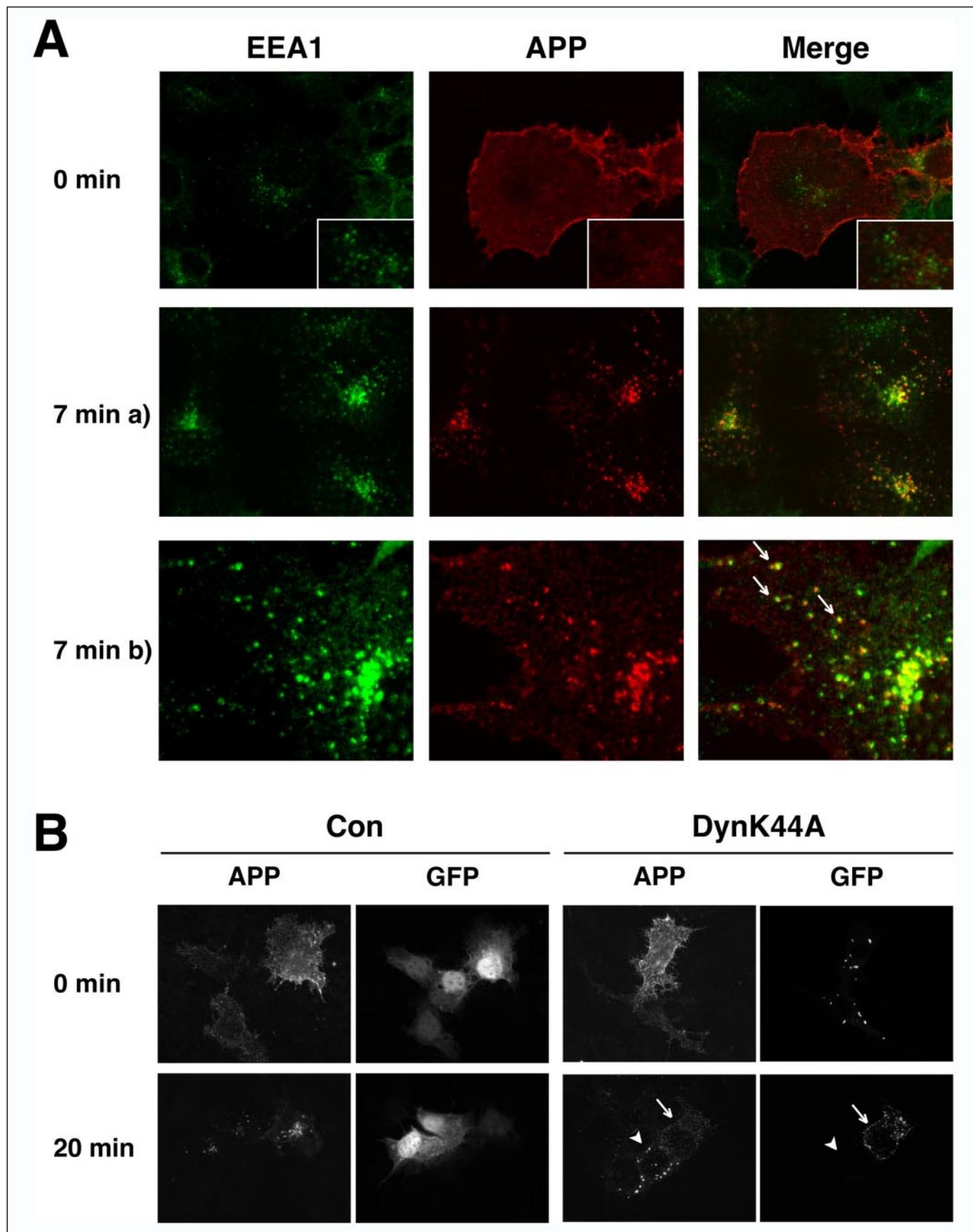


FIGURE 7. APP antibody uptake assay. A, COS cells were transiently transfected with APP. As described under "Experimental Procedures," cells were incubated on ice with the polyclonal antibody 5313 against the extracellular domain of APP. After the indicated time periods at 37 °C, cells were fixed, permeabilized and stained with a monoclonal anti-EEA1 antibody followed by fluorescently labeled secondary antibodies. Cells were analyzed by confocal microscopy. Left panels, EEA1-positive compartments are shown in green. Middle

including genes involved in APP shedding or endocytosis. If this process is required for the APLP1 effect, an inhibition of γ -secretase activity should reduce the increase in APP shedding observed upon APLP1 transfection. To test this possibility, HEK293 cells were transiently transfected with APLP1 or control vector and then treated with or without the well characterized γ -secretase inhibitor DAPT. Endogenous APP in the cell lysate and in the conditioned medium was detected by immunoblotting using antibody W02. Transfection of APLP1 stimulated APP shedding (Fig. 4A, lanes 5 and 6) compared with control transfected cells (lanes 1 and 2), consistent with the effect seen in Fig. 2. Addition of the γ -secretase inhibitor DAPT had no effect on APP shedding, neither in the control nor in the APLP1-transfected cells. Thus, γ -secretase activity is not required for the APLP1-induced increase in APP shedding. This fits with the experiment in Fig. 3A showing that expression of the soluble intracellular domain of APLP1, which corresponds to the γ -secretase-cleaved APLP1 intracellular domain, had no effect on APP shedding. To ensure that DAPT was active, the APLP1 C-terminal fragments were immunoprecipitated from the cell lysates (Fig. 4B). In agreement with a previous publication (10), the γ -secretase inhibitor DAPT increased the amount of APLP1 C-terminal fragments.

APLP1 Requires Its Cytoplasmic GYENPTY Motif for the Induction of APP Shedding—To dissect further the molecular mechanism by which the cytoplasmic domain of APLP1 stimulates APP shedding, an additional APLP1 deletion mutant was tested, which lacks the amino acid motif GYENPTY in its cytoplasmic domain. This motif belongs to the NPXY class of endocytic trafficking signals (7). It is conserved in the APP homologs and is required for the endocytosis of the APP gene family (33, 34), presumably by providing a binding site for cytoplasmic adapter proteins that may link APP to the endocytic machinery and the clathrin-coated pits. Additionally, this sequence binds cytoplasmic adapter proteins, such as FE65, Dab, and X11, which have been shown to modulate the proteolytic processing of APP (for a review, see Ref. 15). Transient transfection into the AP-APP reporter cell line revealed that APLP1 lacking this motif (APLP1 Δ NPTY) has largely lost its ability to induce APP shedding compared with full-length wild-type APLP1 (Fig. 5A). A similar result was obtained in a second assay system. In HEK293 cells expressing endogenous wild-type APP, APLP1 Δ NPTY caused only a mild increase in APP shedding compared with full-length APLP1 (data not shown). Together, these experiments show that the APLP1-induced increase in APP shedding largely depends on the presence of the GYENPTY motif. Similar NPXY endocytosis motifs are found in a small number of unrelated type I membrane proteins, such as members of the LDL receptor family, the insulin receptor (IR) and the EGF receptor (EGFR). Thus, we tested whether other proteins containing an NPXY motif also increased APP shedding or whether this effect was specific for APLP1 and the APP family members. In contrast to APLP1, transient transfection of the IR and the EGFR or of LRP-CT had no effect on APP shedding (Fig. 5B). Likewise, L-selectin, which lacks an NPXY signal and was used as a negative control, did not alter APP shedding. All proteins were expressed as analyzed by immunoblotting (Fig. 5C).

The NPXY sequence in APLP1 differs from the corresponding sequence in the IR and EGFR in that it is two amino acids C-terminal to a tyrosine (Tyr-682 with respect to APP695 nomenclature, Fig. 5D). A

previous study showed that in addition to the NPXY motif Tyr-682 is required for efficient endocytosis of APP (34). Thus, we tested whether Tyr-638 in APLP1 (corresponding to Tyr-682 in APP) is required for inducing APP shedding. We used the sIg7-APLP1 construct and replaced Tyr-638 with the amino acid serine (sIg7-APLP1 Y/S), which is found at the corresponding position in the sequence of the IR (Fig. 5D). Both constructs were transiently transfected into the AP-APP cells. In contrast to wild-type sIg7-APLP1, which strongly activated APP shedding (Fig. 5E; see also Fig. 3A), the mutant sIg7-APLP1 Y/S carrying the Y638S mutation had a much weaker effect on APP shedding (Fig. 5E), revealing the requirement of Tyr-638 for full activation of APP shedding.

Tyr-682 of APP, in addition to the NPTY motif, is also required for efficient binding of APP to FE65 (35). Therefore, we tested whether the APP shedding-inducing effect of APLP1 correlated with its binding to FE65. Upon transient cotransfection into HEK293 cells, wild-type APP and APLP1 coimmunoprecipitated as expected with FE65 (Fig. 6, A and B). APLP1 lacking the GYENPTY motif (APLP1 Δ NPTY) did not interact with FE65 (Fig. 6B), revealing the importance of this motif as the FE65 binding site of APLP1. Moreover, sIg7-APLP1 coimmunoprecipitated with FE65, whereas sIg7-APLP1 Y/S showed a clear reduction of interaction with FE65 (Fig. 6C). This shows that, similar to APP, not only the NPXY motif, but also the first tyrosine within the GYENPTY motif is necessary for binding to FE65. Neither the insulin receptor (Fig. 6D) nor the EGFR (35) interacted with FE65. Taken together, these experiments demonstrate that the APLP1-induced APP shedding correlates with the capability of APLP1 to bind to FE65.

APLP1 Inhibits APP Endocytosis—The requirement for the presence of the endocytic GYENPTY motif in APLP1 suggests the possibility that expression of APLP1 interferes with the rate of APP endocytosis, potentially by inhibiting the binding of APP to FE65 or other endocytic proteins. As a result, more APP would be available for α -secretase cleavage, which is assumed to occur at or close to the plasma membrane (36).

To test for a possible influence of APLP1 on APP endocytosis, an immunofluorescence-based APP antibody uptake assay was used, similar to those described previously (31, 37). In this assay COS cells were transiently transfected with APP. Cell surface APP was labeled by incubating cells on ice with an antibody against the ectodomain of APP. Cells were returned to 37 °C for different incubation times (0, 7, 20, and 35 min) and then fixed, permeabilized, and stained with a fluorescently labeled secondary antibody against the prebound anti-APP antibody. In this assay, using a confocal microscope, APP showed a typical cell surface staining at 0 min (patchy cell surface staining and bright rim of the cell, Fig. 7A). As expected, no costaining with the endosomal marker EEA1 is seen at this time point (Fig. 7A). At 7 min, numerous cells showed APP-containing vesicles that are EEA1-positive (Fig. 7A, second row and magnified cell in the third row), identifying them as endosomes and showing that APP endocytosis can be visualized in this assay. As a control the COS cells were transiently cotransfected with APP and either GFP as a control or C-terminally GFP-tagged dynamin1 K44A. This dynamin1 mutant is a dominant-negative inhibitor of endocytosis, including the endocytosis of APP (38). As expected, both the GFP-transfected control cells as well as the dynamin K44A-transfected cells

panels, Red shows localization of APP. Right panels, merge of EEA1 and APP localization. Colocalization is indicated by yellow areas. 7 min a) and b), different cells are shown from the 7 min time point with 7b) showing a magnification of the cells to visualize colocalization in vesicles. B, COS cells were transiently cotransfected with APP and either GFP as a control (Con) or the C-terminally GFP-tagged dominant-negative dynamin mutant DynK44A. The antibody uptake assay was carried out as above. Cells were analyzed by standard fluorescence microscopy at the indicated time points. First and third panels, fluorescence of APP. Second and fourth panels, fluorescence of GFP or APLP1-GFP. Upper panel, At time point 0 min all cells show patchy cell surface staining. Additionally, the rim of the cells shows bright fluorescence. Lower panel, after 20 min most GFP-expressing cells show APP endocytosis; DynK44A-GFP expressing cells still show cell surface staining of APP. Note that after 20 min APP cell surface staining is less bright because some cell surface APP has undergone ectodomain shedding.

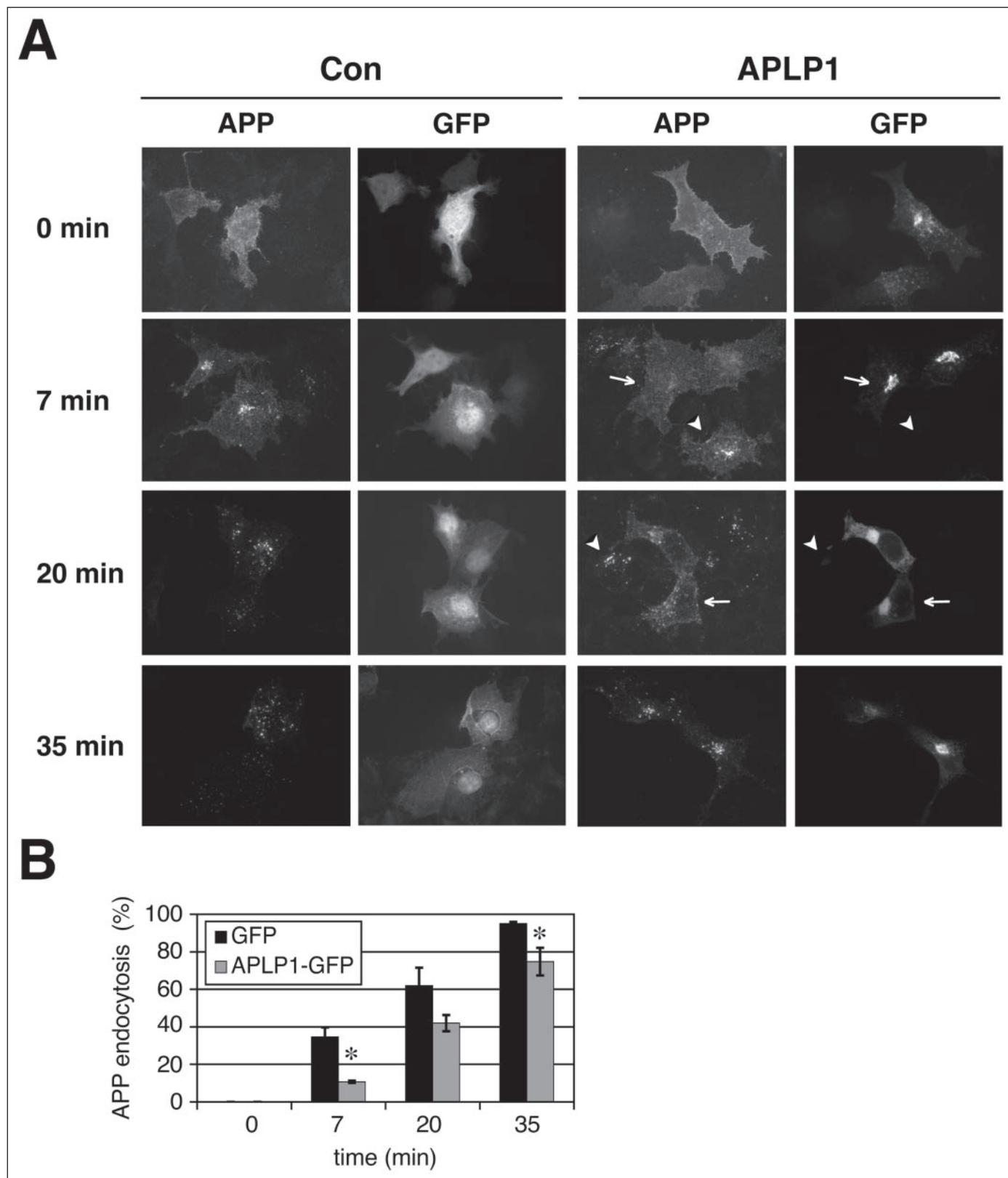


FIGURE 8. APLP1 reduces the rate of APP uptake. COS cells were transiently cotransfected with APP and either GFP as a control or C-terminally GFP tagged APLP1. Cells were incubated on ice with the primary antibody 5313 against the extracellular domain of APP. After the indicated time periods at 37 °C cells were fixed, permeabilized, and stained with a fluorescently labeled secondary antibody against the anti-APP antibody. Control (Con) and APLP1-transfected cells were analyzed by standard fluorescence microscopy at four different time points. *A*, first and third columns, fluorescence of APP. Second and fourth columns, fluorescence of GFP or APLP1-GFP. *Top row*, at time point 0 all cells showed patchy cell surface staining of APP. *Second to fourth rows*, APLP1-GFP-expressing cells showed reduced levels of APP endocytosis compared with GFP-expressing cells at all time points analyzed. *Arrows* point to cells that express APLP1. *Arrowheads* point to cells from the same transient transfection, which showed APP expression but no detectable APLP1 expression; these cells showed endocytosis similar to the control cells. Note that at 20 min the cell with the *arrow* has just started undergoing APP endocytosis (APP-positive vesicles and additionally remaining APP cell surface staining can be seen) and looks more like a control cell at the earlier time point of 7 min than like the control cells at 20 min. In contrast, the cell with the

showed APP cell surface staining at time point 0 min (Fig. 7B) using a standard fluorescence microscope. After 20 min the GFP control cells showed the typical endosomal APP staining (Fig. 7B), indicating that APP endocytosis had occurred. In contrast, the dynamin K44A-transfected cells showed no APP endocytosis at this time point (Fig. 7B, lower row, arrow). In this transient transfection experiment, some cells expressed only one of the two transfected constructs. Importantly, cells that expressed APP but no dynamin K44A clearly showed endosomal APP staining (Fig. 7B, lower row, arrowhead), similar to the control transfected cells.

Having validated the APP endocytosis assay, we next tested for a possible influence of APLP1 on APP endocytosis. To this aim, COS cells were transiently cotransfected with APP and either GFP as a control or C-terminally GFP-tagged APLP1. Using standard fluorescence microscopy analysis the transfected cells were identified by their green fluorescence (GFP or APLP1-GFP) and scored as either showing endocytosis (endocytic APP-positive vesicles, Fig. 8A) or not showing endocytosis (patchy cell surface APP staining and no endocytic vesicles, Fig. 8A). Because not all cells start endocytosis at the same time, around 100 cells at every time point were analyzed and scored. Representative pictures for every time point are shown in Fig. 8A. The statistical analysis in Fig. 8B reveals that APP endocytosis occurred in a time-dependent manner in both the APLP1 and the control transfected cells. At time point 0 min none of the APLP1 or control transfected cells showed endocytosis (Fig. 8B), as seen with the typical cell surface staining of APP (Fig. 8A). At 7 min, about one-third of the control cells (34%) had endocytosed APP, whereas this was the case for only 11% of the APLP1-transfected cells, indicating that APLP1 expression lowered the rate of APP endocytosis. Importantly, cells that expressed APP but not APLP1-GFP (Fig. 8A, arrowhead) showed normal APP endocytosis similar to the control cells. At 20 min and at 35 min APP endocytosis increased in the control and the APLP1-transfected cells. At 35 min essentially all control cells displayed APP endocytosis. Even most of the APLP1-transfected cells showed endocytosis at this time point, but to a slightly and significantly reduced extent (Fig. 8B). This reveals that, unlike dynamin K44A, APLP1 expression does not completely inhibit APP endocytosis, but slows down the rate of APP endocytosis, particularly at the early time point (7 min). As in the dynamin K44A experiment, some cells expressed only APP, but not the GFP-tagged APLP1 (Fig. 8A, indicated with arrowheads at 7 and 20 min). Similar to the control transfected cells, these cells showed endosomal APP staining, whereas at the same time point the APLP1-expressing cells still showed cell surface APP staining (at 7 min, arrows) or only started to show APP endocytosis (at 20 min, arrows).

APLP1 Induces APP Shedding in an LRP-dependent Manner—The rate of APP endocytosis and shedding has been shown to depend on the presence of the LRP (21, 22), which is assumed to bind to APP through the adapter protein FE65. In the absence of LRP (knock-out cells) APP endocytosis is impaired, and shedding by α -secretase is increased, similar to what we observed upon expression of APLP1. Thus, we tested whether APLP1 stimulated APP shedding in an LRP-dependent manner. To this aim, CHO cells expressing endogenous wild-type LRP (LRP+/+) or CHO cells lacking LRP expression (LRP-/-) were transiently transfected with APLP1, APLP1 Δ NPTY, or empty control vector (Fig. 9A). Compared with control transfected cells, APLP1 but not APLP1 Δ NPTY, increased endogenous APP shedding in the wild-type

CHO cells by \sim 3.5-fold (Fig. 9A), similar to the effect seen in HEK293 cells (Fig. 2). Vector transfected LRP-/- cells showed an increased APP secretion compared with the LRP+/+ wild-type cells (data not shown), in agreement with previous publications (21, 22, 24). In these cells, APP secretion has not yet reached its maximum because it can be further enhanced, for example by phorbol 12-myristate 13-acetate (24). However, APLP1 did not further increase APP secretion in the LRP-/- cells significantly (Fig. 9A), indicating that in wild-type cells the APLP1-induced increase in APP shedding might be dependent on the LRP-mediated uptake of APP. Importantly, the APLP1-induced increase in APP shedding could be restored in LRP-/- cells that were cotransfected with LRP-CT (Fig. 9B).

DISCUSSION

Extracellular shedding of APP, and more specifically the α -secretase cleavage, can be activated by a variety of different proteins and extracellular stimuli (for a review, see Ref. 6). However, the underlying molecular pathways and mechanisms remain little understood. In this study we identified the APP homolog APLP1 as a novel activator of APP shedding. We show that expression of APLP1 interferes with APP endocytosis, thus making more APP available for an increased shedding at the cell surface. This fits well with previous studies showing that a reduction of wild-type APP endocytosis increases the amount of APP shedding (33, 38). Further support for the involvement of endocytosis in the APLP1-induced APP shedding comes from the results of the domain deletion analysis of APLP1. As expected for a protein that interferes with APP endocytosis, the C-terminal fragment of APLP1 induced APP shedding only when its cytoplasmic domain was membrane-associated and when it was allowed to exit the endoplasmic reticulum. Another result that agrees well with the APLP1-induced reduction of APP endocytosis, is the finding that APLP1 strongly activated the α -secretase cleavage of APP and slightly reduced β -secretase cleavage. The α -secretase is assumed to be active at the cell surface (36), whereas β -cleavage of wild-type APP occurs after endocytosis in the endosomes. For example, APP lacking its cytoplasmic domain including its NPTY internalization motif undergoes much less APP endocytosis and β -secretase cleavage, but more α -secretase cleavage compared with full-length APP (33, 34). Likewise, inhibition of general dynamin-dependent endocytosis, including the inhibition of APP endocytosis, resulted in more endogenous APP at the cell surface and in an increased shedding, mainly by α -secretase and to a lower extent by β -secretase (38).

What is the mechanism underlying the APLP1-induced inhibition of APP endocytosis? APP has been shown to bind to a variety of cytoplasmic adapter proteins, such as FE65, X11, Numb, Shc, mDab, JIP, Grb2, and Abl (for an overview, see Ref. 14), which all seem to compete for the same binding site at or around the NPTY motif in the cytoplasmic domain of APP. Among these proteins, FE65, X11, and JIP have been shown to alter APP trafficking and shedding in cultured cells (see for example 22, 24, 39–44). FE65 and X11 also affect APP processing *in vivo* (45, 46). For the other interactors similar effects have not been reported. Among the interacting proteins, FE65 and X11 have been studied most intensively and seem to have opposite effects on APP shedding and trafficking, with FE65 increasing and X11 decreasing APP shedding. APLP1 binds to the same cytoplasmic proteins as APP (47–49) and may thus reduce binding of APP to FE65, X11, or one of the other cytosolic interactors. If such a competition for APP binding partners is the basis

arrowhead looks like the control cell at the same time point of 20 min. Representative pictures of three independent experiments are shown. B, around 100 cells expressing GFP or APLP1-GFP were analyzed at every time point and scored as showing or not showing APP endocytosis. Given are the mean \pm S.D. of three independent experiments. Counting of cells was done under double blind conditions. Asterisk indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$, determined by Student's *t* test) between APLP1- and GFP-transfected cells with regard to the number of cells showing endocytosis.

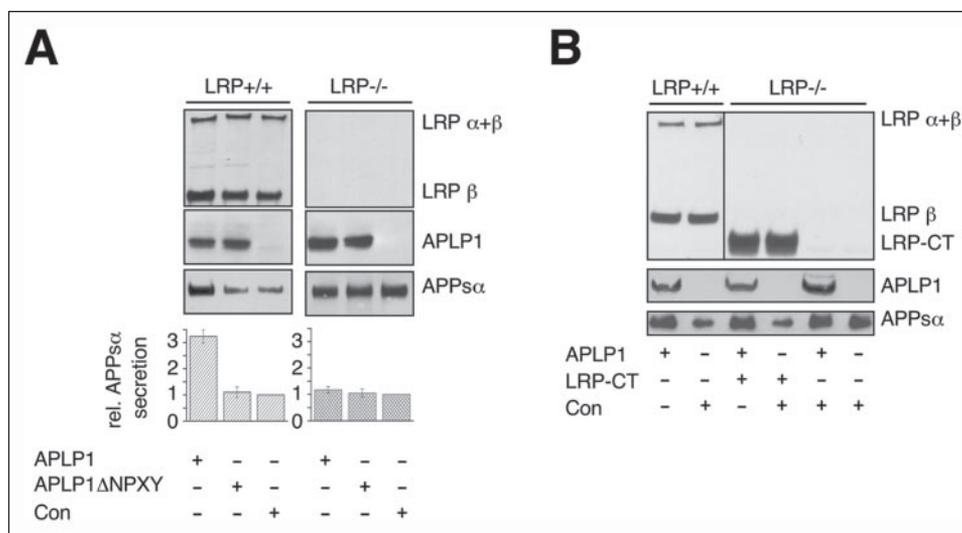


FIGURE 9. Effect of APL1 on APP shedding depends on the presence of LRP. Wild-type CHO cells expressing LRP (LRP+/+) and LRP-deficient CHO cells (LRP-/-) were transiently transfected with control vector (Con), with APL1, APL1 lacking the cytoplasmic FE65-binding motif (GYENPTY) (A) or the LRP-CT (B). Aliquots of the conditioned medium and the cell lysates were separated by electrophoresis and blotted for soluble APP in the conditioned medium (antibody 1G75A3) and for LRP (antibody LRP1704) and APL1 (antibody 57) expression in the cell lysate. A, lower panel, quantification of three different experiments, each performed in duplicate. Note that APP secretion is only increased after APL1 transfection in cells expressing LRP (LRP+/+). B, LRP+/+ and LRP-/- cells were transiently transfected with control vector or with APL1. In addition, LRP-/- cells were cotransfected with APL1 and LRP-CT. Experiments were performed as described in A. Transfection of LRP-CT into LRP-/- cells rescues the effect of APL1 expression on APP shedding.

for the APL1-induced phenotype (increase in APP shedding and reduction of APP endocytosis), then this APL1 phenotype should be similar to a loss-of-function phenotype of the corresponding interactor. Additionally, such an interactor that is bound by APL1 should affect APP shedding in an LRP-dependent manner because the APL1-induced APP shedding phenotype was only observed in LRP-expressing cells. Among the interactors of APP and APL1, FE65 is the best candidate to be involved in the APL1 phenotype. The RNA interference-mediated knock-down of FE65 in mouse embryonic fibroblasts results in a phenotype that is essentially identical to the APL1-induced phenotype: increase of APP α -shedding in an LRP-dependent manner. A specific mechanism of how FE65 controls the endocytosis and shedding of APP, but not of unrelated membrane proteins, has been put forward by several groups using different experimental approaches (23–25, 50). According to this model LRP, FE65, and APP form a complex in which the cytosolic FE65 links the cytoplasmic domains of the type I membrane proteins APP and LRP (Fig. 10A). In fact, similar to the knock-down of FE65 a knock-out or knock-down of LRP led to increased APP α -shedding (21, 22, 24) (Fig. 10B).

One essential aspect of the APP-FE65-LRP model has not yet been tested experimentally. Based on the model we predict that not only a reduction in LRP or FE65 expression should interfere with complex formation, but also the increased expression of membrane proteins that may functionally replace APP in terms of complex formation with FE65 and LRP. Such proteins would compete with APP for the binding to FE65 and LRP (Fig. 10C), resulting in a pool of APP, which (a) is not complexed to LRP, (b) is not efficiently endocytosed, and (c) undergoes increased α -secretase cleavage. In agreement with the prediction of the model, not only APL1 but also APLP2 and the C-terminal C99 fragment of APP increased APP shedding. Even APP itself stimulated APP shedding, which was observed when wild-type APP was transfected into AP-APP cells, where the secretion of the AP-tagged APP (expressed at low levels similar to the endogenous APP (32)) could be clearly separated from the secretion of the untagged wild-type APP. Thus, interfering with APP binding to FE65 and LRP results in a phenotype similar to that in LRP-deficient cells (Fig. 10C). This model may also explain why

APL1 did not induce APP shedding in APP-overexpressing cells. In such cells APP shedding is not only increased, because much more substrate is available for the secretases, but presumably also because not all of the transfected APP forms a complex with the limited amounts of endogenous LRP and FE65. Thus, transfection of APL1 may not further compete with APP for LRP-FE65 complexes and enhance APP shedding to an extent that can be detected by immunoblot analysis.

In further support of the model, the effect of APL1 required the cytoplasmic GYENPTY signal, which we identified to be the binding site of FE65. Moreover, the APL1-induced APP shedding phenotype was not observed in LRP-deficient cells, where the complex cannot form, and APP shedding is already elevated compared with LRP-expressing control cells (Fig. 10B). In contrast to the APP gene family, IR, the EGFR, and a membrane-bound LRP-CT had no effect on APP shedding. All three proteins contain one or two cytoplasmic NPXY motifs. However, the IR (this study) and the EGFR (35) do not bind FE65 and thus cannot compete with APP for complex formation. In contrast, LRP-CT, which binds FE65 (24), is able to substitute for full-length LRP in the complex, but not for APP, and thus explains the lack of an effect of LRP-CT on APP shedding. Taken together, these experiments provide an additional and essential validation for the model of APP-FE65-LRP complexes in the control of APP shedding and trafficking.

Interestingly, a homolog of LRP, LRP1B, may form a complex with APP similar to LRP itself. A recent study showed that LRP1B can also be coimmunoprecipitated with APP (51), but it remains unclear whether this interaction is also mediated by FE65. In contrast to LRP, which is rapidly endocytosed and mediates efficient APP endocytosis, LRP1B is very slowly endocytosed and reduces APP endocytosis. These experiments reinforce the notion that LRP is an endocytic receptor for APP and that the rate of LRP or LRP1B endocytosis determines the rate of APP endocytosis.

As described above APP and APL1 bind more cytoplasmic interactors than just FE65/LRP. Such additional interactors could potentially also be involved in the APL1-induced APP shedding phenotype, but evidence for this is currently lacking. Besides FE65 there is only one more interactor, X11, for which detailed effects on APP shedding have

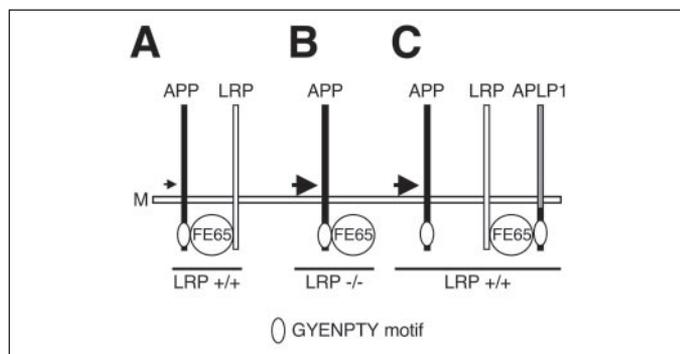


FIGURE 10. **Model for the influence of LRP and APLP1 on APP shedding.** *A*, under wild-type conditions APP, FE65, and LRP form a complex, allowing efficient APP endocytosis and resulting in low levels of APP shedding (*thin arrow*). The size of proteins is not drawn to scale. *B*, in LRP-deficient cells (LRP^{-/-}), endocytosis of APP is reduced, and APP shedding is increased (*bold arrow*). *C*, in cells transfected with APLP1, LRP preferentially forms a complex with APLP1, resulting in APP not being complexed to LRP. This results in a state resembling LRP deficiency (*B*) and an increase in APP shedding (*bold arrow*).

been investigated. Both overexpression and knock-down of X11 lead to an inhibition but not to a stimulation of different aspects of APP processing (43, 46, 52), which is in contrast to the APLP1-induced shedding increase, making a specific involvement of X11 unlikely. For most other APP interactors it is not clear whether and how they influence APP shedding.

In summary, our study reveals a novel and previously unrecognized molecular mechanism for APP shedding, namely that proteins, which substitute for APP in forming complexes with FE65 and LRP, can alter APP shedding. This mechanism is highly specific to the APP gene family. Given that all three proteins of this family can stimulate the shedding of APP, it seems possible that they can also influence the shedding of APLP1 and APLP2. This raises the possibility that changes in the individual expression levels of the three proteins may influence the shedding of all three family members. In fact, expression levels of APP, APLP1, and APLP2 are regulated differentially upon physiological and pathophysiological stimuli in tissue culture and *in vivo*, such as during embryonic development, neuronal differentiation, wound repair, and exposure to the curry spice curcumin, which is currently tested as a treatment option for Alzheimer disease (53–55). Such conditions and stimuli may alter endocytosis and secretion of APP and thus may allow modulating the secretion of the neurotrophic and neuroprotective APP α and of the pathogenic A β peptide.

Acknowledgments—We thank Konrad Beyreuther, Simone Eggert, Axel Ullrich, Gordon Gill, Marc Caron, Dale Schenk, Boris Schmidt, and Brian Seed for antibodies, plasmids and inhibitors.

REFERENCES

1. Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997) *Biochem. J.* **321**, 265–279
2. Blobel, C. P. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 606–612
3. Selkoe, D. J., and Schenk, D. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545–584
4. Citron, M. (2004) *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 92–97
5. Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
6. Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003) *J. Neurosci. Res.* **74**, 342–352
7. Bonifacino, J. S., and Traub, L. M. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447
8. Bayer, T. A., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (1999) *Mol. Psychiatry* **4**, 524–528
9. Scheinfeld, M. H., Ghersi, E., Laky, K., Fowlkes, B. J., and D’Adamo, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44195–44201
10. Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 18146–18156

11. Li, Q., and Sudhof, T. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 10542–10550
12. Walsh, D. M., Fadeeva, J. V., LaVoie, M. J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W. T., Wasco, W., and Selkoe, D. J. (2003) *Biochemistry* **42**, 6664–6673
13. Bayer, T. A., Paliga, K., Weggen, S., Wiestler, O. D., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (1997) *Acta Neuropathol.* **94**, 519–524
14. Russo, C., Venezia, V., Repetto, E., Nizzari, M., Violani, E., Carlo, P., and Schettini, G. (2005) *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 257–264
15. King, G. D., and Scott Turner, R. (2004) *Exp. Neurol.* **185**, 208–219
16. Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., and Greengard, P. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 5407–5415
17. Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., and Greengard, P. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 1403–1414
18. Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001) *Science* **293**, 115–120
19. Cao, X., and Sudhof, T. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 24601–24611
20. Herz, J., and Strickland, D. K. (2001) *J. Clin. Invest.* **108**, 779–784
21. Ulery, P. G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R. E., Rebeck, G. W., Hyman, B. T., and Strickland, D. K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 7410–7415
22. Pietrzik, C. U., Busse, T., Merriam, D. E., Weggen, S., and Koo, E. H. (2002) *EMBO J.* **21**, 5691–5700
23. Kinoshita, A., Whelan, C. M., Smith, C. J., Mikhailenko, I., Rebeck, G. W., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 8354–8361
24. Pietrzik, C. U., Yoon, I. S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., and Koo, E. H. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 4259–4265
25. Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B., and Herz, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33556–33560
26. Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fichteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
27. Seubert, P., Oltsdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., and Thal, L. J. (1993) *Nature* **361**, 260–263
28. Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22908–22914
29. Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48713–48719
30. Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldberg, E., Holtzlynska, E. J., Hu, K. L., Johnson-Wood, K. L., Kennedy, S. L., Kholodenko, D., Knops, J. E., Latimer, L. H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I. M., Motter, R. N., Mutter, L. C., Nietz, J., Quinn, K. P., Sacchi, K. L., Seubert, P. A., Shopp, G. M., Thorsted, E. D., Tung, J. S., Wu, J., Yang, S., Yin, C. T., Schenk, D. B., May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., and Audia, J. E. (2001) *J. Neurochem.* **76**, 173–181
31. Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H., and Haass, C. (2002) *J. Cell Biol.* **158**, 551–561
32. Ting, A., Lichtenthaler, S., Xavier, R., Na, S. Y., Rabizadeh, S., Holmes, T., and Seed, B. (2005) *Novartis Found. Symp.* **267**, 219–230
33. Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17386–17389
34. Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B., and Koo, E. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18851–18856
35. Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6229–6241
36. Sisodia, S. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6075–6079
37. Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **357**, 500–503
38. Chyung, J. H., and Selkoe, D. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 51035–51043
39. Lee, J. H., Lau, K. F., Perkinson, M. S., Standen, C. L., Rogelj, B., Falinska, A., McLoughlin, D. M., and Miller, C. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 49099–49104
40. Sabo, S. L., Lanier, L. M., Ikin, A. F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., and Buxbaum, J. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7952–7957
41. Sastre, M., Turner, R. S., and Levy, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22351–22357
42. Guenette, S. Y., Chen, J., Ferland, A., Haass, C., Capell, A., and Tanzi, R. E. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 985–993
43. Borg, J. P., Yang, Y., De Taddeo-Borg, M., Margolis, B., and Turner, R. S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14761–14766
44. Taru, H., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 27567–27574
45. Santiard-Baron, D., Langui, D., Delehedde, M., Delatour, B., Schombert, B., Touchet, N., Tremp, G., Paul, M. F., Blanchard, V., Sergeant, N., Delacourte, A., Duyckaerts, C., Pradier, L., and Mercken, L. (2005) *J. Neurochem.* **93**, 330–338
46. Xie, Z., Romano, D. M., and Tanzi, R. E. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15413–15421
47. Homayouni, R., Rice, D. S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 7507–7515
48. Bressler, S. L., Gray, M. D., Sopher, B. L., Hu, Q., Hearn, M. G., Pham, D. G., Dinulos, M. B., Fukuchi, K., Sisodia, S. S., Miller, M. A., Disteche, C. M., and Martin, G. M. (1996) *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1589–1598
49. Duilio, A., Faraonio, R., Minopoli, G., Zambrano, N., and Russo, T. (1998) *Biochem. J.*

APLP1 Influences APP Shedding

330, 513–519

50. Rebeck, G. W., Moir, R. D., Mui, S., Strickland, D. K., Tanzi, R. E., and Hyman, B. T. (2001) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **87**, 238–245
51. Cam, J. A., Zerbinatti, C. V., Knisely, J. M., Hecimovic, S., Li, Y., and Bu, G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 29639–29646
52. Araki, Y., Tomita, S., Yamaguchi, H., Miyagi, N., Sumioka, A., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49448–49458
53. Beckman, M., and Iverfeldt, K. (1997) *Neurosci. Lett* **221**, 73–76
54. Kummer, C., Wehner, S., Quast, T., Werner, S., and Herzog, V. (2002) *Exp. Cell Res.* **280**, 222–232
55. Adlerz, L., Beckman, M., Holback, S., Tehranian, R., Cortes Toro, V., and Iverfeldt, K. (2003) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **119**, 62–72

