

1 EINLEITUNG

1.1 Die Genfamilie der Vps10p-Rezeptoren

Die Genfamilie der „vacuolar-protein-sorting 10 protein“ (Vps10p)–Rezeptoren beschreibt eine Klasse von Rezeptoren, die sich durch eine aminoterminal (n-terminale) Vps10p-Domäne auszeichnet. Alle Mitglieder dieser Familie sind darüber hinaus gekennzeichnet durch einen Membrananker und einen carboxyterminalen (c-terminalen) Bereich. (Abbildung 1) Die Vps10p-Rezeptorgenfamilie umfaßt 6 Mitglieder: den Vps10p-Rezeptor, den „sorting protein-related receptor containing low-density lipoprotein receptor [LDLR] class-A repeats“ (SorLA)-Rezeptor, den Sortilin-Rezeptor und 3 „sortilin-related Vps10p-domain containing“-Rezeptoren (SorCS1, SorCS2, SorCS3).

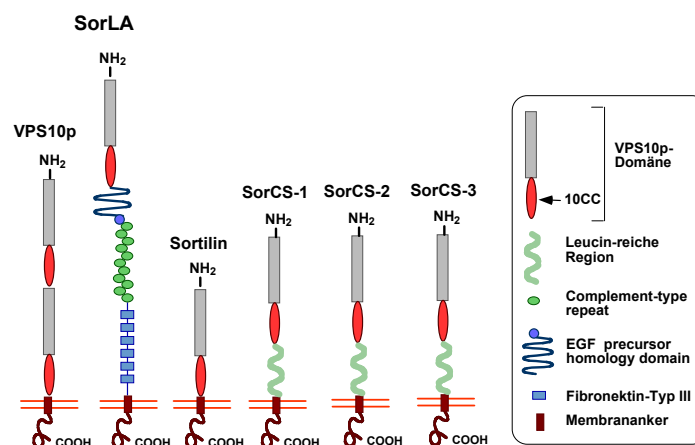


Abbildung 1 Die Genfamilie der Vps10p-Rezeptoren. Dargestellt ist der strukturelle Aufbau der Mitglieder der Vps10p-Rezeptorgenfamilie. Alle Mitglieder tragen die Vps10p-Domäne im extrazellulären Bereich. Darüber hinaus findet man bei den SorCS-Rezeptoren eine Leucin-reiche Region, bei SorLA die „EGF precursor homology domain“, 11 „complement-type repeats“ oder auch „class-A repeats“ und 6 „Fibronectin type-III domains“. Weiterhin ist allen Rezeptoren gleich: der Membrananker und ein kurzer intrazellulärer carboxyterminaler Bereich.

Ursprünglich wurde das *Vps10-Protein* in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß der Vps10p-Rezeptor in der Hefe für den Transport der

Carboxypeptidase-Y aus dem Golgi in die Vakuolen (entsprechen den pflanzlichen Lysosomen) verantwortlich ist (Marcusson et al., 1994; Cooper et al., 1996).

Sortilin wurde erstmals 1997 beschrieben. Das 95 kDa große Protein wurde aus dem menschlichen Gehirn gereinigt (Petersen et al., 1997), parallel dazu wurde Sortilin als Bestandteil von Glukosetransporter-4 (GLUT4)-Vesikeln im Muskelgewebe (Lin et al., 1997; Morris et al., 1998) und als potentieller Rezeptor für das Neuropeptid Neurotensin identifiziert (Mazella et al., 1998). Nykjaer et al. (2004) zeigten, daß der Vorläufer des Nervenwachstumsfaktors („pro nerve growth factor“ - proNGF) einen Signalisierungskomplex mit dem p75-Neurotrophin Rezeptor (p75^{NTR}) und Sortilin bildet und erst durch die Bindung beider Rezeptoren den proNGF-induzierten neuronalen Zelltod vermittelt.

1999 beschrieben Hermey et al. erstmals den **SorCS1** Rezeptor mittels Northern Blot-Analyse im Mausgewebe. Die Charakterisierung von **SorCS2** erfolgte 2001 durch Rezgaoui et al. hauptsächlich im murinen Gehirn. Nachgewiesen wurde SorCS2 aber auch in der Lunge und den Hoden. **SorCS3** wurde 2001 durch Hampe et al. beschrieben. In humanem Material ließ sich das **SorCS3**-Transskript im Gehirn, der Niere, im Herzen und der Leber nachweisen.

Die Expressionsraten der SorCS1-3 sind in embryonalen Entwicklungsstadien des Hirns deutlich höher als in adulten Gehirnen, was auf eine physiologische Rolle dieser bei der Ausbildung und Entwicklung von neuronalen Strukturen hindeuten könnte (Hermey et al., 2004). Trotz der sehr ähnlichen Struktur und der Homologie zwischen SorCS1, SorCS2 und SorCS3 ist das Expressionsmuster wenig redundant und läßt somit auf sehr verschiedene Funktionen der einzelnen Proteine schließen (Hermey et al., 2004).

SorLA oder auch „low-density lipoprotein receptor containing 11 ligand-binding repeats“ (LR11) wurde 1996 erstmals im Kaninchen beschrieben (Yamazaki H. et al., 1996). Kurz darauf wurde SorLA im Huhn (Mörwald et al., 1997) und im Menschen (Jacobsen et al., 1996) nachgewiesen. Das Gen für SorLA (*sorLA*) lokalisiert im humanen Genom auf dem Chromosom 11q23/24, das Protein hat eine Größe von 250 kDa (Jacobsen et al., 1996).

SorLA ist in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Hohe Expressionsraten findet man im Gehirn, hier besonders im Hippocampus, dem Gyrus dentatus und dem zerebralen Kortex (Kanaki et al., 1998; Hermans-Borgmeyer et al., 1998). Aber auch im Rückenmark, der Leber

und den Hoden sowie in der Lunge, der Niere, den Lymphknoten, der Gebärmutter und der Schilddrüse findet man den SorLA-Rezeptor exprimiert (Jacobsen et al., 1996; Yamazaki H. et al., 1996; Mörwald et al., 1997; Kanaki et al., 1998).

1.2 Struktur und Funktion von SorLA

Struktur

SorLA zählt zu den Typ-1 Membranrezeptoren, welche geprägt sind durch einen extrazellulären Aminoterminus und einen intrazellulären Carboxyterminus. Der Rezeptor ist charakterisiert durch 8 Domänen, die sich auf den extrazellulären, den Transmembran- und den intrazellulären Bereich verteilen. Der n-terminale Teil ist aufgebaut aus dem Propeptid, der Vps10p-Domäne, einer spezifischen Aminosäuresequenz aus Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Asparaginsäure (YWTD-Propeller), der „epidermale growth factor precursor“ (EGFprecursor)-Domäne, einer Region mit 11 „complement-type repeats / class-A repeats“ (CR-cluster) und einer Kasette von 6 „Fibronectin type-III“-Domänen. Dem schließt sich der Transmembranbereich an und schließlich der intrazelluläre Bereich, bestehend aus 54 Aminosäuren einschließlich einer speziellen Aminosäuresequenz (Phenylalanin, Alanin, Asparagin, Serin, Histidin, Tyrosin - FANSHY), die der Aminosäuresequenz FDNPxY („x“ steht für beliebige Aminosäure) ähnelt (Yamazaki H. et al., 1996; Jacobsen et al. 1996). FDNPxY oder NPxY ist in einer Vielzahl von Endozytoserezeptoren vertreten und für die Clathrin-abhängige Internalisierung essentiell (Chen et al., 1990).

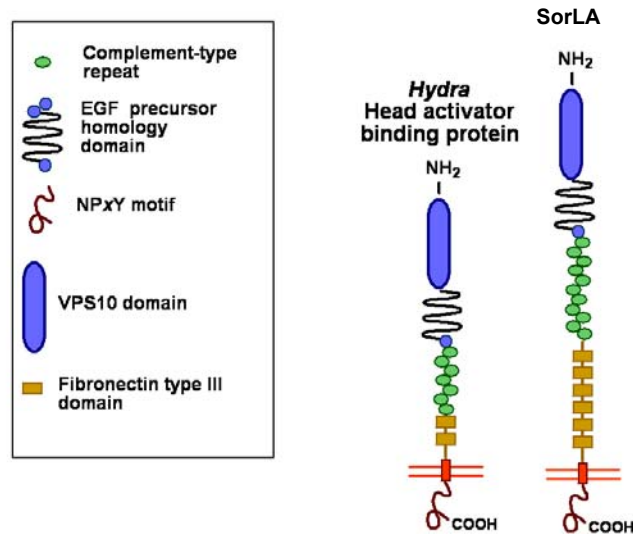


Abbildung 2 Struktur von SorLA und „head activator binding protein“ (HAB). Auffällig ist die strukturelle Homologie zwischen HAB und SorLA. Sie umfasst im extrazellulären Bereich das Propeptid, die Vps10p-Domäne, die „EGF precursor homology“-Domäne, „complement-type repeats“ (11 repeats bei SorLA, 7 repeats bei HAB) und die „Fibronectin type-III“ Domäne (6 Domänen bei SorLA, 2 Domänen bei HAB). Beide Proteine tragen eine Transmembrandomäne und einen intrazellulären carboxyterminalen Bereich.

Interessanterweise zeigt SorLA strukturelle Homologie zu dem „head activator binding protein“ (HAB) des Süßwasserpolypen *Hydra vulgaris* (Abbildung 2) (Jacobsen et al., 1996; Yamazaki H. et al., 1996). Das HAB ist das Bindeprotein bzw. der Rezeptor für das „head activator protein“ (HA) (Hampe et al., 1996). Dieses reguliert Prozesse, die zum Neuwachsen und Ausdifferenzieren des Kopfes beim Süßwasserpolypen führen (Hampe et al., 1999). Auf der Suche (mittels EST-Datenbank-Screening) nach einem homologen Protein im Organismus der Säuger ist man auf SorLA gestoßen. Der SorLA-Rezeptor hat als einziges Säugerprotein eine identische Kombination und Anordnung der Domänen wie sie HAB aufweist (Jacobsen et al., 1996; Yamazaki H. et al., 1996).

SorLA wird, ähnlich dem HAB, als Preproprotein synthetisiert (Jacobsen et al., 1996; Hampe et al., 1999). Nach Abspaltung des Signalpeptids im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird das Propeptid im Golgi-Apparat durch Furin abgetrennt (Hampe et al., 2000; Jacobsen et al., 2001).

Bisher charakterisierte Liganden für die Vps10p-Domäne sind das Propeptid, HA und Neurotensin.

Apolipoprotein-E (ApoE), Lipoproteinlipase (LpL) und das Rezeptor-assoziierte Protein (RAP), ein Chaperon der LDL-Rezeptorgenfamilie, binden am CR-cluster. Dabei inhibiert sowohl die Bindung des Propeptids, als auch die des RAP die Interaktionen anderer Liganden an den jeweiligen Domänen (Jacobsen et al., 2001).

Funktion

Wenig ist bisher über die Funktion von SorLA bekannt. In transfizierten Zellen konnte man mittels Markierung der Zelloberflächenproteine nachweisen, daß nur ein geringer Anteil (10 %) des Rezeptors an der Zellmembran exprimiert wird. Der weitaus größere Teil (90 %) der Moleküle wurde in Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) und in Endosomen beobachtet (Jacobsen et al., 2001).

Kanaki et al. (1999) beobachteten hohe SorLA-Expressionsraten in Arterienwänden von Ratten und Kaninchen, in denen Prozesse der Arteriogenese (Arterienwachstum nach lokalem Arterienverschluß bzw. nach Cholesterol-reicher Diät) induziert wurden. Dabei konzentrierte sich die SorLA-Expression auf glatte Muskelzellen („smooth muscle cells“ - SMC) der Arterienwände.

Basierend auf den Daten von Kanaki (1999) untersuchten Zhu et al. (2002, 2004) den molekularen Hintergrund. Sie zeigten im Zellkulturmodell, daß SorLA zu einer erhöhten Migration, also Wanderung, der SMC beiträgt. Die Migration von Zellen basiert auf einer genauen Koordination von Adhäsion und Proteolyse extrazellulärer Matrixproteine. Bestandteil des Proteolyse-systems ist die Protease Plasmin. Diese wird nach Bindung des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (uPA) am Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) aus der inaktiven Vorstufe (Plasminogen) durch uPA aktiviert. Voraussetzung hierfür ist eine verstärkte Exposition des uPAR an der Zelloberfläche. Zhu et al. (2004) postulieren, daß durch die Interaktion mit SorLA uPAR an der Plasmamembran stabilisiert und zusätzlich die Internalisierung von uPAR inhibiert wird.

Einen Zusammenhang zwischen der SorLA-Expression und der Proliferation und Differenzierung von Zellen beobachteten Hirayama et al. (2000). Sie untersuchten die SorLA-Expression in Neuroblastomazellen, in denen Proliferation und Differenzierung induziert wurden. Die gemessene SorLA-Proteinmenge und die SorLA-mRNA war in beiden Fällen und beiden Zelllinien erhöht. Eine mögliche Rolle von SorLA wird daher bei zellulärem Wachstum bzw. beim Aussprossen der Neuronen vermutet.

Eine erste Untersuchung der Funktion von SorLA in der Niere erfolgte 2002 durch Riedel et al.. Sie analysierten die murine SorLA-Expression in Hinblick auf die embryonale Entwicklung der Niere und die genaue Lokalisation innerhalb der einzelnen Nierensegmente. Hohe Expression wurde bereits für die Niere von Mausembryonen im Alter von 14 Tagen nachgewiesen. Adulte Tiere wiesen SorLA-Expression im Sammelrohr auf, hierbei besonders in Aquaporin-positiven Vesikeln. Aquaporine (AQP) sind Wasserkanäle, die bei Bedarf aktiviert werden und so das Sammelrohr wasserpermeabel machen. Dies führt zur Wasserrückresorption aus dem Primärharn und gleichzeitig zur Aufkonzentrierung des Urins. Eine Änderung der SorLA-Expression bei Aktivierung der AQP konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Erste Daten, die SorLA in Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit stellten, präsentierten Scherzer et al. auf dem „Neurosciencemeeting 2001“ in San Diego (Abstract). Mittels differentieller Genexpressionsanalyse der Lymphoblasten von Alzheimer-Patienten wurden differentiell regulierte Gene untersucht. Es ließ sich zeigen, daß die Kontrollgruppe ein 2-fach höheres SorLA-Genexpressionsniveau aufwies als die Patientengruppe. Dies bedeutet, daß SorLA entweder in Folge der Alzheimer-Krankheit geringer exprimiert wird oder, daß eine niedrige SorLA-Expression zur Ausbildung von Morbus Alzheimer führen kann. Allerdings gab es keine weiteren Daten, die den Zusammenhang des Rezeptors mit der Demenzkrankheit näher untersuchten.

1.3 Die Alzheimer-Krankheit

Vor genau 100 Jahren (1906) hatte erstmals der Psychiater und Arzt Alois Alzheimer eine Patientin mit Symptomen identifiziert, die typisch waren für die später nach ihm benannte

Alzheimer-Krankheit. Auguste Deter (51 Jahre) litt an progressiver Gedächtnisstörung und verstarb 1906. Nach ihrem Tod wurden im Gehirn Ansammlungen von Proteinablagerungen nachgewiesen, welche bereits 1854 von Rudolf Virchow als amyloid, also Stärke-ähnlich, beschrieben wurden.

Die Alzheimer-Krankheit (AK) zählt zu den Demenzen (Verstandesverlust) oder auch sekundären Tauopathien mit Amyloidablagerungen. Das sind neurodegenerative Krankheiten charakterisiert durch Ablagerungen der Proteine Tau und β -Amyloid im Gehirn (Jellinger, 2005). Ausgehend von der Beteiligung dieser Proteine teilt sich die Forschung auf dem Gebiet der Alzheimer-Krankheit in zwei Bereiche.

Zum einen befaßt sie sich mit der Analyse des Proteins Tau. Dieses ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das in Neuronen exprimiert wird und normalerweise zur Stabilität der Mikrotubuli beiträgt, welche wiederum für Transportvorgänge der Zelle notwendig sind (Mandelkow et al., 1996). Tau ist bei Alzheimer-Patienten hyperphosphoryliert und initiiert die Bildung von sogenannten Neurofibrillenbündeln oder „neurofibrillar tangles“ (NFT).

Der zweite und weitaus größere Forschungszweig befaßt sich mit der Amyloid-Hypothese, also der Analyse des „Amyloid precursor protein“ (APP), welches nach enzymatischer Spaltung ein 4 kDa kleines Peptid, das β -Amyloid ($A\beta$), freisetzt. Dieses wiederum kann extrazellulär akkumulieren und aggregieren und so zur Bildung von senilen Plaques führen. Ablagerungen dieser Art führen zum Absterben und Verlust von Neuronen und Synapsen hauptsächlich im Neokortex und Hippocampus aber auch in anderen Hirnregionen.

Der Weg des APP hin zu amyloiden Plaques, einschließlich der dabei stattfindenden Prozessierungen, wird als Amyloid-Hypothese bezeichnet.

Die AK ist eine komplexe und genetisch heterogene Krankheit. Verursacht durch strukturelle Abnormalitäten im Gehirn, begleiten die Patienten progressiver Gedächtnisverlust, kognitive Beeinträchtigungen und Persönlichkeitswandel. Das Demenzrisiko steigt mit zunehmendem Lebensalter drastisch an. Derzeit leiden etwa 15 Millionen Menschen weltweit an der AK. Die Diagnose einer wahrscheinlichen AK kann nur mit 90 %iger Sicherheit durch klinische und psychologische Untersuchungen gestellt werden. Eine eindeutige Diagnose ist bisher jedoch nur durch eine histologische Hirnuntersuchung zu stellen (Jellinger, 2005).

Man klassifiziert die AK nach ihrem Auftreten. Es existiert die familiäre Form, als vererbare, die bei mehreren Familienmitgliedern auftreten kann. Ihr gegenüber steht die sporadische Form, die zufällig auftritt und nicht vererbt wird. Bei nur etwa 5 % der Patienten ist die Krankheit familiär bedingt, bei dem weitaus größeren Anteil (95 %) tritt die Krankheit sporadisch auf. Darüber hinaus kategorisiert man die AK nach dem Alter des Auftretens. Sind typische Merkmale vor dem Erreichen des 65. Lebensjahres eindeutig nachgewiesen, spricht man vom „early onset“ (früher Ausbruch). „Late onset“ (später Ausbruch) kennzeichnet die Alzheimer-Krankheit bei Patienten, welche die Symptome nach dem 65. Lebensjahr ausbilden (Jellinger, 2005).

1.3.1 Molekularer Hintergrund und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit

Grundlage der Amyloid-Hypothese ist die enzymatische Spaltung des APP (Kang et al., 1987). APP ist ein Transmembranprotein, welches in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird und zwei verschiedene Stoffwechselwege eingehen kann. Dabei unterscheiden sich die beiden Wege, nicht-amyloidogener und amyloidogener, in der doch sehr unterschiedlichen Funktion der Spaltprodukte: Neuroprotektion einerseits und Neurotoxizität andererseits.

Von geringerer Bedeutung für die Entwicklung der AK ist der nicht-amyloidogene Weg, da er überwiegend in nicht-neuronalen Zellen stattfindet und nicht zu den spezifischen APP-Proteolysen führt, die in der Ablagerung und Aggregation des β -Amyloids resultieren (Esch et al., 1990). Der amyloidogene Stoffwechselweg, vorrangig aktiv in neuronalem Gewebe, basiert auf der Spaltung von APP durch eine Kaskade von Enzymen. Dabei kommt es schließlich zur Freisetzung des 39 bis 43 Aminosäuren kurzen Peptids β -Amyloid (Glenner und Wong, 1984; Haass et al., 1992; Seubert et al., 1993).

1.3.1.1 „Amyloid Precursor Protein“ (APP)

APP zählt zu einer Proteinfamilie, die auch die APP-artigen Proteine APLP-1 und APLP-2 („Amyloid precursor-like protein“) umfaßt. Humanes APP lokalisiert auf dem Chromosom 21 und umspannt mit 19 Exons eine Länge von ca. 3600 Basenpaaren. APP, als Typ-1

Transmembranprotein, ist charakterisiert durch einen extrazellulären Aminoterminus, einen Transmembranbereich und einen intrazellulären Carboxyterminus (Kang et al., 1987).

Struktur

APP baut sich aus 9 unterschiedlichen Domänen auf (Abbildung 3). Beginnend vom Aminoterminus trägt APP eine „growth factor-like domain“ (GFLD), eine „Copper binding domain“ (CuBD), zusammen auch als E1-Region bezeichnet, sowie eine „acidic domain“. Dieser folgt die „Kunitz-type protease inhibitor domain“ (KPI), die nur in der APP-Isoform 770 und 751 vorliegt. Daran schließt sich eine spezifische Aminosäuresequenz (Arginin, Glutamin, Arginin, Methionin, Serin - RERMS-Sequenz) und die „central APP domain“ (CAPPD) an. Diese beiden werden auch als E2-Region bezeichnet. Die „linker domain“ bildet zusammen mit der E2-Region die „carbohydrate domain“. Und schließlich besitzt APP einen Transmembranbereich, wie auch eine intrazelluläre Domäne („APP intracellular domain“ - AICD) (Reinhardt et al., 2005).

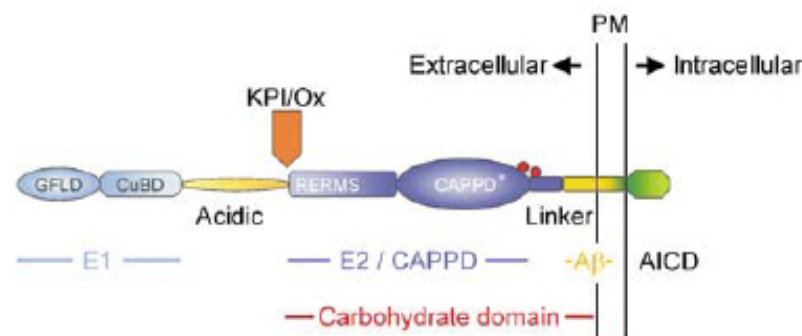


Abbildung 3 Schematische Darstellung des APP. Die E1-Region besteht aus der n-terminalen „growth factor-like domain“ (GFLD) und der „Copper-binding domain“ (CuBD). Sie ist über eine saure Sequenz („acidic domain“) mit der „carbohydrate domain“ verbunden, welche sich zusammensetzt aus der E2-Region oder „central APP domain“ (CAPPD), einer spezifischen Aminosäuresequenz (Arginin, Glutamin, Arginin, Methionin, Serin – RERMS) und einem Verbindungsstück („linker domain“), dem schließt sich der Transmembranbereich und die „APP intracellular domain“ (AICD) an. Die „Kunitz-type protease inhibitor domain (KPI) ist nur in der Isoform 751 und 770 vorhanden. Die Ox-Sequenz findet man nur in der Isoform 770 (modifiziert aus Reinhardt et al., 2005).

APP wird im amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg enzymatisch gespalten. Beide Prozessierungswege finden im gesunden Organismus statt und werden im folgenden näher beschrieben. Mechanismen, die der Entscheidung zugrunde liegen, welcher Weg eingeschlagen wird, sind bisher noch nicht eindeutig geklärt.

1.3.1.2 Der amyloidogene Stoffwechselweg

Geht APP den amyloidogenen Weg, so wird es nach Synthetisierung im endoplasmatischen Retikulum (ER) und posttranslationaler Modifikation (N- und O-Glykosylierung) im ER und Golgi-Apparat über den sekretorischen Weg an die Zellmembran transportiert (Abbildung 4). In Neuronen wandert APP über den axonalen Transport zu den präsynaptischen Nervenendigungen. An der Zellmembran angelangt, kann APP über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert und innerhalb des endosomalen bzw. lysosomalen Signalweges degradiert werden (Golde et al., 1992).

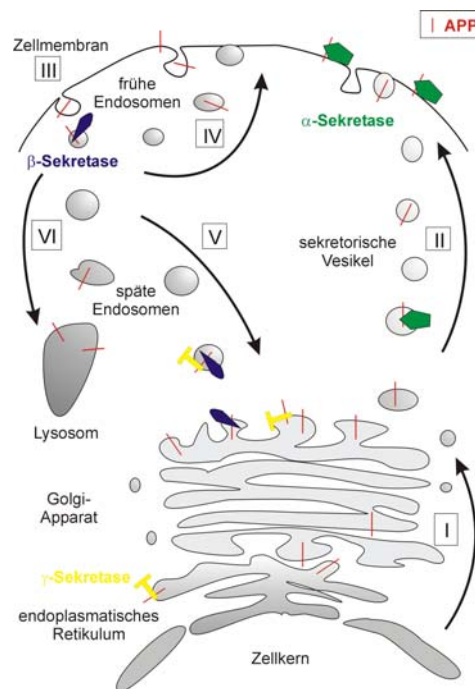


Abbildung 4 Die Lokalisation der APP-Prozessierung innerhalb der Zelle. Nach Reifung (Glykosylierung) im ER und Golgi-Apparat (I) wird APP an die Zellmembran transportiert (II) und kann an der Zellmembran (zum geringen Teil auch auf dem sekretorischen Weg) durch die α -Sekretase proteolytisch gespalten werden. Der enzymatischen Spaltung durch die β -Sekretase geht die Internalisierung von APP voraus (III). Vorwiegend in sauren Kompartimenten (Endosomen, TGN) ist die β -Sekretase aktiv und spaltet APP zu sAPP β und CTF β .

Hohe γ -Sekretaseaktivität, welche das CTF β in β -Amyloid und CTF γ spaltet, liegt in späten Endosomen, im TGN aber auch im ER vor. Weitere APP-Transportwege beinhalten den Recyclingschritt (IV) des membranständigen APP, den retrograden Transport (V) hin zum TGN und den Weg in Protein-abbauende Lysosomen (VI) (modifiziert aus Vetrivel und Thinakaran, 2006).

Erst nach Internalisierung wird APP von einer Aspartylprotease (Asp2) geschnitten. Dieser Schritt findet vorwiegend in sauren Kompartimenten (Endosomen, *trans*-Golgi-Netzwerk) (Yan et al., 2001), zu einem geringen Teil aber auch an der Zelloberfläche statt (Huse et al., 2000). Die Spaltung von APP durch diese Protease, auch genannt „ β -site APP cleaving enzyme“ (BACE) oder „membrane anchored protease of the pepsin family“ (memapsin2), setzt das extrazellulär sezernierte sAPP β und das intrazelluläre c-terminale Fragment CTF β (auch C99) frei (Abbildung 5).

CTF β ist wiederum Substrat für ein weiteres Enzym, die γ -Sekretase. Die γ -Sekretase ist ein Komplex aus 4 Proteinen, den Presenilinen, dem Nicastrin, dem „presinilin enhancer“ (Pen2) und dem „anterior Pharynx defective homolog“ (Aph1), die vorwiegend in späten Endosomen, im TGN und zum Teil im ER aktiv ist (de Strooper 2003). Die Proteolyse des CTF β setzt sowohl das β -Amyloid Peptid (A β) wie auch das c-terminale Fragment γ (CTF γ) frei (Haass und Selkoe, 1993). β -Amyloid variiert in der Länge zwischen 39 und 43 Aminosäuren, wobei A β ₄₀ und A β ₄₂ am häufigsten vorkommen. Erst die extrazelluläre Sezernierung des β -Amyloidpeptids bahnt den Weg zur Ausbildung der Alzheimer-Krankheit. β -Amyloid-Plaques sind neurotoxisch und führen zur Apoptose der angrenzenden Neuronen. Dies wiederum bewirkt partiell den Ausfall der betroffenen Gehirnbereiche (Yankner et al., 1989; Behl et al., 1994; Takadera et al., 1993). Noch nicht gänzlich geklärt ist, worauf die neurotoxische Wirkung basiert. Erste Untersuchungen belegen aber, daß der Effekt weniger aufgrund der unlöslichen Fibrillen zustande kommt, sondern vielmehr aufgrund der löslichen β -Amyloid-oligomeren Intermediate (Hardy and Selkoe, 2002; Kawasumi et al., 2002; Walsh et al., 2002).

1.3.1.3 Der nicht-amyloidogene Stoffwechselweg

Die Proteolyse von APP durch Mitglieder der Genfamilie der „a disintegrin and metalloprotease“ (ADAM) eröffnet den nicht-pathogenen oder auch nicht-amyloidogenen Weg. Proteasen der ADAM-Genfamilie (ADAM9, -10, -17) spalten APP vorrangig an der Plasmamembran. Das heißt, nachdem APP den Golgi-Apparat verlassen und über sekretorische Vesikel die Zellmembran erreicht hat, steht es der Proteolyse durch diese Proteasen, bezeichnet auch als α -Sekretase, zur Verfügung.

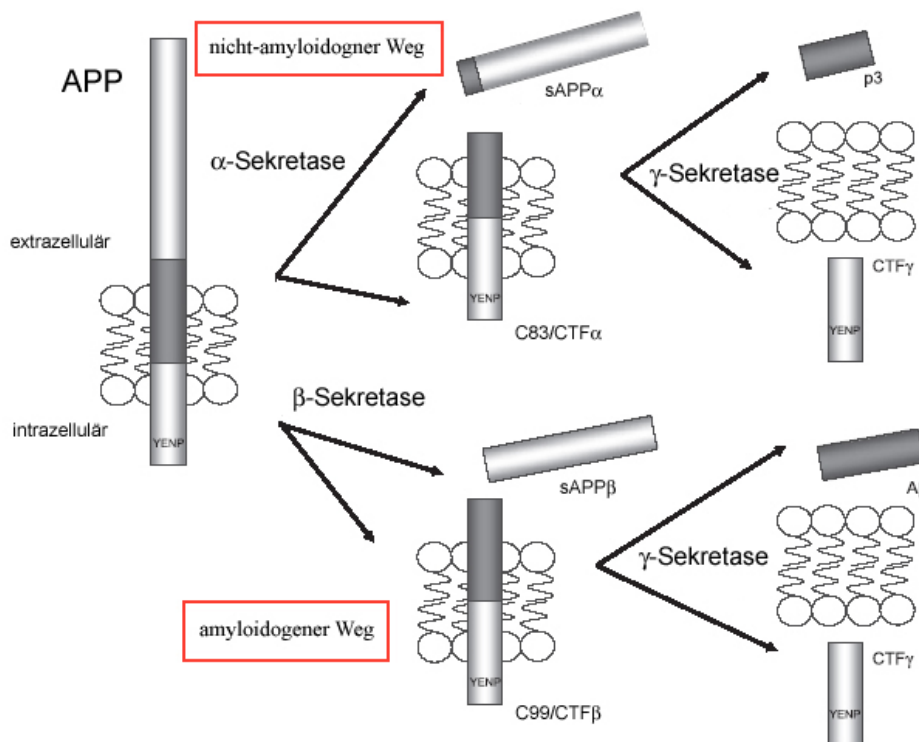


Abbildung 5 APP-Prozessierung über den nicht-amyloidogenen und amyloidogenen Weg. Der nicht-amyloidogene Weg beschreibt die enzymatische Spaltung von APP durch die α -Sekretase mit den Spaltprodukten sAPP α und C83 (oder c-terminales Fragment α -CTF α). Die Spaltung von C83 durch die γ -Sekretase führt zur Freisetzung von p3 und CTF γ . Der amyloidogene Weg führt zur Proteolyse von APP durch die β -Sekretase und den Produkten APP β und C99 (CTF β). Eine weitere Proteolyse des C99 durch die γ -Sekretase resultiert in der Bildung von β -Amyloid (A β) und CTF γ (modifiziert aus King und Turner, 2004).

Die α -Sekretase schneidet APP im extrazellulären Bereich, direkt innerhalb der Amyloid-Sequenz und verhindert somit die enzymatische Spaltung von APP zu β -Amyloid (Esch et al., 1990; Wang et al., 1991).

Produkte dieses ersten Schrittes des nicht-amyloidogenen Weges sind das extrazellulär sezernierte, lösliche Protein „ α APPsecreted“ (α APPs) oder auch sAPP α und das membranverankerte intrazelluläre c-terminale Fragment α (CTF α oder C83) (Abbildung 5) (Weidemann et al., 1989; Selkoe et al., 1989). Das verbleibende CTF α kann durch die γ -Sekretase weiter proteolysiert werden, welche wiederum ein 3 kDa kleines Peptid, das p3, und das CTF γ freisetzt (Haass et al., 1992 und 1993; Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992).

Der eher Neuron-schützende Effekt des nicht-amyloidogenen Weges beruht auf dem Spaltprodukt sAPP α . Dieses wirkt neuroprotektiv und fördert die Erinnerungsleistung (Smith et al., 1994; Roch et al., 1994; Furukawa et al., 1996; Meziane et al., 1998; Mattson et al., 1999).

1.3.1.4 Risikofaktoren

Verschiedene Einflußfaktoren können eine verstärkte Prozessierung über den amyloidogenen Weg bewirken und so das Risiko die Alzheimer-Krankheit zu entwickeln erhöhen. Zu den Risikofaktoren zählen bisher über 20 Mutationen in der Sequenz des APP und über 160 verschiedene Mutationen in den Presenilinen, die Bestandteile des γ -Sekretase-Komplexes sind (vollständige Literaturliste unter www.alzforum.org).

Mutationen der APP-Sequenz im Bereich der β -Sekretasenschnittstelle führen z. Bsp. zu einer höheren Gesamtmenge an β -Amyloid (Irie et al., 2005). Viele Mutationen im Bereich der γ -Sekretasenschnittstelle wirken sich hingegen auf das Verhältnis von β -Amyloid₄₀ zu β -Amyloid₄₂ aus und verschieben es zu mehr A β ₄₂ (Ancolio et al., 1999; Makrarova et al., 2004). Dies ist insofern problematisch, da daß β -Amyloid₄₂ deutlich stärker dazu neigt, Aggregate und somit Plaques zu bilden.

Einige Mutationen innerhalb der β -Amyloidsequenz wirken sich hingegen nicht auf das β -Amyloid₄₂ aus, sondern betreffen das β -Amyloid₄₀. Sie verstärken z. Bsp. das Aggregationsverhalten des β -Amyloid₄₀ (Irie et al., 2005)

Interessant ist auch die Rolle von Apolipoprotein-E (ApoE). ApoE wird neben der Leber auch im Gehirn synthetisiert und spielt eine wesentliche Rolle beim Transport und Stoffwechsel von Lipiden. Es existieren 3 Isoformen des Proteins: E2, E3 und E4, die durch die drei

verschiedenen Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ codiert werden und involviert sind in Prozesse der neuronalen Regeneration. ApoE4 kann β -Amyloid binden und wurde in β -Amyloid-Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten nachgewiesen (Strittmatter et al., 1993a). Es zählt daher zu den Risikofaktoren, obwohl es zwar nicht die β -Amyloid-Produktion beeinflusst, verstärkt es aber die Bildung der β -Amyloid-Plaques (Strittmatter et al., 1993b). Dabei ist die Wirkung Gen-Dosis abhängig, was bedeutet, daß das Risiko die AK auszubilden am größten ist, wenn das *apoE4*-Allel homozygot vorliegt (Hyman et al., 1996; Holtzman et al., 2000; Castano et al., 1995).

ApoE2 hat hingegen eine schützende Wirkung, es verringert das Risiko, die AK zu entwickeln bzw. verzögert das Auftreten der Krankheit (Corder et al., 1993 und 1994). Die molekulare Grundlage hierfür ist noch nicht hinreichend geklärt. Vermutungen gehen aber dahin, daß ApoE2, mehr als ApoE3 und ApoE4, eine protektive, antioxidative Wirkung hat, welche die Zellen möglicherweise vor Zerstörung durch freie Radikale schützt (Miyata und Smith, 1996).

1.3.1.5 Physiologische Rolle von APP

Bis heute gibt es keine hinreichenden Erkenntnisse über die physiologische Funktion des APP. Einige zum Teil sehr grundlegende potentiell APP-abhängige Mechanismen wurden vorgeschlagen und sind Bestandteil aktueller Forschung.

APP ist in die Entwicklung des Nervensystems involviert

APP wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Im Gehirn liegt in Neuronen hauptsächlich die Isoform APP₆₉₅ vor, wohingegen in anderen Geweben überwiegend die Isoformen APP_{751/770} exprimiert werden. Ein interessanter Hinweis auf die physiologische Rolle von APP im Gehirn stammt aus der Analyse von Mausmodellen. Studien an Mäusen, die gendefizient waren für entweder *app*, *aplp1* oder *aplp2*, zeigten nur geringe neurologische Abnormalitäten gegenüber den Kontrolltieren. Ebenso Mäuse, die defizient waren für beide Gene (*app* und *aplp1*). Dagegen starben bereits früh nach der Geburt Tiere, die eine kombinierte Gendefizienz mit *aplp2* aufwiesen (*app*^{-/-}/*aplp2*^{-/-} oder *aplp1*^{-/-}/*aplp2*^{-/-}). Eine erst

kürzlich publizierte Studie über Mäuse, die defizient waren für alle 3 Mitglieder der APP-Genfamilie, belegt eine sehr frühe Lethalität der Tiere. Die Mäuse wiesen kortikale Fehlbildungen auf, darunter Lissenzephalie und neuronale Migrationsdefizite (Herms et al., 2004). Dies läßt auf eine essentielle Funktion von APP und seiner Homologen in der frühen Entwicklung schließen (Zheng et al., 1995; Koch et al., 1997; Dawson et al., 1999; Heber et al., 2000).

Darüber hinaus ist APP offensichtlich in die Genesung des Gehirns nach traumatischem Streß involviert. Leyssen et al. (2005) konnten in der Fruchtfliege zeigen, daß APP und das homologe Protein der Fruchtfliege (APPL) die Verzweigung der Axone unterstützen. Dies untermauert die schon vorher gestellte Hypothese (Jellinger, 2004; Ikononovic et al., 2004), daß APP eine wesentliche Rolle bei der Genesung nach traumatischen Gehirnverletzungen spielt. Im Gehirn von Gehirntraumapatienten, wie auch im entsprechenden Tiermodell, wurden verstärkt β -Amyloid/ApoE-Ablagerungen und eine sehr hohe APP-Expression nachgewiesen.

Zellmigration, Signaltransduktion und Zelladhäsion sind APP-abhängig

Den Beweis der APP-abhängigen Zellmigration erbrachten Sabo et al. (2001). Sie beobachteten im Zellkulturmodell, daß eine Überexpression von APP und des Adapterproteins Fe65 zu höherer Zellbeweglichkeit führte. Sabo et al. postulieren, daß APP Einfluß auf die Zellmigration hat, da APP über Fe65 in Verbindung mit dem Protein Mena steht, welches wiederum an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist.

Hinweise auf eine Rolle von APP in der Signaltransduktion sind gegeben durch Interaktionspartner, die mit Prozessen der Signalweiterleitung in Verbindung stehen. Hierzu zählen Disabled-1 (Dab1), Fe65 und X11/Mint1 (Homayouni et al., 1999; McLoughling und Miller, 1996)

Offensichtlich spielt APP auch bei der zellulären Adhäsion eine nicht unwesentliche Rolle. Dies wird gestützt durch Arbeiten, welche die Interaktion mit Adhäsionsproteinen wie Integrinen auf der Zelloberfläche von Axonen beobachteten oder die Bindung mit Matrixmolekülen wie Laminin nachwiesen (Storey et al., 1996; Fossgreen et al., 1998).

APP ist an axonalen Transportprozessen beteiligt

Daß APP über den axonalen Transport anterograd zu den Nervenendigungen transportiert wird, konnte in *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt werden (Koo et al., 1990). APP stellt dabei ein Bindeglied zwischen dem Motorprotein Kinesin und Transportvesikeln dar (Kamal et al. 2001). Dabei erfolgt die Bindung zwischen APP und Kinesin entweder direkt (Kamal et al. 2000) oder über Adaptoren wie z. Bsp. das „Jun n-terminal kinase (JNK) interacting protein“ (JIP-1) (Inomata et al., 2003; Matsuda et al., 2001 und 2003; Scheinfeld et al., 2002). Dieser Transport von APP zu präsynaptischen Nervenendigungen konnte im optischen Nerv der Ratte demonstriert werden (Morin et al., 1993). APP könnte insofern eine Funktion als Kinesin-Frachtrezeptor besitzen und so für den Transport von Vesikeln und der darin enthaltenen Proteine notwendig sein (Gunawardena und Goldstein, 2001).

Weitere APP-Interaktionspartner

Ho et al. (2004) wiesen nach, daß das Signalmolekül F-Spondin, welches involviert ist in Prozesse der neuronalen Differenzierung der Dorsal-Root-Ganglion-Zellen (DRG) (Klar et al., 1992) und in Prozesse der Neurogenese (Feinstein et al., 1999), an der CAPPD bindet und so die Interaktion bzw. enzymatische Spaltung von APP durch BACE inhibiert. Dies läßt die Vermutung zu, daß APP als Transmembranrezeptor für F-Spondin agiert.

Interaktionen der extrazellulären Proteine Fibulin-1 und „heparin sulfate proteoglycans“ (HSPG) an der E1-Region von APP inhibieren zum einen die proliferierende Wirkung von APP (Ohsawa et al., 2001), zum anderen stimulieren sie die Wirkung von APP auf das Auswachsen der Neuronen (Small et al., 1999).

Eine Reihe verschiedener Adapterproteine wie die Genfamilie der Fe65-Proteine, das JIP-1b und Dab1 tragen eine „phosphotyrosine-interacting domain“ (PID), mit der sie an der Aminosäuresequenz „YENPTY“ im c-terminalen Bereich von APP binden und dadurch die Translokation und Prozessierung von APP beeinflussen können.

Die Interaktion von Fe65 oder dessen Homologen „Fe65-like 1“ (Fe65L1) oder Fe65L2 mit APP führte zu vermehrter Translokation von APP an die Zellmembran und zu verstärkter γ -Sekretase-Aktivität und damit zu erhöhter A β -Sekretion (Sabo et al., 1999; Chang et al.,

2003). Die Fe65-Proteine mit ihren 3 verschiedenen Bindungsdomänen können aber auch als Vermittlungsglied zwischen APP und weiteren Proteinen fungieren.

Die Stabilisierung des unreifen APP, eine geringere APP-Prozessierung und damit eine verminderte Sekretion von sAPP und β -Amyloid hat die Interaktion von JIP-1b mit APP zur Folge (Taru et al., 2002). Binden hingegen APP und mammalian-Dab1 (mDab1), so nimmt die Menge an intrazellulärem reifem APP zu, aber auch die Sekretasen-Aktivität und die Verteilung von APP an der Zelloberfläche nimmt zu (Trommsdorff et al., 1998; Howell et al., 1999).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine mögliche physiologische Funktion von APP sehr vielschichtig sein kann. Zellmigration und -adhäsion, sowie Prozesse der Signaltransduktion sind APP-abhängig. Aber auch die Entwicklung und Ausbildung des Nervensystems unterliegt der APP-Regulation. Dabei ist für die Funktion von APP die Interaktion mit weiteren Proteinen bzw. Adaptern von wesentlicher Bedeutung und diese ist wiederum eng verbunden mit veränderter Lokalisation bzw. mit verändertem APP-Transport. Basierend auf der Lokalisation der Sekretasen in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, bewirkt ein Eingriff in den APP-Transport oft eine veränderte Prozessierung des Proteins und betrifft so auch die Bildung der APP-Spaltprodukte (sAPP, β -Amyloid).

Die Relevanz der Sortierung von APP für dessen Prozessierung ließ die Vermutung zu, daß der Sorting-Rezeptor SorLA möglicherweise am gerichteten Transport von APP beteiligt ist und daß durch die Abwesenheit von SorLA ein wesentlicher Eingriff in die APP-Prozessierung stattfindet.

1.4 Ziel der Dissertation

Die bisher publizierten Studien, das Expressionsprofil, wie auch die intrazelluläre Lokalisation von SorLA weisen deutlich auf eine physiologische Rolle hin, welche die Sortierung von intrazellulären Vesikeln bzw. von Proteinen betrifft. Trotz vieler bekannter Liganden ist die Funktion dieses Rezeptors weitestgehend unbekannt. Aufgabe meiner Doktorarbeit war es, die Funktion und physiologische Rolle dieses Vps10p-Rezeptors näher zu charakterisieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Interaktion von SorLA mit APP untersucht und die Relevanz bei dessen Prozessierung als Wegbereitung für die Ausbildung der Alzheimer-Krankheit näher betrachtet werden. Dies sollte *in vitro* anhand von Protein-Protein-Bindungsstudien und Zellkulturmodellen erfolgen, sowie *in vivo* durch die Analyse der SorLA-gendefizienten Maus.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Rolle des SorLA-Rezeptors in der Niere analysiert werden. Basierend auf dem Expressionsprofil von SorLA in der Niere und der Tatsache, daß neben SorLA auch weitere Mitglieder der Vps10p-Rezeptorgenfamilie (Sortilin, SorCS1-3) in der Niere exprimiert sind, stellte sich die Frage, welche Funktion die Vps10p-Rezeptoren generell und SorLA im speziellen in der Niere übernehmen. Zur Beantwortung dieser Frage sollte die Lokalisation von SorLA in der Niere charakterisiert werden. Desweiteren sollte die Auswirkung von Streß auf physiologische Urin- und Blutwerte, sowie auf Hormone und Ionentransporter der Niere in SorLA-gendefizienten Mäusen analysiert werden.