

---

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut für Stoffwechselbiochemie der Ludwig-Maximilians  
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Christian Haass

# Struktur-Funktionsanalyse der BAR Domäne von Sorting Nexin 33

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bastian Dislich

aus Memmingen

2011

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Haass

2. Berichterstatter Prof. Dr. Jochen Herms

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dan Rujescu  
Prof. Dr. Christoph Schmitz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Stefan Lichtenthaler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung 12.05.2011

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Einleitung.....	8
1.1 Die Sorting Nexin Proteinfamilie.....	8
1.1.1 Generelle Einführung in die Sorting Nexin Proteinfamilie.....	8
1.1.2. Klassifikation der Sorting Nexine .....	8
1.2 Modularer Aufbau der SNX <sup>9/18/33</sup> Untergruppe.....	10
1.2.1 Die SH3 Domäne .....	11
1.2.2 Die PX Domäne .....	12
1.2.3 Die BAR Domäne .....	13
1.2.3.1 Allgemeine Merkmale von BAR Domänen.....	13
1.2.3.2 Klassifikation der BAR Domänen Superfamilie .....	15
1.2.3.3 Struktur und Eigenschaften der SNX9 PX-BAR Domäne .....	16
1.3 Funktion der SNX <sup>9/18/33</sup> Untergruppe.....	18
1.3.1 SNX9 .....	18
1.3.2 SNX18 .....	20
1.3.3 SNX33 .....	20
2. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	22
3. Material und Methoden .....	25
3.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken .....	25

3.1.1 Übersicht der verwendeten Plasmide und Oligonukleotide.....	25
3.1.2 Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) .....	30
3.1.3 Aufreinigung der PCR Fragmente aus Agarose .....	32
3.1.4 Subklonierung verschiedener cDNAs in Expressionsvektoren.....	32
3.1.5 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> (Stamm DH5 $\alpha$ ) und deren Transformation mit Plasmid-DNA.....	33
3.1.6 Herstellung von Plasmid-DNA im kleinen (Mini-Präparation) und großen (Maxi- Präparation) Maßstab.....	35
3.2 Zellkultur .....	35
3.2.1 Verwendete Zelllinien und Kulturmedien.....	35
3.2.2 Zellkultivierung.....	36
3.2.3 Transiente liposomale Transfektion mit Plasmid-DNA .....	36
3.2.4 Transienter „Knock-down“ von SNX33 mittels siRNA Oligonukleotiden.....	37
3.3 Proteinbiochemische Methoden .....	38
3.3.1 Herstellung von Zelllysaten.....	38
3.3.2 Immunpräzipitation .....	39
3.3.3 GST-„Pull down“-Assay .....	40
3.3.4 Immunfluoreszenz .....	41
3.3.5 Gelfiltration.....	43
3.3.6 TCA Fällung.....	43
3.3.7 Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE).....	44
3.3.8 Blue Native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN PAGE) .....	46
3.3.9 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Blau.....	48

3.3.10 Western Blot .....	48
3.3.11 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen durch Elektrosprayionisation	50
3.4 Herstellerverzeichnis .....	51
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
4.1. SNX33 Expressionsniveau .....	53
4.2 SNX33 ist Bestandteil eines höher molekularen Komplexes .....	57
4.3 Identifikation neuer SNX33 Interaktionspartner .....	60
4.4 Die N-terminale BAR Domäne vermittelt die Homodimerisierung von SNX33 .....	63
4.5 SNX33 $\Delta$ BARH3 wird vermutlich nicht phosphoryliert .....	66
4.6 SNX33 bildet keine Heterodimere mit anderen SNXen .....	67
4.7 Die SNX33 BAR Domäne bestimmt die Spezifität der SNX33-SNX33 Interaktion.....	69
4.8 Strukturelle Unterschiede zwischen den BAR Domänen von SNX33 und SNX9 verhindern eine Heterodimerisierung.....	70
4.9 Strukturelle Unterschiede zwischen den BAR Domänen von SNX33 und SNX18 verhindern eine Heterodimerisierung.....	77
4.10 Dissoziationskonstanten der (SNX33) <sub>2</sub> und SNX33-SNX9mod Dimere .....	79
4.11 Die Deformation der Plasmamembran durch SNX33 benötigt eine intakte BAR Domäne	80
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>86</b>
5.1 Funktionelle Gemeinsamkeiten von SNX33, SNX9 und SNX18.....	86
5.2 Die BAR Domäne ermöglicht die Homodimerisierung und verhindert die Heterodimerisierung von SNX33 .....	89
5.3 Redundante Mechanismen und funktionelle Unterschiede der SNX <sup>9/18/33</sup> Untergruppe.....	91

---

5.4 Ausblick .....	92
6. Zusammenfassung .....	93
7. Abkürzungsverzeichnis .....	95
8. Aminosäurecode .....	98
9. Literaturverzeichnis .....	99
10. Lebenslauf .....	110
11. Schriftenverzeichniss .....	111
12. Danksagung .....	112
13. Publikationen .....	113

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Bastian Dislich**, Manuel E Than and Stefan F Lichtenthaler

*Specific amino acids in the BAR domain allow homodimerization and prevent heterodimerization of sorting nexin 33. **Biochem. J.** (2010) 433(1):75 - 83*

Susanne Schöbel, Stefanie Neumann, Maren Hertweck, **Bastian Dislich**, Peer-Hendrik Kuhn, Elisabeth Kremmer, Brian Seed, Ralph Baumeister, Christian Haass,, Stefan F Lichtenthaler

*A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. **J. Biol. Chem** (2008) 283:14257-14268*

Diese Publikationen sind in der vorliegenden Arbeit im Anhang beigefügt.

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Sorting Nexin Proteinfamilie

### 1.1.1 Generelle Einführung in die Sorting Nexin Proteinfamilie

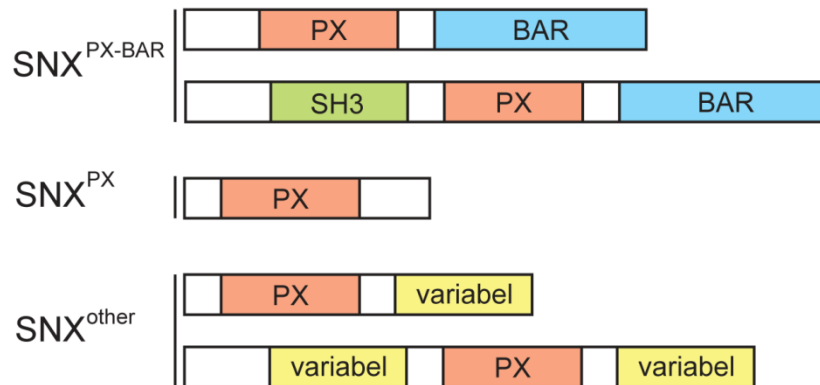
Als Sorting Nexine (SNXe) bezeichnet man eine diverse Gruppe zytosolischer und membranassoziierter Proteine, die durch das Vorhandensein einer Phosphatidylinositol (PI) -bindenden Domäne, der sogenannten Phox Homology (PX) Domäne, gekennzeichnet ist (1-5). Diese Domäne ermöglicht die Interaktion mit verschiedenen PI-Phosphaten (PtdInsPs) und damit das Rekrutieren dieser Proteine an spezifische zelluläre Membranen (1; 6). Die charakteristische PX Domäne der SNXe wird dabei als SNX-PX Domäne bezeichnet (1). Zusätzlich enthalten SNXe weitere Protein-Lipid- und Protein-Protein Interaktionsdomänen, um selektiv andere Proteine zu binden und höher-molekulare Komplexe zu bilden (2-4). Die Kombination dieser beiden Eigenschaften, spezifisch zelluläre Membranen zu erkennen und zeitgleich Verbindungen mit anderen Proteinen einzugehen, schafft so die Grundvoraussetzung für die Beteiligung der SNXe an zellulären Sortier- und Signalprozessen (3; 6). SNX1, das erste beschriebene Mitglied der SNX Familie, wurde erstmals 1996 in einem Hefe-two-Hybrid Screen als neuer Interaktionspartner des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR; epidermal growth factor receptor) identifiziert (7). Seitdem wurde diese Proteinfamilie in verschiedensten Spezies, von *Saccharomyces cerevisiae* bis hin zu Säugetieren, beschrieben. In Säugern wurden bis heute 33 verschiedene SNXe identifiziert (6).

### 1.1.2. Klassifikation der Sorting Nexine

Die Einteilung der SNXe basiert auf ihrem modularen Aufbau aus unterschiedlichen Domänen (1; 6). Hiernach werden drei Subfamilien von SNXen unterschieden: SNX1, SNX2, SNX4, SNX5, SNX6, SNX7, SNX8, SNX9, SNX18, SNX30, SNX32, SNX33 enthalten eine C-terminale BAR (Bin, amphiphysin, Rvs) Domäne. Diese Gruppe wird daher als SNX<sup>PX-BAR</sup> bezeichnet. BAR Domänen vermitteln die Dimerisierung zwischen zwei Proteinen und können durch Assoziation mit zellulären Membranen deren Krümmungsradius messen und diesen verändern

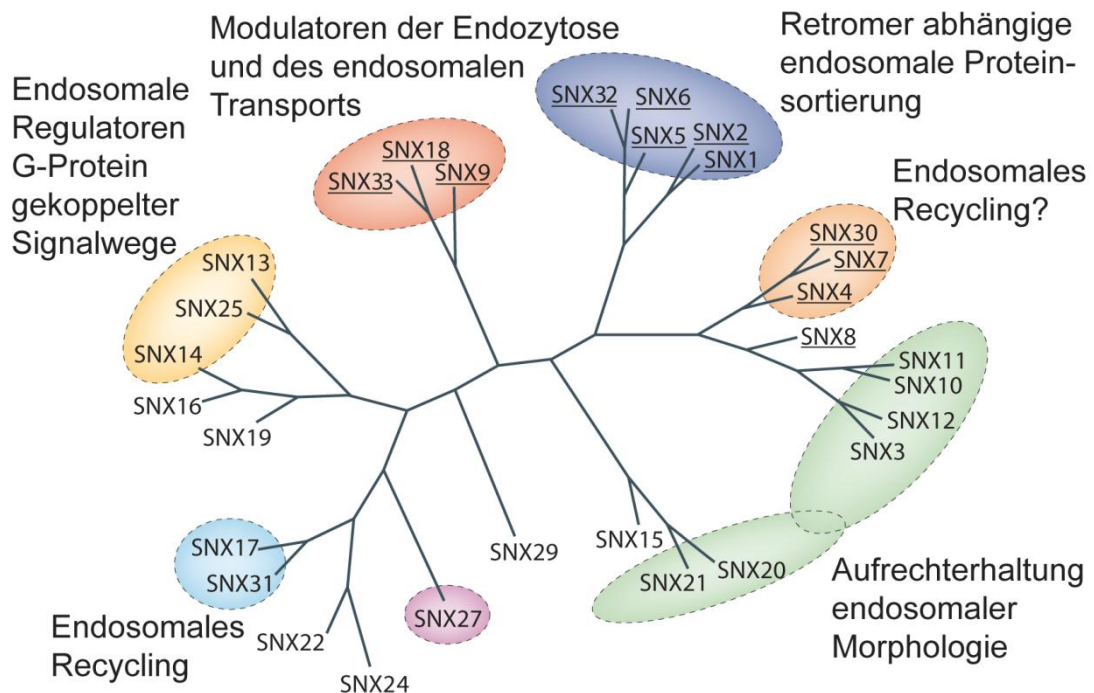


(1; 8; 9). SNX3, SNX10, SNX11, SNX12, SNX16, SNX20, SNX21, SNX22, SNX24, SNX29 enthalten lediglich eine isolierte SNX-PX Domäne, daher die Bezeichnung als SNX<sup>PX</sup> (6). Die übrigen SNXe, SNX<sup>other</sup>, enthalten zusätzlich zur SNX-PX Domäne weitere Protein-Protein- sowie Protein-Lipid Interaktionsdomänen (Abbildung 1) (1; 3).



**Abbildung 1: Klassifikation der SNXe nach ihrer Domänenstruktur** Einteilung der SNX Proteinfamilie in drei Gruppen. Die SNX<sup>PX-BAR</sup> Gruppe enthält neben der SNX-PX Domäne die BAR Domäne und fakultativ eine SH3 Domäne. Mitglieder der SNX<sup>PX</sup> Gruppe enthalten lediglich eine isolierte SNX-PX Domäne. Alle anderen SNXe werden als SNX<sup>other</sup> bezeichnet und enthalten neben der SNX-PX Domäne eine oder mehrere Protein-Protein- beziehungsweise Protein-Lipid-Interaktionsdomänen (als „variabel“ gekennzeichnet).

Die Subfamilie der SNXe mit BAR Domäne, SNX<sup>PX-BAR</sup>, wird nochmals in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt, wobei die Klassifikation hier sowohl auf phylogenetischen als auch auf funktionellen Kriterien basiert (10). SNX4 (und möglicherweise SNX7 und SNX30) spielen eine Rolle im endosomalen Recycling. SNX1, SNX2, SNX5, SNX6, SNX8 (und möglicherweise SNX32) sind an der Retromer-abhängigen Sortierung von Proteinen und somit am Proteintransport vom Endosom zum Trans-Golgi Netzwerk (TGN) beteiligt (6; 10). SNX9, SNX18 und SNX33 besitzen alle eine N-terminale Src homology 3 (SH3) Domäne und sind an der Regulation der Endozytose und des endosomalen Proteintransports beteiligt (11; 12). Abbildung 2 zeigt eine phylogenetische Einteilung der SNXe basierend auf der jeweiligen Aminosäuresequenz sowie eine funktionelle Gruppierung anhand ihrer Beteiligung an zellulären Transport-, Sortier- und Signalprozessen.

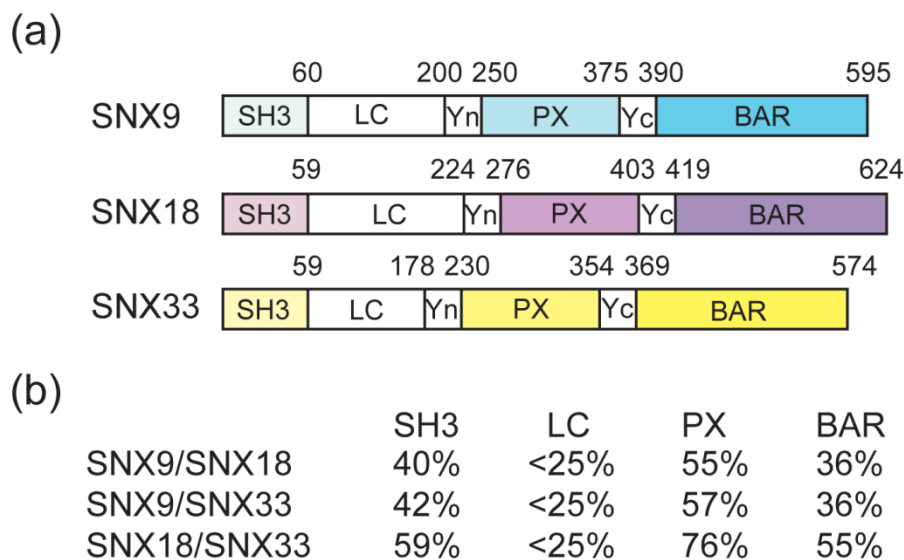


**Abbildung 2: Übersicht bekannter Sorting Nexine in Säugetieren** Phylogenetische Einteilung der 33 bekannten Sorting Nexine. Zusätzlich erfolgte eine funktionelle Gruppierung anhand experimentell gewonnener Daten. Alle Sorting Nexine innerhalb einer funktionellen Untergruppe wurden dabei mit einem gemeinsamen Farbton hinterlegt. Abbildung modifiziert nach (6).

## 1.2 Modularer Aufbau der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe

SNX9, SNX18 und SNX33 stellen eine Untergruppe der SNX-BAR Proteine dar, fortan als SNX<sup>9/18/33</sup> bezeichnet, und weisen den gleichen modularen Aufbau auf (10; 11). Sie bestehen aus einer N-terminalen SH3 Domäne, welche ein Protein-Protein Interaktionsmotiv darstellt, das bei vielen Proteinen die Interaktion mit prolinreichen Sequenzen vermittelt (13-15). Es folgt eine Domäne variabler Länge mit relativ geringer Komplexität, welche daher als Low-Complexity (LC) Domäne bezeichnet wird (11; 16; 17). Es schließen sich die SNX-PX Domäne sowie die C-terminale BAR Domäne an (12). Die SNX-PX Domäne bildet zusammen mit der BAR Domäne eine funktionelle Untereinheit, welche durch eine zusätzliche Domäne stabilisiert wird. Diese Domäne wird als Yoke (Y)-Domäne bezeichnet und besteht aus einem N- und C-terminalen Anteil (Y<sub>n</sub> und Y<sub>c</sub>) (11; 18). Ein Vergleich der Primärstruktur innerhalb dieser SNX Untergruppe zeigt vor allem in den komplexen SH3, PX und BAR Domänen eine relativ hohe Konservierung identischer

Aminosäuren (bis zu 76% der PX Domäne zwischen SNX18 und SNX33 sind identisch). Im Gegensatz dazu ist die LC Domäne mit ihrer geringen Komplexizität und weniger als 25% identischen Resten schwächer konserviert (Abbildung 3). Der Vergleich der Primärstrukturen erlaubt Rückschlüsse auf die Evolution der SNXe<sup>9/18/33</sup>, in der sich zunächst ein gemeinsamer Vorläufer von SNX9 abgespalten und dann in SNX18 und SNX33 entwickelt hat (11). Es folgt eine generelle Beschreibung der einzelnen Domänen dieser SNX Untergruppe, um dann im Anschluss näher auf die Funktion der einzelnen Mitglieder einzugehen.



**Abbildung 3: Die SNX9 SNX18, SNX33 Untergruppe (a)** Modularer Aufbau der Sorting Nexine 9, 18 und 33. Die Zahlen über den Schemata entsprechen der jeweils letzten Aminosäure der vorangehenden Domäne. **(b)** Paarweise Gegenüberstellung identischer Aminosäurereste der einzelnen Domänen. Abbildung modifiziert nach (11).

### 1.2.1 Die SH3 Domäne

SH3 Domänen gehören zu den am weitesten verbreiteten Protein-Protein Interaktionsdomänen in Eukaryoten, im menschlichen Genom sind mehr als 400 Kopien dieser Domänenstruktur kodiert (19). Die 50-70 Aminosäuren langen Domänen erkennen prolinreiche Sequenzen (daher auch als prolinreiche Domänen bezeichnet, PRD) in ihren jeweiligen Zielproteinen, wobei häufig das Sequenzmotiv PXXP erkannt wird (20). Mittlerweile sind jedoch auch zahlreiche SH3 Domänen beschrieben, die spezifisch an Peptidsequenzen ohne PXXP-Motiv binden (21; 22). SH3 Domänen zeigen in vielen Fällen ein sogenanntes promiskuitives

Bindungsverhalten, was einen hochvariablen Einsatz nach den vorherrschenden räumlichen und zeitlichen Gegebenheiten erlaubt. Mit diesem Verhalten wird zum Ausdruck gebracht, dass einzelne Domänen verschiedene Zielsequenzen erkennen können. Im Umkehrschluss gibt es jedoch auch Zielsequenzen, die von unterschiedlichen SH3 Domänen erkannt werden (23). Die Vielfalt, Flexibilität und hohe Verfügbarkeit dieser modularen Protein-Protein Interaktionsdomänen erklärt die große Anzahl an zellulären Prozessen, welche in eukaryotischen Zellen durch SH3 Domänen vermittelt werden. So werden Enzyme und nicht-katalytische Proteine über intramolekulare Interaktionen reguliert, indem durch eine Interaktion zwischen der SH3 Domäne und einem räumlich benachbartem PXXP Motiv katalytische Zentren oder Andockstellen für weitere Proteine maskiert werden (24; 25). Durch intermolekulare Interaktionen vermitteln SH3 Domänen gezielt die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen, die Assemblierung größerer Proteinkomplexe und regulieren so die lokale Konzentration und subzelluläre Lokalisation ihrer Bindungspartner (13). Die Modulation von Signaltransduktionskaskaden, die Organisation und Dynamik des Zytoskeletts, die Regulation der Endozytose und eine funktionierende angeborene Immunantwort sind zusammen mit zahlreichen weiteren biologischen Prozessen ohne SH3 Domänen nicht denkbar (13; 26-29).

### 1.2.2 Die PX Domäne

Phox (phagozytische Oxidase) Homology Domänen vermitteln neben PH, FYVE, ENTH und weiteren Domänen Protein-Lipid Interaktionen (30). Die PX Domäne wurde zuerst als Bestandteil der P40phox und P47phox Domänen der NADPH Oxidase beschrieben (31; 32). Verschiedene PX Domänen sind in Säugern bekannt, darunter 33 Proteine mit PX Domänen in der Kategorie der SNXe. Alle anderen PX Domänen werden in einer separaten Gruppe zusammengefasst, welche die Untereinheiten der NADPH Oxidase, der Phosphatidylinositol 3 Kinase und der Phospholipase D enthält (1; 30). Die Protein-Lipid Interaktion findet dabei mit verschiedenen PtdInsPs statt, welche phosphorylierte Derivate der PIs darstellen. PI stellen mit 0.5-1% einen verhältnismäßig nur sehr geringen Anteil der Phospholipide auf der Innenseite eukaryotischer Membranen dar (33). Ihre subzelluläre Lokalisation und ihr Phosphorylierungszustand an bis zu 3 von 5 Hydroxylgruppen unterliegt einer starken Regulation (1). Da einzelne PX Domänen bevorzugt an unterschiedliche

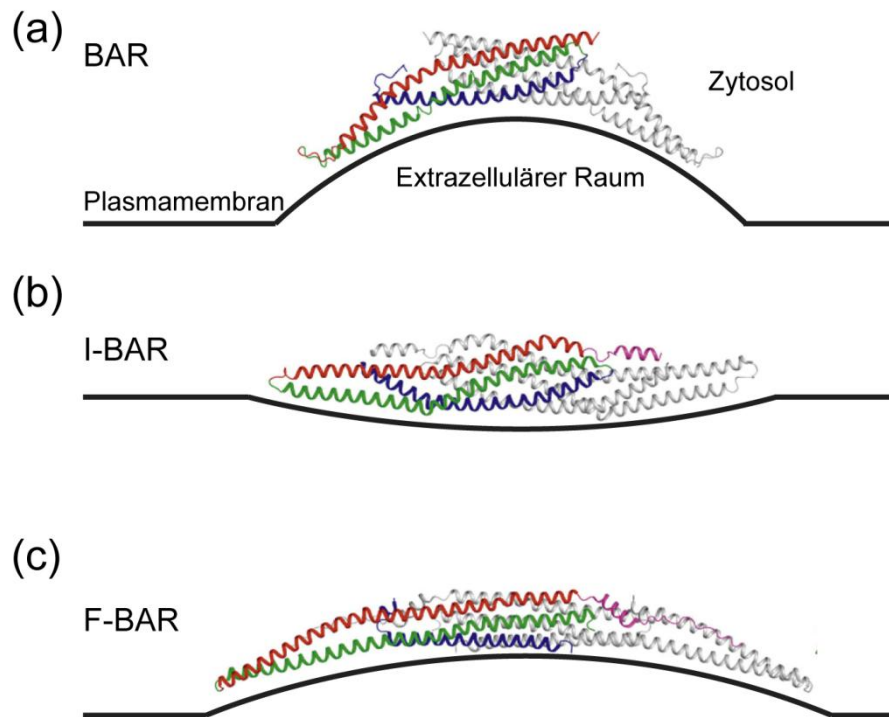
PtdInsP Spezies binden, können so ausgestattete Proteine an genau definierte Bereiche innerhalb einzelner Membranen rekrutiert werden können. So stellt zum Beispiel PtdInsPs(4,5)P<sub>2</sub>, welches vor allem an der Plasmamembran zu finden ist, ein wichtiges Lokalisierungssignal für endozytotische Adapterproteine wie Dynamin dar (34). Neben Protein-Lipid Interaktionen wird auch eine Beteiligung der PX Domäne an Protein-Protein Interaktionen diskutiert. Viele dieser Domänen besitzen ein PXXP Sequenzmotiv, welches als Grundlage für eine SH3 Domänen vermittelte Interaktion dienen kann (31). Die SNX-PX Domäne besitzt ein konserviertes Motiv RR(Y/F)S(D/E)F, welches Teil einer positiv geladenen Subdomäne ist, die mit dem 3-Phosphate von PtdIns(3)P in Kontakt tritt (35). Die SNX-PX Domäne einzelner SNXe zeigt, ähnlich der SH3 Domäne, ein promiskuitives Bindungsverhalten. So erkennt SNX9 sowohl PtdIns(3)P als auch PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5<sub>2</sub>)P, PtdIns(3,4,4)P<sub>3</sub> (16). Die subzelluläre Lokalisation vieler SNXe, die an der Endozytose und am endosomalen Proteintransport beteiligt sind, kann teilweise durch das spezifische PI Muster der Zellplasmamembran und der jeweiligen endosomalen Kompartimente erklärt werden (1; 6).

### 1.2.3 Die BAR Domäne

#### 1.2.3.1 Allgemeine Merkmale von BAR Domänen

BAR Domänen wurden erstmals 1994 als N-terminale, vorwiegend alpha-helikale Domänen des Amphiphysins 1 in Vertebraten und des RVS 161/167 Proteins in Hefe beschrieben. Dies führte zusammen mit der Entdeckung eines dritten BAR-Proteins, Bin 1, zur Bezeichnung als BAR Domäne (Bin 1, Amphiphysin 1, RVS 161/167) (36; 37). Es handelt sich um 250-280 Aminosäuren lange, aus drei alpha-Helices bestehende Domänen, welche die Bildung eines halbmondförmig gekrümmten Dimers ermöglichen (38; 39). Diese Dimere ermöglichen Protein-Membran Interaktionen durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen zellulären Membranen und der positiv geladenen Oberfläche des BAR Dimers (38). Durch die intrinsische Krümmung des BAR Dimers sind diese Superdomänen in der Lage, an Membranen mit definiertem Krümmungsradius zu binden oder diesen zu verändern (8; 36; 40; 41). Bedingt durch diese Eigenschaften sind BAR Proteine an der Entstehung, der Aufrechterhaltung und dem Abbau von Invaginationen und Protrusionen zellulärer Membranen beteiligt (40). Die

Deformation der Membran durch BAR Proteine wird dabei im Wesentlichen durch zwei verschiedene Mechanismen bewerkstelligt. Durch eine Interaktion des BAR Dimers mit der Plasmamembran kann diese bei ausreichender Bindungsenergie durch die vorgegebene Krümmung des BAR Dimers deformiert werden, insbesondere bei hoher lokaler Konzentration dieser Proteine an der Membran (41; 42). Zum anderen besitzen einige BAR Proteine amphipatische Helices, deren hydrophobe Reste in die Zellmembran eintauchen und so die Lipidkopfgruppen auf einer Seite der Lipiddoppelschicht verdrängen. Die Reorganisation der Membranlipide führt so zu einer stärkeren Krümmung der Membran (40; 43). Ein gut charakterisiertes Beispiel einer speziellen Membraninvagination stellt die Clathrin-abhängigen Endozytose (CME; clathrin mediated endocytosis) dar (44). So sind zum Beispiel bei der Entstehung und Stabilisierung der konvexen Oberfläche von Stachelsaumbläschen (CCPs; clathrin coated pits) im initialen Stadium der Endozytose sowie dem Abschnüren des neu entstandenen Vesikels von der Plasmamembran BAR Proteine wie Epsin, Endophilin und SNX9 beteiligt (45-48). Weitere Beispiele für die biologische Funktion von BAR Proteinen stellen der Transport von Vesikeln zwischen Zellorganellen, die Exozytose, die Aufrechterhaltung tubulärer Strukturen im endosomalen Netzwerk, die Reorganisation des Zytoskeletts und die Biogenese muskulärer T-Tubuli dar (8; 10; 49-51). Abbildung 4a zeigt das Homodimer einer klassischen BAR Domäne am Beispiel des Endophilin.



**Abbildung 4: Struktur und Funktion klassischer-, F- und I-BAR Domänen (a)** Klassische BAR Domäne. Abgebildet ist ein Homodimer der klassischen N-BAR Domäne von Endophilin. Dabei ist ein Protomer in Grau, das andere Protomer farbige dargestellt. Die drei alpha-Helices der BAR Domäne sind von N- nach C-terminal in blau, grün und rot dargestellt. Schematische Darstellung der Interaktion zwischen BAR Domäne und der negativ gekrümmten Plasmamembran **(b)** Homodimer der I-BAR Domäne von IRSp53. I-BAR Domänen binden im Gegensatz zu BAR und F-BAR Proteinen an positiv gekrümmte Membranen. **(c)** Homodimer der F-BAR Domäne von FBP17. Die negative Krümmung der Plasmamembran ist geringer als bei klassischen BAR Domänen. Abbildung modifiziert nach (36).

### 1.2.3.2 Klassifikation der BAR Domänen Superfamilie

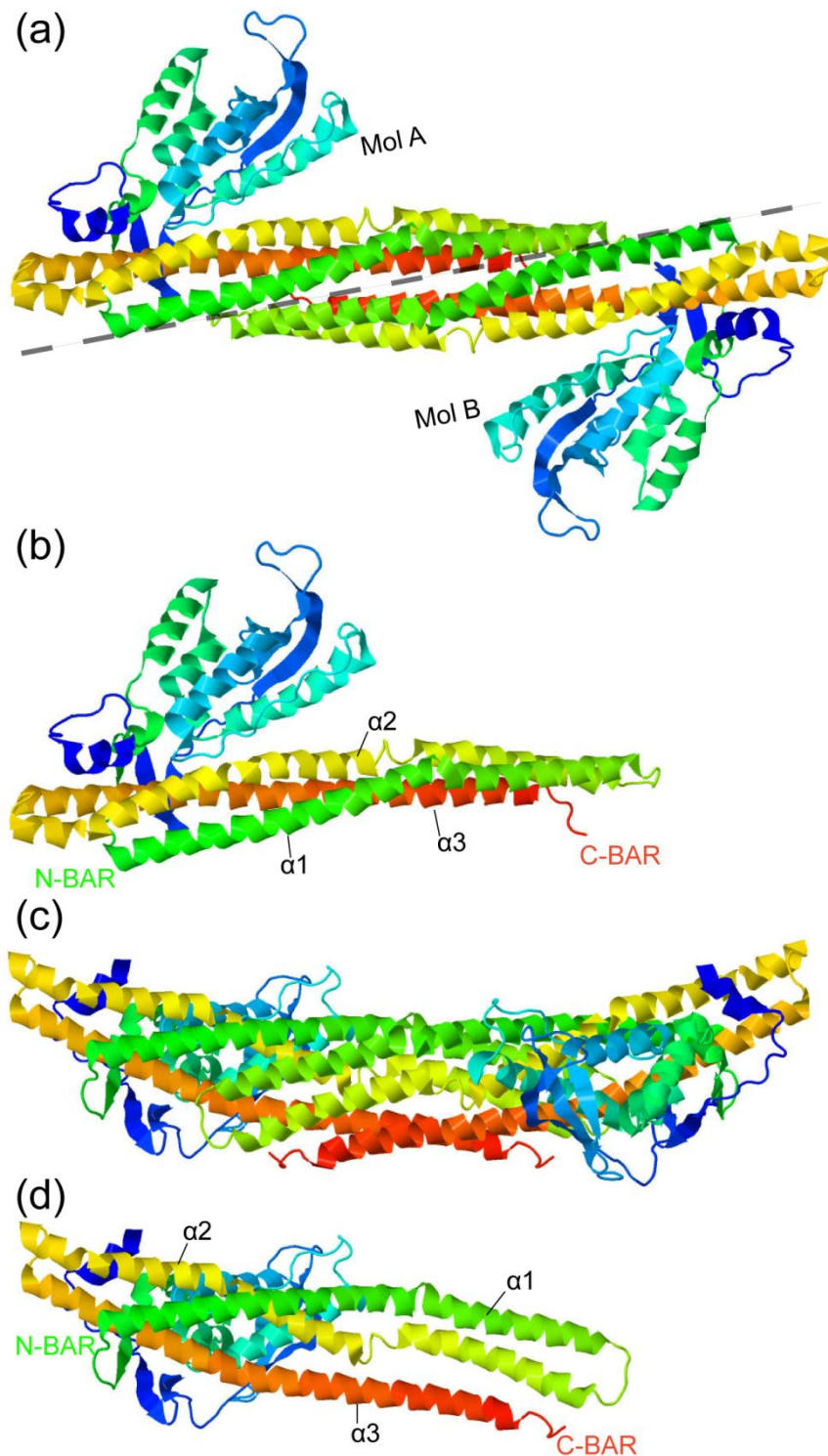
Strukturelle Unterschiede und die Präferenz unterschiedlich gekrümmter Membranen erlauben eine Einteilung der BAR Domänen Superfamilie in drei funktionelle Gruppen (Abbildung 4): Gruppe 1 stellen die klassischen BAR Domänen dar, welche mit konvexen Membranen interagieren und daher bei Prozessen der Membraninvagination beteiligt sind (38). Zu diesen gehören die Arfaptin-, Amphiphysin-, Endophilin- und BAR pleckstrin homology (BAR-PH)- Gruppe, außerdem die BAR-PX Gruppe der SNXe. Die BAR Domänen der Amphiphysin- und Endophilin Gruppe enthalten eine zusätzliche N-terminale amphipathische Helix und werden folglich als N-BAR Proteine bezeichnet (36; 39). Gruppe 2 enthält die sogenannten Inverse- oder IRS-BAR (I-BAR) Proteine (Abbildung 4b), benannt nach

ihrer Entdeckung in der IRSp53 homologen Domäne und ihrem im Vergleich zu klassischen BAR Domänen inversem Bindungsverhalten an konkaven Membranen (8; 52). Diese zeppelinförmigen Dimere binden und deformieren konkave Plasmamembranen und sind daher an der Ausbildung von zellulären Protrusionen wie z.B. Filopodien beteiligt (53). Gruppe 3 enthält die Fer CIP4 homology (F-BAR) Domänen (Abbildung 4c), welche im Vergleich zu klassischen BAR Domänen elongierte und daher schwächer gekrümmte Dimere ausbilden (54). F-BAR Proteine sind durch Selbstassemblierung in spiralförmige Strukturen in der Lage, de novo flache Membranen zu krümmen, ein Mechanismus, der zunehmend auch für klassische BAR Domänen diskutiert wird (54; 55). Die so entstandenen Invaginationen weisen aufgrund der elongierten und nur leicht gekrümmten Dimerstruktur einen im Vergleich zu klassischen BAR Proteinen größeren Durchmesser auf. Daher spielen diese Proteine zum Beispiel in der initialen Phase der Endozytose eine Rolle, während in späteren Phasen mit zunehmenden Krümmungsradien klassische BAR Proteine rekrutiert werden (38; 54). Abbildung 4 stellt vereinfachend die strukturellen und mechanistischen Unterschiede der BAR-, F-BAR und I-BAR Proteine dar.

### 1.2.3.3 Struktur und Eigenschaften der SNX9 PX-BAR Domäne

Aus der SNX9/18/33 Untergruppe ist lediglich die Kristallstruktur der SNX9 PX-BAR Domäne bekannt (18; 36; 55). Es wird jedoch aufgrund vieler konservierter Aminosäurereste innerhalb dieser Untergruppe von einer ähnlichen strukturellen Anordnung der SNX18 und SNX33 BAR Domäne ausgegangen (18). Das SNX9 BAR Monomer zeigt die für klassische BAR Domänen typische Anordnung der drei alpha-Helices in eine linksgängige Super-Helix. Das Dimer zeigt dementsprechend eine aus sechs alpha-Helices bestehende Super-Helix, welche halbmondförmig angeordnet ist. Abbildung 5 zeigt eine detaillierte Darstellung der SNX9 BAR Domäne aus verschiedenen Blickwinkeln. Die Halbmondform des BAR Dimers resultiert sowohl aus der Anordnung der beiden Monomere zueinander, als auch aus den Knickstellen in den individuellen Helices (Abbildung 5c) (18; 55). Der BAR Domäne geht eine potentielle amphipathische Helix voraus, die durch das Eintauchen in die Zellmembran zusätzlich zu deren Deformation führt, analog zur amphipathischen Helix der N-BAR Proteine (18). Erste Daten deuten darauf hin, dass SNX9 Dimere analog zu F-BAR Proteinen an den Spitzen des halbmondförmigen





**Abbildung 5: Kristallstruktur der SNX9 PX-BAR Superdomäne (a), (b), (c), (d)** Kristallstruktur der SNX9 PX-BAR Superdomäne im Ribbon Diagramm (56). Farbkodierung der BAR Domäne von N- nach C-terminal: Dunkelgrün, Hellgrün, Gelb, Orange und Rot. Die N-terminal der BAR Domäne gelegene PX Domäne ist in blau und türkis dargestellt. **(a)** PX-BAR Homodimer, Ansicht auf die konkave Seite des halbmond-förmigen Dimers. Die gestrichelte Linie trennt die Protomere der Moleküle A und B (Mol A, Mol B). **(b)** Molekül A einzeln dargestellt, in gleicher räumlicher Orientierung wie in (a). Die einzelnen Alpha Helices sowie N- und C-Terminus der BAR Domäne sind beschriftet. **(c), (d)** Darstellung analog zu (a) und (b), jedoch wurden die

Moleküle 90° um eine horizontale Achse gedreht. Die konkave Seite des Dimers zeigt nun nicht mehr nach vorne, sondern nach oben. Diese Abbildung wurde mit JMol (Version 12.0.18) erstellt, die Koordinaten der Kristallstruktur entstammen dem Eintrag 2RAJ der RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Dimers in Kontakt treten, um so höher-molekulare Strukturen zu bilden, die sich spiralförmig um Invaginationen der Plasmamembran winden und diese stabilisieren (9; 55). Die SNX9 BAR Domäne bildet zusammen mit der benachbarten PX Domäne eine funktionelle Einheit, auch als PXBAR Superdomäne bezeichnet (18). Beide Domänen vermitteln die Interaktion mit der Zellmembran, wobei die BAR Domäne den Krümmungsradius der Membran misst, während die PX Domäne gleichzeitig deren PI Muster erkennt. Dieses hat zwei Konsequenzen: Zum einen erfolgt so die Integration zweier verschiedener Zustände (Koinzidenzdetektion) einer Membran durch die PX-BAR Einheit. Dadurch wird ein noch differenzierteres Rekrutieren von SNX9 an die jeweilige Membran möglich (10; 18). Zum anderen ist im Fall von SNX9 die PX Domäne für eine vollständige Funktion der BAR Domäne nötig. Ein initiales Binden der PX Domäne an bestimmte PtdInsPs (insbesondere PtdInsPs(4,5)P<sub>2</sub>) ist Voraussetzung für eine anschließende Deformation der Membran durch die benachbarte BAR Domäne (18; 55; 57).

### 1.3 Funktion der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe

#### 1.3.1 SNX9

SNX9 ist mit Abstand das am besten charakterisierte Mitglied der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe. Es wurde 1999 als Interaktionspartner der Metalloproteinasen ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 9 und ADAM15 identifiziert, deren Umsatz durch eine SNX9-SH3 Domänen-vermittelte Interaktionen reguliert wird (58). Funktionell am besten charakterisiert sind bis heute jedoch die Beteiligung von SNX9 an der CME und der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (16; 45; 57; 59; 60). SNX 9 interagiert mit mehreren essentiellen Faktoren der CME, darunter Clathrin, dem Adapterprotein 2 (AP2) sowie der GTPase Dynamin. Dabei vermittelt die LC Domäne die Interaktion mit den zuerst genannten Faktoren. Die Interaktion mit der neuronalen Isoform Dynamin 1 und dem ubiquitär exprimierten Dynamin 2, welche für das Abschnüren einzelner Vesikel von der Plasmamembran nötig sind, findet über die SH3 Domäne

statt (16; 59). SNX9 liegt zytosolisch im Komplex mit Dynamin 2 und dem Enzym Aldolase vor (61). Nach Phosphorylierung von SNX9 löst sich die Aldolase aus dem Komplex, und SNX9 rekrutiert Dynamin 2 an CCPs (62). Dort stimuliert SNX9 die GTPase Aktivität von Dynamin (59). Weiterhin wird vermutet, dass SNX9 über die PX-BAR Superdomäne den Hals des Vesikel durch Deformation der Plasmamembran verkleinert und so ein Abschnüren des Vesikel erleichtert (57). Eine verringerte zelluläre SNX9 Konzentration führt daher zu einer Abnahme der Endozytose des Transferrinrezeptors, synaptischer Vesikel und extrazellulärer Flüssigkeit (45; 59; 62). Auch die Endozytose des Insulinrezeptors und des CD (cluster of differentiation) 28 in T-Zellen sind abhängig von SNX9 (63; 64). Verschiedene Formen der Endozytose, darunter auch CME, sind auf eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts angewiesen (65-67). Dabei stellt das Aktin-Netzwerk nicht nur eine passive Barriere dar, die Raum für die Endozytose schaffen muss, vielmehr unterstützt die Polymerisierung von Aktin aktiv das Abschnüren des neu entstandenen Vesikels von der Zellmembran (68). SNX9 ist in der Lage, die Polymerisierung von Aktin-Molekülen zu beeinflussen und stellt somit eines der Schlüsselmoleküle und ein weiteres BAR Protein für die Koppelung der Endozytose an die Reorganisation des Zytoskeletts dar (10; 69). SNX9 bindet mit seiner SH3 Domäne das Wiscott Aldrich Syndrom Protein (WASP), welches daraufhin den Actin related protein (Arp) 2/3 Komplex aktiviert und so die Polymerisierung von Aktin induziert (2; 45; 62; 70). Arp2/3 ist außerdem in der Lage direkt an die LC Domäne von SNX9 zu binden (71). Die Aktivierung von WASP/Arp2/3 ist dabei streng an die Anwesenheit von SNX9 Oligomeren an PtdInsPs(4,5)P<sub>2</sub> angereicherten Zellmembranen gekoppelt, also an Bedingungen, wie sie in der späten Phase der CME vorliegen (45; 46). SNX9 bindet also zwei seiner wichtigsten Bindungspartner, Dynamin und WASP, über die N-terminale SH3 Domäne. Dabei ist unbekannt, wie der Wechsel der SH3 Bindungspartner, der für einen effizienten Ablauf der Endozytose nötig ist, reguliert wird (57). Die kleinste funktionelle Einheit von SNX9 stellt das SNX9 Homodimer dar, da nur so ein funktionelle dimere BAR Domäne vorliegt (16; 57; 60; 72). Auch die Regulation von SNX9 durch Phosphorylierung ist an dessen Dimerisierung gekoppelt. SNX9 reguliert die Degradation des EGFR nachdem es von der aktivierten Cdc42-assoziierten Tyrosin Kinase 2 (ACK2) phosphoryliert worden ist (73). Dabei ist die Dimerisierung von SNX9 unabdingbare Voraussetzung für die Phosphorylierung durch ACK2 (74).

### 1.3.2 SNX18

SNX18 wurde 2004 in einem Proteomik Screen als Interaktionspartner eines prolinreichen Peptides des Son-of-Sevenless (Sos) Proteins identifiziert (75). Auch in einem Screen nach neuen Interaktionspartnern des Fas Liganden (FASL) wurde SNX18 detektiert, da es mit dem prolinreichen Abschnitt des FASL interagiert (76). Bis heute ist dieses Protein funktionell nur sehr wenig charakterisiert und die veröffentlichten Daten zum Teil widersprüchlich. Zum einen zeigt SNX18 einige Gemeinsamkeiten mit SNX9. Es bindet über seine SH3 Domäne an Dynamin und WASP, interagiert mit dem Enzym Aldolase, zeigt eine Präferenz für PtdInsPs(4,5)P<sub>2</sub> angereicherte Membranen und ist in der Lage diese Membranen durch die PX-BAR Domäne zu deformieren (11; 77). Eine Studie deutet auf eine mögliche funktionelle Redundanz zwischen SNX18 und SNX9 hin, da SNX18 mit SNX9 kolokalisiert und den Verlust von SNX9 bei der CME kompensieren kann (77). Eine zweite Studie spricht für eine unabhängige Funktion von SNX18. Dort kolokalisiert SNX18 mit dem phosphofurin acidic cluster sorting protein 1 (PACS1) und interagiert über seine LC Domäne mit dem Clathrin Adapterprotein 1 (AP1), welches auf endosomalen Membranen lokalisiert ist (11; 78). AP1 und PACS1 sind Teil eines Proteinkomplexes, der für die Assemblierung von Transportmolekülen am Endosom beteiligt ist (79). Daher könnte SNX18 dieser Studie zu Folge potentiell am retrograden Proteintransport vom Endosom zum TGN beteiligt sein.

### 1.3.3 SNX33

Wie SNX18 ist auch SNX33 bisher kaum charakterisiert. SNX33 wurde zuerst 2006 in unserem Labor im Rahmen eines Expressionsklonierungs-Screen als neuer Modulator der Beta-Amyloid Vorläuferprotein ( $\beta$ APP; beta-amyloid precursor protein) Proteolyse identifiziert (12; 80). SNX33 wird in einer Vielzahl von humanen Geweben und Zelllinien exprimiert, darunter auch neuronale Zelllinien und murines Gehirn (11; 12; 81). SNX33 interagiert wie SNX9 und SNX18 über seine SH3 Domäne mit WASP und Dynamin (11; 12; 81) und ist in der Lage mit seiner PX-BAR Domäne Membranen zu deformieren (11). Aufgrund der Interaktion mit Dynamin scheint SNX33 an der Endozytose wichtiger zellulärer Proteine beteiligt. SNX33 reguliert dadurch indirekt die Prozessierung membranständiger Proteine wie zum Beispiel die

---

des  $\beta$ APP oder des Prion-Proteins (PrP), deren Proteolyse zum Teil an der Zelloberfläche stattfindet (12; 82). Durch eine Interaktion mit WASP beeinflusst SNX33 möglicherweise die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während des Zellzyklus und somit die Zytokinese (81). SNX33 interagiert wie SNX9 über seine SH3 Domäne mit der Metalloprotease ADAM15, eine funktionelle Charakterisierung dieser Interaktion fehlt jedoch (83; 84).

## 2. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Proteine mit BAR (Bin, amphiphysin, Rvs) Domäne, darunter zahlreiche Sorting Nexine (SNXe), sind an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt. Darunter fallen die Endozytose, die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, der Transport von Proteinen, die Deformation und strukturelle Aufrechterhaltung zellulärer Membranen sowie die Modulation von Signaltransduktionskaskaden (9; 38; 85). Außerdem gibt es zunehmende Evidenz für eine Beteiligung dieser Proteine an pathologischen Mechanismen, die zur Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen führen können. Mutationen in Proteinen mit BAR Domänen werden mit der Alzheimer Erkrankung, Diabetes Mellitus und zahlreichen Karzinomen assoziiert (86-90). Eine Assoziation von SNXen des Retromer Komplexes mit der Alzheimer Erkrankung ist in mehreren Studien beschrieben (91; 92). Zwei Arbeiten deuten darauf hin, dass SNX33 an der Regulation der Beta-Amyloid-Vorläuferprotein ( $\beta$ APP) und Prion-Protein (PrP) Prozessierung beteiligt ist und so den Krankheitsverlauf der assoziierten neurodegenerativen Erkrankungen beeinflusst (12; 82). SNX33 ist bis heute kaum charakterisiert, und es ist unklar, ob dieses Protein eine funktionelle Redundanz zu SNX9 und SNX18 aufweist oder eine unabhängige Funktion besitzt. In dieser Arbeit sollen daher durch systematische Struktur-Funktions Analyse neue Erkenntnisse über die Eigenschaften von SNX33 gewonnen werden. Dabei sollen vor allem mögliche Interaktionspartner und die potentielle Dimerisierung dieses Phox homology (PX)-BAR Proteins im Vordergrund stehen, da eine Analyse dieser beiden Faktoren bereits bei der Charakterisierung des homologen SNX9 und weiterer SNXe zahlreiche Einblicke auf deren Funktion ermöglicht hat.

Folgende Fragestellungen sollen systematisch im Rahmen dieser Arbeit adressiert werden:

1. *Liegt SNX33 in einem höher-molekularen Komplex vor?*

SNXe verfügen über zahlreiche Protein-Protein Interaktionsdomänen. Daher soll zunächst überprüft werden, ob SNX33 in humanen Zelllinien

hauptsächlich in einem höher-molekularen Komplex oder lediglich als Monomer oder Dimer vorliegt.

### 2. *Was sind mögliche Interaktionspartner von SNX33?*

Falls SNX33 in einem höher-molekularen Komplex vorliegt, sollen potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Diese könnten darüber Aufschluss ergeben, in welchem zellulären Kontext SNX33 eine Rolle spielt. Auch könnte aus dem Profil der Interaktionspartner möglicherweise auf eine funktionelle Redundanz zwischen SNX33 und den beiden homologen SNXe dieser Untergruppe, SNX9 und SNX18, geschlossen werden.

### 3. *Ist SNX33 in der Lage Homo- oder Heterodimere zu bilden?*

SNX33 besitzt eine BAR Domäne, welche als Dimerisierungsmodul dienen und essentiell für die Funktion von SNX33 sein könnte. Da SNX33 jedoch auch eine SH3 Domäne sowie ein PXXP Motiv besitzt, könnte eine Dimerisierung auch über diese Domäne vermittelt werden, wie es bereits für andere zytosolische Proteine gezeigt werden konnte (93; 94). Daher soll untersucht werden, über welche Domäne eine potentielle SNX33 Homodimerisierung ermöglicht wird. Da BAR Domänen auch in der Lage sind, an Plasmamembranen zu binden und diese zu deformieren, soll auch die SNX33 BAR Domäne diesbezüglich näher untersucht werden. Darüber hinaus sind BAR Proteine in der Lage Heterodimere zu bilden, wie dies zum Beispiel für SNX1 und SNX2 oder Amphiphysin 1 und Amphiphysin 2 gezeigt wurde (95; 96). Durch Heterodimerisierung kann die Funktionsvielfalt der einzelnen Proteine erweitert werden, indem unterschiedliche Interaktionspartner aus unterschiedlichen zellulären Kompartimenten durch die dimerisierenden Proteine in räumliche Nähe gebracht werden. Auch die Heterodimerisierung zweier funktionell redundanter Proteine bei einer gemeinsamen Aufgabe ist denkbar. Kann keine Heterodimerisierung nachgewiesen werden, deutet dies jedoch eher auf eine unabhängige Funktion der untersuchten Proteine hin. Eine Analyse einer potentiellen SNX33-SNX9 und SNX33-SNX18 Heterodimerisierung soll klären, ob Heterodimere existieren und welche Auswirkungen dies auf die SNX33 Funktion haben könnte.

---

4. *Wodurch wird die Spezifität einer möglichen SNX33 Dimerisierung bestimmt?*

Falls eine SNX33 Dimerisierung beobachtet wird, soll im Detail überprüft werden, welcher Teil des Proteins deren Spezifität vermittelt und welche Mechanismen dafür verantwortlich sind.

5. *Sind die aus der Struktur-Funktions-Analyse von SNX33 gewonnenen Daten auch auf andere Proteine übertragbar?*

In diesem Teil der Arbeit soll überprüft werden, ob die für SNX33 gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Mitglieder der SNX- oder BAR Protein Familie übertragbar sind. Diese Analyse soll daher vor allem im Hinblick auf die Eigenschaften der SNX33 BAR Domäne erfolgen. Neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Spezifität einer möglichen Homo- oder Heterodimerisierung könnten die Analyse weiterer BAR Proteine vereinfachen. Darüber hinaus können Vorhersagen über eine mögliche Heterodimerisierung das bekannte Funktionsspektrum des jeweiligen BAR Proteins zunächst theoretisch erweitern und so Anreiz für nachfolgende experimentelle Studien schaffen.



## 3. Material und Methoden

Die jeweiligen Hersteller der verwendeten Materialien werden in Klammern hinter dem jeweiligen Reagenz beziehungsweise Hilfsmittel angegeben. Fehlt diese Angabe, dann wurden die Chemikalien von Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

### 3.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

#### 3.1.1 Übersicht der verwendeten Plasmide und Oligonukleotide

Als Plasmidvektor für die Proteinexpression in humanen Zelllinien wurde der Peak12 Vektor der Firma Edgebio verwendet. Für die Proteinexpression in *E.coli* wurde der pGex 5X.1 Vektor von GE Healthcare benutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Thermo und Invitrogen bezogen.

**Tabelle 1: Plasmidübersicht**

Plasmid	Vektor	cDNA	Restriktions-enzym	Bezugsquelle
p12 (als „Vektor“ bezeichnet)	Peak12			Dr. Brian Seed
p12SNX1HA	Peak8	SNX1 C-terminal HA markiert	Nco I, Xba I	Dr. Stephanie Neumann
p12SNX9HA	Peak12	SNX9 C-terminal HA markiert	Hind III, Xba I	Dr. Stephanie Neumann
p12SNX9L392IHA	Peak12	SNX9 mit L392I Punktmutation, C-terminal HA markiert	Hind III, Xba I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt
p12SNX9BAR33HA	Peak12	SNX9 mit der BAR Domäne von SNX33, C-	Hind III, EcoR V, Xba I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt

			terminal HA markiert		
p12SNX9FLAG	Peak12	SNX9 C- terminal FLAG markiert	Xba I, Not I	Dr. Stephanie Neumann	
p12SNX9modHA	Peak12	SNX9 bei dem 19 Reste der BAR Domäne durch korrespondier- ende Reste in SNX33 ausgetauscht wurden	Hind III, EcoR I, Xba I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt	
p12HASNX9PXBAR	Peak12	PXBAR Domäne von SNX9, N- terminal HA markiert	Xba I, Not I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt	
p12HASNX9PXBAR $\Delta$ BARH3	Peak12	PX Domäne und die ersten beiden Helices der BAR Domäne von SNX9, N- terminal HA markiert	Xba I, Not I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt	
p12SNX18HA	Peak12	SNX18 C- terminal HA markiert	EcoR I, Xba I	Dr. Stephanie Neumann	
PCB1-Dyn	PCB1	Dynamine1		Dr. M. Caron	
p12PKC $\alpha$ HA	Peak12	PKC $\alpha$	Hind III, Not I	Dr. Stefan Lichtenthaler	
p12SNX33HA	Peak12	SNX33 C- terminal HA markiert	Hind III, Xba I	Dr. Stephanie Neumann	
p12SNX33FLAG	Peak12	SNX33 C- terminal HA markiert	Xba I, Not I	Dr. Stephanie	

		terminal FLAG markiert		Neumann
p12FLAGSNX33	Peak12	SNX33 N- terminal FLAG markiert	Spe I, Xba I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt
p12SNX33 $\Delta$ SH3HA	Peak12	SNX33 ohne SH3 Domäne, C-terminal HA markiert	Hind III, Xba I	Dr. Stephanie Neumann
p12SNX33 $\Delta$ BAR3HA	Peak12	SNX33 ohne vollständige BAR Domäne, C-terminal HA markiert	Hind III, Xba I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt
p12SNX33L371IHA	Peak12	SNX33 mit L371I Punkt- mutation, C- terminal HA markiert	Hind III, Xba I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt
p12HASNX33PXBAR	Peak12	PXBAR Domäne von SNX33, N- terminal HA markiert	Xba I, Not I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt
p12HASNX33PX $\Delta$ BARH3	Peak12	PX und die ersten beiden Helices der BAR Domäne von SNX33, N- terminal HA markiert	Xba I, Not I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt
p12SNX33BAR9HA	Peak12	SNX33 mit der BAR Domäne von SNX9, C- terminal HA markiert	Hind III, EcoR V, Xba I	Im Rahmen dieser Arbeit erstellt
p12SNX33 $\Delta$ SH3	Peak12	SNX33 ohne	Hind III, Xba I	Im Rahmen

FLAG		SH3 Domäne, C-terminal FLAG markiert		dieser Arbeit erstellt
pGexSH3-GST	pGex 5X.1	SH3 Domäne von SNX33 N- terminal an GST fusioniert	BamH I, Not I	Katrin Moschke
pGexGST	pGex 5X.1	GST		GE Healthcare

**Tabelle 2: Oligonukleotidübersicht (alle Sequenzen in 5'- 3' Richtung)**

Ziel-plasmid	Primer A	Primer B	Ausgangs-plasmid
p12FLAG SNX33	<b>p12Spewfd</b> <i>GGCCTTTCGGCATAACT AGTG</i>	<b>FlagrevXba</b> <i>GGTCTAGAGACTTGTCG TCGTCGTCCTTGTAG</i>	p12FLAG TNFαHA
p12SNX33 ΔBARH3 HA	<b>p12Hind</b> <i>CATTCTCAAGCCTCA GACAGTGG</i>	<b>p12SNXB8ΔBARH3rev</b> <i>TGATCTCTAGACCCACC ATGCGGCCCTCGTC</i>	p12SNX33HA
p12SNX33 L371IHA	Erstellung der Matrize: PCR1: <b>SNXB8L371lfwd</b> <i>CACCAGGATATCCAG GACGTGGAAGATCG C</i> PCR2: <b>p12Hind</b> <i>CATTCTCAAGCCTCA GACAGTGG</i> Erstellung finales PCR Fragment: <b>p12Hind</b>	<b>p12Not</b> <i>TGGATGCAGGCTACTCT AGGG</i> <b>SNXB8L371lrev</b> <i>GCCTGGATATCCTGGT GCTCGGTGGGG</i>	p12SNX33HA  p12SNX33HA  PCR Fragmente aus PCR1 und PCR2

p12SNX9 L392IHA	<u>Erstellung der Matrize:</u>		
	PCR1:		
	<b>SNX9L392Ifwd</b>	<b>p12Not</b>	p12SNX9HA
	<i>GACTTGGATATCGTA</i>		
	<i>GAAATAGAGCAGAAG</i>		
	<i>TGC</i>		
	PCR2:		
	<b>p12Hind</b>	<b>SNX9L392Irev</b>	p12SNX9HA
	<i>TTCTACGATATCCAAGT</i>		
	<i>CAGGTGCCTCTGG</i>		
	<u>Erstellung finales PCR</u>		
	<u>Fragment:</u>		
	<b>p12Hind</b>	<b>p12Not</b>	PCR
			Fragmente aus
			PCR1 und
			PCR2
p12HASNX 33PXBAR	<b>HASNX33PXBARXbar1</b> <b>fwd</b>	<b>p12Not</b>	p12SNX33
	<i>TACGTCTAGAGCGGCC</i>		
	<i>CAAGCCACCACTG</i>		
p12HASNX 33PXΔBAR H3	<b>HASNX33PXBARXbar1</b> <b>fwd</b>	<b>HASNX33PXdeltaBAR</b> <b>H3Not1rev</b>	p12SNX33
	<i>CTGAGCGGCCGCTTAC</i>		
	<i>ACCATGCGGCCCTCGT</i>		
	<i>CACTC</i>		
p12HASNX 9PXBAR	<b>HASNX9PXBARXbar1</b> <b>fwd</b>	<b>p12Not</b>	p12SNX9
	<i>TACGTCTAGAGGATGCA</i>		
	<i>GGCGGCGCTCAG</i>		
p12HASNX 9PXΔBAR H3	<b>HASNX9PXBARXbar1</b> <b>fwd</b>	<b>HASNX9PXdeltaBARH</b> <b>3Not1rev</b>	p12SNX9
	<i>CTGAGCGGCCGCTTAT</i>		
	<i>AGGGTGATTTTACTTGT</i>		
	<i>TG</i>		

---

p12SNX9	<u>Erstellung Matrize 1:</u>		
modHA	<b>PrmrMax1fwd</b>	<b>p12Not</b>	p12SNX9HA
	AGCAAGTGCAATTTTAC		
	CAAACGATTGCAGAAAA		
	GCTGGAGCAGACCCTC		
	AGCCGCTTTCCAG		
	<u>Erstellung Matrize 2:</u>		
	<b>PrmrMax3fwd</b>	<b>PrmrMax2rev</b>	p12SNX9HA
	CATGGGCCCTCAAG		
	GTAGTACAGATCTCA		
	ATGATGCAATAACAG		
	AAACAGGAAAGACTT		
	ATGAAG		
	<u>Erstellung Matrize 3:</u>		
	<b>PrmrMax4fwd</b>	<b>PrmrMax2rev</b>	Matrize 2
	CAAGGAATTCCAGAA		
	GATAGGAAAGGCCTT		
	CCAGAGTATCGCCAC		
	AAGTTTCAGTTCCAT		
	GGGCCCTCAAGGTA		
	G		
	<u>Erstellung finales PCR</u>		
	<u>Fragment 1:</u>		
	<b>PrmrMax4fwd</b>	<b>p12Not</b>	Matrize 1+3
	<u>Erstellung finales PCR</u>		
	<u>Fragment 2:</u>		
	<b>p12Hind</b>	<b>PrmrMax5rev</b>	P12SNX9HA
		TCTGGAATTCCTTGGGA	
		AATGGGCCCGTGCACT	
		TCTCCAGAGCTCCTGC	
		CCCACCGTCAG	

---

### 3.1.2 Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Aqua bidest (ddH<sub>2</sub>O) (Milli Q Plus Filteranlage, Millipore) versetzt und mit Hilfe eines Standschüttlers

(VortexGenie2, Scientific Industries) gelöst. Eine 100 µM Lösung wurde zur Aufbewahrung bei -20°C angesetzt, eine 10 µM Lösung diente als Arbeitskonzentration. Ein Beispielansatz für eine PCR findet sich unter Tabelle 3.

**Tabelle 3: Beispielansatz für PCR**

<b>Substanz:</b>	<b>Menge:</b>
PWO-Polymerase (PEQLAB)	1 µl
10-fach PWO Puffer (PEQLAB)	5 µl
dNTP (Roche) 10 mM	1 µl
Matrize (100ng DNA / µl)	1 µl
Oligonukleotid 1 (10 µM)	4 µl
Oligonukleotid 2 (10 µM)	4 µl
ddH <sub>2</sub> O	34 µl
<b>Σ=</b>	<b>50 µl</b>

Der 50 µl PCR-Ansatz wurde in dünnwandigen Reaktionsgefäßen (Sarstedt) auf Eis gemischt um eine frühzeitige Polymeraseaktivität zu verhindern. Anschließend erfolgte die Amplifikation der Zielsequenz in einer PCR Maschine (Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems). Die Amplifikation erfolgte dabei über 30 Zyklen, wobei ein Zyklus aus den folgenden Einzelschritten bestand: 1. Denaturierung: Trennen der Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid, DNA) Doppelstränge für 30 s bei 95°C; 2. Primerhybridisierung: Anlagern der Primer an die DNA Einzelstränge bei 52°C für 30 s; 3. Elongation: Synthese des komplementären Strangs für 1 min bei 72 °C. Beim erste Zyklus jeder PCR wurde zunächst für 5 min bei 95°C ein initiales Aufschmelzen der Doppelstränge vorgenommen. Die unter Schritt 2 angegebene Hybridisierungstemperatur richtete sich dabei an der individuellen Schmelztemperatur des verwendeten Primers. Bei sogenannten Fusions-PCRs wurden in einem ersten Schritt PCR Fragmente generiert, die dann in darauffolgenden PCRs als Matrize verwendet wurden. Nach Amplifikation der PCR Fragmente wurde der gesamte PCR-Ansatz mit 10 µl Ladepuffer (30% Glycerol, 10mM EDTA, 0,05% Orange G; Sigma) versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen (2% Agarose in TAE für Fragmente < 500 Basenpaare, 1% Agarose in TAE für Fragmente > 500 Basenpaare), bei 120 Volt für 30 min elektrophoretisch getrennt,

mit Ethidiumbromid angefärbt, fotodokumentiert und schließlich mit einem Skalpell ausgeschnitten.

**Tabelle 4: Agarose Gelelektrophorese der PCR Fragmente**

TAE Puffer	40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA (ph 8.0)
DNA Ladepuffer	30% Glycerol, 10 mM EDTA, 0,05% Orange G; Sigma
Ethidiumbromid	Roth
DNA Größenmarker	1 kb Ladder (Sigma); 0,1 µg/µl
Agarose	1-2% w/v; Invitrogen
Elektrophoresekammer	Owl Separation Systems, Inc.
UV-Schirm	Intas
Drucker	Mitsubishi

### **3.1.3 Aufreinigung der PCR Fragmente aus Agarose**

Die einzelnen Gelstücke wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäßen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mit dem Nucleo-Spin Kit (Macherey-Nagel) nach Anweisungen des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C gelagert.

### **3.1.4 Subklonierung verschiedener cDNAs in Expressionsvektoren**

Zunächst erfolgte der Verdau der PCR Fragmente und der jeweiligen Zielvektoren. Dabei wurden zwei unterschiedliche Restriktionsendonukleasen (RE) verwendet, um eine korrekte Orientierung der cDNA im Zielvektor zu gewährleisten. Die Restriktionsenzyme und deren spezifischen Puffer wurden von Fermentas und New England Biolabs bezogen.



**Tabelle 5: Beispielansatz eines Verdau mit Restriktionsenzymen (RE)**

<b>Substanz:</b>	<b>Menge:</b>
Vektor / PCR Fragment	1 µl; DNA [1µg/µl]
10-fach RE Puffer	2 µl
BSA (New England Biolabs)	1 µl
RE 1	1 µl
RE 2	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	14 µl
<b>Σ=</b>	<b>20 µl</b>

Der Verdauansatz wurde bei Raumtemperatur gemischt und anschließend bei 37 °C in einem Heizblock (MHR10, HLC Biotech) inkubiert. Dabei wurden Vektoren 1 h, PCR Fragmente 3 h inkubiert. Die anschließende Entfernung der 5'-Phosphatgruppe der linearisierten Vektoren beziehungsweise PCR-Fragmente erfolgte für 15 min bei 37°C. Dazu wurden 2 µl Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP, Roche) sowie 2,2 µl 10-fach SAP-Buffer (Roche) dem Verdauansatz zugesetzt. Anschließend erfolgte die Ligation von Vektor und Insert für 12 h bei 16 °C. 10 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation kompetenter *E.coli* Zellen (Stamm: DH5α) verwendet.

**Tabelle 6: Beispielansatz für eine Ligation**

<b>Substanz:</b>	<b>Menge:</b>
Dephosphorylierter Vektor	1 µl
Verdautes PCR Fragment / Insert	4 µl
T4 DNA Ligase (Roche)	1 µl
10-fach T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	12 µl
<b>Σ=</b>	<b>20 µl</b>

### **3.1.5 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* (Stamm DH5α) und deren Transformation mit Plasmid-DNA**

*E.coli* Kolonien wurden von einer Agarplatte unter sterilen Bedingungen mit einer Pipettenspitze aufgenommen. Mit diesen Kolonien wurde 100ml SOB Medium beimpft und bei 37°C/200 upm für 16 h inkubiert. Anschließend wurde die

Bakterienkultur mit ca. 250ml SOB Medium auf eine Optische Dichte ( $OD_{605}$ ) von 0,1 verdünnt und bei 18°C/200 upm für 24 h inkubiert. Die Bakterienkultur wurde nach Erreichen einer  $OD_{605}$  von 0,7 auf mehrere Falcon-Gefäße (50ml, Sarstedt) verteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Das Bakteriensediment wurde bei 4°C/3500 upm für 20 min abzentrifugiert und anschließend in 80 ml 4°C kaltem TB-Puffer für 10 min auf Eis resuspendiert und inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren des Bakteriensediments wurde dieses in 20ml TB-Puffer und 1,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) bei 4°C resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf Eis in 200µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

**Tabelle 7: Herstellung chemisch kompetenter *E.coli***

DMSO	Merck
TB-Puffer	10 mM HEPES, 15 mM $CaCl_2$ , 250 mM $KCl_2$ , 55 mM $MgCl_2$ , (Gesamtlösung pH 6,7)
SOB Medium	0,2% (g/v) Trypton, 0,05% Yeast Extrakt (BD), 0,5% NaCl (Roth) in $dH_2O$ (Gesamtlösung pH 7,0). 15g/l Agar (BD) wurden zugesetzt, anschließend wurde die Lösung bei 1,2 bar für 20 min autoklaviert. Nach abkühlen unter 50°C wurden die Agar-Platten gegossen
50ml-Falcon-Gefäß	Sarstedt
LB-Agarplatten	1-2% w/v; Invitrogen
Kühlzentrifuge	Avanti J-20XP, Beckmann Coulter

Zur Transformation der DH5α Zellen wurden 60 µl der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde für 5 min bei 37°C (Hitzeschock) inkubiert. Anschließend wurden dem Transformationsansatz 800 µl LB-Medium beigemischt und dieser bei 37°C/200 upm für 30 min inkubiert. Anschließend wurden Ampicillin-LB-Agarplatten unter sterilen Bedingungen beimpft und bei 37°C für 16h inkubiert.

**Tabelle 8: Transformation kompetenter DH5 $\alpha$  *E.coli***

LB-Medium	1% Trypton (BD), 0,5% Yeast Extrakt (BD), 0,5% NaCl (Roth) in dH <sub>2</sub> O, (Gesamtlösung pH 7,0). Die Lösung wurde bei 1,2 bar für 20 min autoklaviert.
Ampicillin-LB-Medium	100 $\mu$ g/ml Ampicillin (Sigma) wurden dem LB-Medium zugesetzt
Ampicillin-LB-Agarplatten	100 $\mu$ g/ml Ampicillin (Sigma) wurden der 50°C warmen Agarlösung zugesetzt

### **3.1.6 Herstellung von Plasmid-DNA im kleinen (Mini-Präparation) und großen (Maxi-Präparation) Maßstab**

Für eine Mini-Präp wurden 5ml Ampicillin-LB-Medium in einem 15 ml-Falcon-Gefäß mit Einzelkolonien transformierter *E.coli* DH5 $\alpha$  angeimpft und für 16 h bei 37°C/200 upm inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA mit dem Nucleospin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Für eine Maxi-Präp entsprechend 250ml Ampicillin-LB-Medium angeimpft und mit dem Nucleobond AX500 (Macherey-Nagel) nach Angaben des Hersteller aufgereinigt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode von Frederick Sanger von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert und unter Zuhilfenahme firmeneigener Software (GATC-Viewer) analysiert.

## **3.2 Zellkultur**

### **3.2.1 Verwendete Zelllinien und Kulturmedien**

HEK-293 EBNA Zellen (HEK-293e), H4 Zellen und HeLa Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco) kultiviert. Dem Medium wurden 10% fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum, Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) zugesetzt. Dieses Medium wird fortan als Basismedium bezeichnet. HEK-293e Zellen, die stabil p12FLAG-SNX33 exprimieren (HEK-293e/FLAG-SNX33), wurden von Stephanie Neumann hergestellt. Zur Selektion dieser Zellen wurde dem Medium zusätzlich 1 $\mu$ g/ml Puromycin (Sigma) zugesetzt.

### **3.2.2 Zellkultivierung**

Die Zellen wurden wahlweise in 10 cm (10 ml)- oder 6 cm (5 ml)- Schalen (Nunc) in einem Zellinkubator (Hera Cell, Heraeus) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zellkulturbezogenen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (Hera Safe, Heraeus) durchgeführt, zum Pipettieren wurden serologische Einwegpipetten (Sarstedt) und eine elektrische Pipettierhilfe (Accu Jet Pro, Brand) benutzt. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dabei wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1,5ml einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline, 14 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen, mit 1ml Trypsin (Gibco) für 3 min bei 37°C inkubiert, durch leichtes Beklopfen der Kulturschale abgelöst, in 4ml frischem Medium resuspendiert und anschließend in neue Kulturschalen überführt. Dabei wurden die Zellen um den Faktor 1:10-1:20 verdünnt. Um die Zellen für nachfolgende Transfektionen in der gewünschten Zelldichte auszusäen, wurden diese in der Neugebauer Zählkammer manuell ausgezählt. Anschließend erfolgte die Aussaat in poly-L-Lysin beschichtete 24 Well Platten (BD) oder 6 cm Schalen. Die Kryokonservierung von Zelllinien erfolgte aus einer 50% konfluenten 10 cm Schale durch Abzentrifugation des Zellpellets bei Raumtemperatur (RT)/1000 upm für 5 min. Anschließend wurde das Pellet in 1ml Einfriermedium (90%FCS, 10% DMSO) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen (Sarstedt) abgefüllt. Dann erfolgte die Lagerung bei -80°C für 24h, anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden diese bei RT aufgetaut, anschließend in ein 15 ml-Falcon-Gefäß mit 5 ml Basismedium überführt, das Zellpellet wie beschrieben abzentrifugiert und erneut in 5 ml Basismedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Aussaat in einer 6 cm Schale.

### **3.2.3 Transiente liposomale Transfektion mit Plasmid-DNA**

5 ml einer Suspension von HEK-293e beziehungsweise HEK-293e/FLAG-SNX33 Zellen in Basismedium mit einer Dichte von  $3,5 \times 10^5$  Zellen/ml wurden in Poly-L-Lysin beschichtete 6 cm Schalen ausplattiert. 16h später erfolgte die Transfektion mit dem lipidbasierten Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen). Dazu wurde die jeweilige Plasmid-DNA (100-5000 ng [200 ng/µl] in 1.5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt) mit 250 µl Optimem Medium (Invitrogen) versetzt. In

einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 15 µl Lipofectamin 2000 mit 250 µl Optimem für 10 s mit einem Standschüttler vermischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lipofectamin-Optimem Lösung zum Reaktionsgefäß mit der DNA-Optimem Lösung hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde dann tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. 24h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt, weitere 24 h später erfolgte die Zellyse.

#### **3.2.4 Transienter „Knock-down“ von SNX33 mittels siRNA Oligonukleotiden**

Die verwendeten siRNA Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Dabei wurde eine Mischung (Pool) von vier siRNAs gegen SNX33 verwendet. Die vier Einzelsequenzen der siRNA Oligonukleotide wurden von der Firma nicht zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle wurde ein siRNA Pool verwendet, dessen einzelnen Oligonukleotide keine spezifische Zielsequenz innerhalb des humanen Genoms erkennen. Die siRNA Oligonukleotide wurden in RNase freiem Wasser und einem speziellen RNA stabilisierendem Puffer (Dharmacon) gelöst. Diese 20 µM Stammlösung wurde dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Für die Transfektion von HEK-293e Zellen wurden diese wie unter 3.2.3 beschrieben ausgesät. 2h nach der Aussaat erfolgte die Transfektion mit Lipofectamin 2000. Dazu wurden 25 µl der 20 µM siRNA Stammlösung in 1.5 ml Reaktionsgefäßen mit 250 µl Optimem (Gibco) Medium versetzt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 20 µl Lipofectamin 2000 mit 250 µl Optimem für 10 s mit einem Standschüttler vermischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lipofectamin-Optimem Lösung zum Reaktionsgefäß mit der DNA-Optimem Lösung hinzugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde dann tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. 24h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt, weitere 24 h später erfolgte die Zellyse.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

**Tabelle 9: Herstellung von Zelllysaten**

Standardlysepuffer	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 2mM EDTA, Proteaseinhibitor-Mix (PI-Mix, Sigma)
KSHM-Puffer	100 mM K-Acetat, 85 mM Sucrose, 1 mM Mg-Acetat, 20 mM HEPES/KOH pH7,4, PI-Mix
Hypotoner Puffer (BN-PAGE)	15 mM Citrat pH 6,4; 1 mM EDTA pH8, 40% (v/v) Glycerol, PI-Mix
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus
BCA Kit	Uptima, Interchim
0,22 µM Sterilfilter	Millipore
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K, Beckmann-Coulter

#### Standardlyse:

Um Zelllysate zu gewinnen, wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen, in 500 µl (24 Well Format), 800 µl (6 cm Schale) oder 1 ml (10 cm Schale) Standardlysepuffer abgelöst, für 30 min in einem 1.5ml Reaktionsgefäß auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C/13000 upm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Kit nach Angaben des Herstellers. Die Zelllysate wurden direkt weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

#### Lyse für Gelfiltration und GST (Glutathion-S-Transferase) – „Pull down“:

30 x 10 cm Schalen HEK-293e Zellen wurden in je 1ml PBS abgelöst und bei 4°C/3500 upm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x in PBS, 2x in KSHM-Puffer gewaschen (jeweils nach Zentrifugation bei 4°C/3500 upm für 5 min). Dann wurden die Zellen im zweifachen des Zellvolumens in KSHM-Puffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt und die Membranfraktion bei 4°C/3500 upm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand (Zytosolfraktion) wurde bei 4°C/40.000 upm für 30 min von zellulärem Debris geklärt. Für den „Pull down“ mit GST/GST-Fusionsproteinen wurde die Zytosolfraktion mit einer finalen Konzentration von 0,1% Triton X-100

versetzt und für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Für die Verwendung der Zytosolfraktion in der Gelfiltration wurde der Überstand mit einem 0,22 µM Filter sterilfiltriert, in 600 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

#### Lyse für Blue Native – Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE):

Eine konfluente 10 cm Schale mit HEK-293e Zellen wurde in 500 µl PBS abgelöst, die Zellen anschließend bei 4°C/1000 upm für 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Zugabe des hypotonen Puffers wurde die OD<sub>605</sub> gemessen und durch Verdünnen mit hypotonem Puffer auf 2,0 eingestellt. Je 1% Brij 35 (Pierce) und Lubrol (Serva) wurden dem Zelllysatz zugesetzt, dieses dann vier mal für jeweils 3 s in Abständen von 5 min mit einem Standschüttler gevortext. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C/7000 upm für 20 min. Der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von Triton X-100 in einer finalen Konzentration von 0,7-1% bei 4°C/130.000 g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.3.2 Immunpräzipitation

#### **Tabelle 10: Immunpräzipitation**

STEN-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,5% NP40
STEN-NaCl-Puffer	500 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,5% NP40
Protein G Sepharose (PGS)	Sigma, Stocklösung in 20% Ethanol. Wurde vor Verwendung 4x in PBS gewaschen und anschließend wieder auf das ursprüngliche Volumen mit PBS aufgefüllt
Überkopfschüttler	GFL
Kühltischzentrifuge	Biofuge fresco, Hereaus
FLAG Antikörper	FLAGM2, Sigma, 1:100, Maus
HA Antikörper	HA.11, Covance, 1:100, Maus
SNX33 Antikörper	Klon 2A1, Elisabeth Kremmer, LMU, 1:10, Ratte
SNX1 Antikörper	T-19, Santa Cruz Antibodies, 1:50, Goat

Das Zelllysate wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis zuerst mit 30 µl PGS und anschließend dem jeweiligen Antikörper versetzt. Dann folgte eine Inkubation für 2h bei 4°C/30 upm im Überkopfschüttler. Anschließend wurde die PGS einmal mit STEN-NaCl-Puffer und zweimal mit STEN-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C/8000 upm für 3 min in einer Kühltischzentrifuge. Dann wurde der Überstand abgesaugt, die feuchte PGS mit einer Hamilton-Spritze von Restflüssigkeit befreit und anschließend in 30 µl 4-fach Laemmli Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 min aufgekocht.

### 3.3.3 GST-„Pull down“-Assay

**Tabelle 11: Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen und GST-„Pull down“**

pGEX Plasmid	GE Healthcare
Standschüttler	Certomat BS-1, Braun Biotech International
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG, Peqlab
Lysozymlösung	Merck, 10mg/ml Lysozym in 25mM Tris pH 8,0
Sonifier	Cell Disruptor B15, Branson
Glutathion-Sepharose 4B Beads	Amersham Biosciences
Poly-Prep Chromatographie Säule	Biorad
Urea	Serva, 8 M

#### Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen:

Zunächst erfolgte die Transformation von E.coli BL21 Zellen mit den entsprechenden pGex Plasmiden (cDNA für GST beziehungsweise SH3-GST, GE Healthcare) wie unter Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Mit den transformierten Klonen wurde 5ml Ampicillin-LB-Medium angeimpft und bei 37°C/200 upm für 16h im Standschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur mit LB-Medium auf eine OD<sub>605</sub> von 0,5 verdünnt, mit 1 µM 0,1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid versetzt und 4 h bei 37 °C/200 upm im Standschüttler inkubiert. Das Bakterienpellet wurde abzentrifugiert, in 4-fach Laemmli Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot



auf Expression überprüft. Daraufhin wurden 400 ml Ampicillin-LB-Medium mit dem Klon der Wahl angeimpft. Nach 12-16 h Inkubation wurde das Zellpellet bei 4°C/5000 upm für 15 min abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die Pellets aufgetaut, in 10 ml PBS und PI-Mix (1:500) resuspendiert, mit 500 µl Lysozymlösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Sonifikation der Zellen für 5x 30 s bei 30% der maximalen Amplitude und eine Zentrifugation bei 4°C/10000 upm für 30 min. Dann wurde der Überstand mit PBS und PI-Mix (1:500) auf 50 ml aufgefüllt und 6x mal mit der PBS Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 5ml Glutathion-Sepharose für 2h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Dann wurde die Sepharose in 5ml PBS und PI-Mix (1:500) gelöst und auf eine Poly-Prep Chromatographie Säule aufgetragen und mit 50 mM Tris pH8,0 äquilibriert. Die Elution des GST und GST-Fusionsproteins erfolgte mit 10ml einer 8 M Urea Lösung.

#### GST-„Pull down“ im Zelllysate:

2 ml des unter 3.3.1 beschriebenen Zelllysats mit einer Proteinkonzentration von 8 mg/ml wurden mit einem 25 µl Mix aus GST/GST Fusionsprotein und Glutathion-Sepharose (Mischungsverhältnis 2,3:1) versetzt und 2h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose wie unter 3.3.2. beschrieben 5x mit STEN-Puffer gewaschen und in 30 µl 4-fach Laemmli Probenpuffer aufgekocht.

### 3.3.4 Immunfluoreszenz

#### **Tabelle 12: Immunfluoreszenz**

Fixationsmedium	4% Paraformaldehyd (PFA)
Permeabilisierungspuffer	0.1% Saponin, 8mM PIPES, 0.5mM EGTA, 0.1mM MgCl <sub>2</sub> , 2% BSA
0,05% Saponin in PBS	Saponin (Sigma)
PBS	140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KCl, 1,75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Mowiol	Roth, 15% Mowiol in H <sub>2</sub> O
Deckgläser	Roth
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	LSM 510 Meta, Zeiss

LSM Image Examiner	Zeiss
Phalloidin	Alexa Fluor 488 Phalloidin, 6,6 $\mu$ M, Invitrogen
HA Antikörper	HA.11, Covance, 1:1000, Maus
Zweitantikörper	Alexa 555 anti-mouse, 1:500, Ziege, Invitrogen
Feuchte Kammer	Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) wurde mit Antikörper in 0,05% Saponin in PBS benetzt, auf diesen wurde dann das Deckglas mit der Zellseite nach unten gelegt. Dabei wurde die Oberflächenspannung des Flüssigkeitstropfens ausgenutztum die Deckgläser auf der Antikörperlösung schwimmen zu lassen.

12 mm Deckgläser wurden in 24 Well Platten mit Poly-L-Lysin (1:100 in H<sub>2</sub>O) für 30 min bei RT beschichtet und anschließen zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. HeLa Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,7 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät (500  $\mu$ l Zellsuspension/Well) und 24h später wie unter Abschnitt 3.2.3 mit 2000ng Plasmid DNA und 2  $\mu$ l Lipofectamin 2000 transfiziert. 5 h nach Transfektion wurde das Medium durch Basalmedium ersetzt, nach weiteren 16h erfolgte die Fixation der Zellen für die Immunfluoreszenz. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, mit Ausnahme der PFA-Fixation, dem Neutralisieren des PFA und der Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper (alle bei RT). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min mit Fixationsmedium inkubiert. Dann wurde das Fixationsmedium abgesaugt und für 2 min mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl neutralisiert. Die Zellen wurden erneut in PBS gewaschen, für 5 min mit dem Permeabilisierungspuffer permeabilisiert, in 0,05% Saponin in PBS gewaschen und für 20 min mit dem Primärantikörper (1:1000 in 0,05% Saponin in PBS) beziehungsweise Phalloidin in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen in 0,05% Saponin in PBS erfolgte dann die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Die Zellen wurden anschließend mit 0,05% Saponin in PBS und ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann mit Mowiol auf einem Glasobjektträger fixiert und für 24 h bei RT getrocknet. Anschließend erfolgte die Analyse mit einem invertierten konfokalen Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Bildauswertungssoftware LSM Image Examiner.

### 3.3.5 Gelfiltration

**Tabelle 13: Gelfiltration**

Gelfiltrationsapparat	Äkta purifier, Amersham
Säule	Superose 6 10/300 GL, GE Healthcare
Elutionspuffer	125mM K-Acetat, 25mM HEPES und KOH pH 7,0

Die Zytosolfraktion von dreißig 10 cm Schalen mit 100% konfluenten HEK-293e Zellen wurde wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben präpariert. Die Zytosolfraktion wurde kurz vor dem Auftrag auf die Säule auf 125 mM K-Acetat und 1 mM Dithiothreitol äquilibriert. Die Säule wurde mit 125mM K-Acetat, 25mM HEPES und KOH pH 7,0 äquilibriert. Anschließend wurden 300 µl der äquilibrierten Zytosolfraktion (Proteinkonzentration 8 mg/ml) mit einer Hamilton-Spritze auf die Säule aufgetragen. Die Gelfiltration wurde mit einer Flußrate von 0,3 ml/min durchgeführt, 40 Fraktionen zu je 500 µl wurden gesammelt. Die Kalibrierung der Säule erfolgte durch Elution der Größenstandards Dextran-Blau (Leervolumen, Void Volume,  $V_0$ ), Thyreoglobulin (669 kDa) und Immunglobulin G (150 kDa) in PBS. Anschließend wurden jeweils zwei Fraktionen vereinigt, die eluierten Proteinkomplexe wie unter Abschnitt 3.3.6 beschrieben mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, in 30 µl 4-fach Laemmli Probenpuffer aufgekocht und anschließend im Western Blot detektiert.

### 3.3.6 TCA Fällung

Ein Neuntel des Probenvolumens 50% TCA Lösung (Sigma) wurde in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit der Zytosolfraktion versetzt und mittels eines Standschüttler gevortext. Anschließend erfolgte eine 10 min Inkubation auf Eis. Das TCA Präzipitat wurde bei 4°C/13000 upm für 15 min in einer Kühltischzentrifuge abzentrifugiert und zweimal mit je 1ml eiskaltem Aceton (Merck) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 45 min bei RT getrocknet. Dann wurde das Pellet in 30 µl 4x Laemmli Probenpuffer aufgekocht und anschließend im Western Blot detektiert.

### 3.3.7 Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)

**Tabelle 14: SDS PAGE**

4x Laemmli Probenpuffer	0,25 M TRIS/HCL ph 6,8, 8% SDS (v/v), 40% Glycerin (v/v), 1 Spatelspitze Bromphenolblau, in dH <sub>2</sub> O
4x Lower TRIS	1,5 M TRIS pH 8,8, 0,4% SDS (v/v) in d dH <sub>2</sub> O
4x Upper TRIS	0,5 M TRIS pH 8,8, 0,4% SDS (v/v) in d dH <sub>2</sub> O
Acrylamid	40%, Serva
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Roth
APS	10% (w/v), Ammoniumpersulfat, SIGMA
10x TRIS-Glycine	0,24 M TRIS Base, 0,2 M Glycine (v/v), Roth, dH <sub>2</sub> O ad 5 l (für 10x TRIS-Glycine/SDS, zusätzlich 0,1% SDS (v/v))
Größenmarker See blue plus 2	Invitrogen
Mini-Protean Minigelsystem	Biorad
Netzteil Power Pac 300	Biorad
Gelständer-, -platten und -kämme	Biorad

SDS PAGE wurde zur eindimensionalen elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einem diskontinuierlichen Gelsystem benutzt (97). Die Gele wurden dabei eigenhändig mit dem Minigelsystem von Biorad nach Angaben des Herstellers angefertigt. Die verwendeten Gele waren 1,5 mm dick und hatten 15 Taschen. Pro Tasche konnte ein maximales Probenvolumen von 30 µl geladen werden.

**Tabelle 15: Pipettierschema für 8% TRIS-Glycine-Polyacrylamidgel**

<b>Substanz:</b>	<b>Menge:</b>
<b>Trenngel:</b>	
Acrylamid 40%	7,8 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,2 ml
4x Lower TRIS	4 ml
APS	30 µl
TEMED	30 µl
<b>Σ=</b>	<b>16 ml</b>
<b>Sammelgel:</b>	
Acrylamid 40%	1,3 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,5 ml
4x Upper TRIS	2,5 ml
APS	30 µl
TEMED	30 µl
<b>Σ=</b>	<b>10,3 ml</b>

Das Mischen der Sammel- und Trenngele wurde bei RT und mittels eines Standschüttlers (Vortex Genie 2, Scientific Industries) durchgeführt. Die Gele wurden bei RT geladen, das Einlaufen fand bei 90 V statt, das weitere Gel wurde dann bei 140 V gefahren. Als Laufpuffer wurde TRIS-Glycine/SDS verwendet. Die verwendeten Proben (maximales Volumen 30 µl) wurden vor dem Gelauftrag mit der entsprechenden Menge 4-fach Laemmli Probenpuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Harnstoffgele wurden aufgrund des überlegenen Laufverhaltens für den Nachweis TCA präzipitierter Proteine verwendet.

**Tabelle 16: Pipettierschema für 10% Harnstoff-Polyacrylamidgel**

<b>Substanz:</b>	<b>Menge:</b>
<b>Trenngel:</b>	
Harnstoff 8M	3,92 ml
Acrylamid 30%	3,73 ml
ddH <sub>2</sub> O	0,75 ml
4x Lower TRIS	2,8 ml
APS	22,6 µl
TEMED	22,6 µl
<b>Σ=</b>	<b>22,5 ml</b>
<b>Sammelgel:</b>	
Harnstoff 8M	1,88 ml
Acrylamid 30%	0,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	0,55 ml
4x Upper TRIS	0,94 ml
APS	11,3 µl
TEMED	11,3 µl
<b>Σ=</b>	<b>3,89 ml</b>

### 3.3.8 Blue Native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN PAGE)

**Tabelle 17: BN PAGE**

Acrylamid Lösung	49,5% Acrylamid (v/v) (Serva), 3% Bis-Acrylamid (v/v) (Serva) in dH <sub>2</sub> O
3x Gelpuffer	200 mM E-Amino-Caproic-Acid, 150 mM BisTris, pH 7,0
Glycerol	65 % (w/v) in dH <sub>2</sub> O
5x Anoden-Puffer	250 mM BisTris, pH 7,0
5x Kathoden-Puffer	250 mM Tricine, 75 mM BisTris, pH 7,0
10x Ladepuffer	5% Coomassie Blau brilliant G (Fluka), 500 mM mM E-Amino-Caproic-Acid, 100 mM BisTris
Mighty small casting System	Hoefler

Gelständer-, -platten und -kämme	Hofer
Netzteil EPS-601	Electrophoresis Power Supply, GE Healthcare

Um Proteine beziehungsweise Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen eindimensional aufzutrennen wurde eine native Gelelektrophorese nach Schagger durchgeführt (98). Die Gele wurden mit dem Mighty Small casting System (Hofer) nach Angaben des Herstellers eigenhändig angefertigt.

**Tabelle 18: Pipettierschema für ein natives 7% Gel nach Schagger**

<b>Substanz:</b>	<b>Menge:</b>
<b>Trenngel:</b>	
Acrylamid Lösung	1,65 ml
Glycerol 65% (w/v)	3,69
ddH <sub>2</sub> O	2,85 ml
3x Gelpuffer	4 ml
APS	80 µl
TEMED	8 µl
<b>Σ=</b>	<b>12 ml</b>
<b>Sammelgel:</b>	
Acrylamid Lösung	0,6 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,4 ml
3x Gelpuffer	2,5 ml
APS	90 µl
TEMED	9 µl
<b>Σ=</b>	<b>7,5 ml</b>

Die Proben wurden wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben präpariert und anschließend bei 4°C auf das Gel aufgetragen. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgte bei 100 V. Anschließend wurde die Spannung auf 500 V erhöht. Als Laufpuffer wurden ein BisTris-Anoden- und eine Tricine/BisTris-Kathodenpuffer

verwendet. Es wurden 9 µl Probe plus 1 µl 10-fach Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Die Menge an Gesamtprotein betrug dabei 5-10 µg.

### 3.3.9 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Blau

**Tabelle 19: Coomassie Färbung**

Färbelösung	50% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 1% (v/v) Coomassie Blau brilliant G, in dH <sub>2</sub> O
Entfärbelösung	5% (v/v) Isopropanol, 7% (v/v) Essigsäure, in dH <sub>2</sub> O
Horizontalschüttler	Duomax 1030, Heidolph
Vakuumheiztrockner	Slab Gel Dryer, Savant

Das SDS-Gel wurde mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend auf einem Horizontalschüttler für 1h bei RT mit der Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und durch Entfärbelösung ersetzt. Die Entfärbelösung wurde nach jeweils 10 Minuten durch frische Entfärbelösung ersetzt. Dieses Vorgehen wurde solange beibehalten, bis die gefärbten Proteinbanden visuell eindeutig vom Gelhintergrund unterschieden werden konnten. Anschließen wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und bei 4°C in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt. Das restliche Gel wurde auf einem Vakuumheiztrockner für 12h bei 50 °C getrocknet und anschließend bei RT aufbewahrt.

### 3.3.10 Western Blot

**Tabelle 20: Western Blot**

PBS-Tween	140 mM NaCl, 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCL, 1% Tween-20 (Merck), in dH <sub>2</sub> O
Milchlösung	5% Magermilchpulver (Töpfer) in PBS-Tween
10x Transferpuffer	0,24 M TRIS, 0,2 M Glycine (Roth), in dH <sub>2</sub> O
Mini-Protean Blotting System	Biorad
Filterpapier Whatman	Schleicher&Schuell
PVDF Membran	Millipore



ECL-System	GE Healthcare
Gelstände, -platten und -kämme	Hofer
Netzteil EPS-601	Electrophoresis Power Supply, GE Healthcare
Röntgenfilm	Super RX, Fujifilm
Entwicklerlösung	Developer 153, AGFA
Fixationslösung	Rapid Fixer G354, AGFA
Entwickler	Cawomat 2000 IR, Cawo
Chemolumineszenz	LAS-4000 Fujifilm
Kamera und Software	
Bildauswertungssoftware	Multi Gauge, Fujifilm
<u>Primärantikörper:</u>	in PBS-Tween und 5% BSA gelöst
2A1	anti-SNX33, Elisabeth Kremmer, LMU, 1:100, Ratte
67	anti-SNX33, Eurogentec Seraing, Belgium, 1:500 Kaninchen (gegen ein synthetisches Peptid der SNX33 LC Domäne gerichtet: FRPKPPLERQDSLASC)
6C6	anti-SNX9, Elisabeth Kremmer, LMU, 1:200, Ratte
HA.11	anti-HA Tag, Covance, 1:1000, Maus
3F10	anti-HA Tag, Roche, 1:1000, Maus
FLAGM2	anti-FLAG Tag, Sigma, 1:2000, Maus
Dyn1/2	anti-Dynamin ½, Cell Signaling, 1:1000, Kaninchen
<u>Sekundärantikörper:</u>	in PBS-Tween und 5% BSA gelöst
α-mouse-HRP	anti-Maus IgG, Promega, 1:10000, Ziege
α-rabbit-HRP	anti-Kaninchen IgG, Promega, 1:10000, Ziege
α-rat-HRP	anti-Ratten IgG, Santa Cruz, 1:5000, Ziege

Nach der wie in Abschnitt 3.3.7 und 3.3.8 beschriebenen eindimensionalen Trennung von Proteinen erfolgte deren Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran. Alle Schritte fanden bei RT statt. Zunächst wurde die Proteinbindekapazität der Membran durch kurzes Schwenken in Isopropanol erhöht. Anschließend wurde die Membran unter fließendem dH<sub>2</sub>O abgespült. Dann erfolgte der Aufbau des Transfers in Transferpuffer in folgender Reihenfolge: Anodenplatte, poröser Schwamm, 2 Lagen Filterpapier, Membran, SDS oder BN Gel, 2 Lagen Filterpapier, poröser Schwamm, Kathodenplatte. Anschließend wurde die Transferkammer mit Transferpuffer aufgefüllt und ein Kühlelement hinzugefügt. Der

Transfer fand dann bei 400mA für 60 min statt. Beim Transfer von BN Gelen wurden die Membran nun durch Schwenken in Isopropanol und dH<sub>2</sub>O von Coomassie Blau befreit. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Milchlösung inkubiert, zweimal mit PBS-Tween gewaschen, zweimal für je 5 min auf dem Horizontalschüttler inkubiert und für 60 min mit dem Primärantikörper inkubiert. Nun wurde erneut zweimal mit PBS-Tween gewaschen, zweimal für je 5 min auf dem Horizontalschüttler inkubiert und für 45 min mit dem Meerrettichperoxidase- (HRP, Horseradish Peroxidase) gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Dann wurde viermal für je 5 min mit PBS-Tween gewaschen und die Membran mit dem ECL-Kit nach Herstellerangaben entwickelt und die Signale auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Zur Quantifizierung der Signalintensitäten wurde eine Kamera mit „Charge-couple device“- (CCD) Sensor nach Angaben des Herstellers benutzt. Die Auswertung erfolgte dann mit der Bildauswertungssoftware Multi Gauge von Fujifilm.

### 3.3.11 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen durch Elektrosprayionisation

**Tabelle 21: Massenspektrometrie**

Ammoniumbicarbonatpuffer	40 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
Elutionslösung	0,1% Ameisensäure (Merck), 50% Methanol in HPLC-Grad H <sub>2</sub> O in Ammoniumbicarbonatpuffer 0,02 µg/µl.
Trypsin Sequenziergrad	Promega
Acetonitril	Chromasolv, Sigma
H <sub>2</sub> O	Lichrosolv, Merck
Zip-Tip C18	Eppendorf
Q-Star	Applied Biosystems
Massenspektrometer	

Nach dem unter Abschnitt 3.3.3 beschriebenen „Pull down“ potentieller Interaktionspartner des SH3-GST Fusionsproteins erfolgte die massenspektrometrische Bestimmung der kopräzipitierten Proteine durch Dr. Lars Israel. Dazu wurden nach SDS Page (Abschnitt 3.3.7) und Färbung des Gels mit

Coomassie Blau (Abschnitt 3.3.9) einzelne Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten und mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke durch mehrere Waschschriffe mit 50% (v/v) Acetonitril und schließlich 100% Acetonitril entfärbt. Die entfärbten Gelstücke wurden dann mit 2 Einheiten Trypsin in 50 µl Ammoniumbicarbonatpuffer für 16h bei 37°C verdaut. 10 µl des Verdauansatzes wurde dann mittels Zip-Tip Pipettenspitzen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, mit einem Q-Star Massenspektrometer durch Elektrospray ionisiert und anschließend im LC-MS/MS Modus gemessen. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Daten durch Abgleich mit der „Mascot in house“ Datenbank.

### 3.4 Herstellerverzeichnis

**Tabelle 25: Hersteller der verwendeten Geräte, Verbrauchsmittel und Reagenzien**

Applied Biosystems	Darmstadt, <a href="http://www.appliedbiosystems.com">http://www.appliedbiosystems.com</a>
BD Biosciences	Heidelberg, <a href="http://www.bdbiosciences.com">http://www.bdbiosciences.com</a>
Beckmann Coulter	Krefeld, <a href="http://www.beckmancoulter.de">http://www.beckmancoulter.de</a>
Bio Rad	München, <a href="http://www.bio-rad.de">http://www.bio-rad.de</a>
Brand	Wertheim, <a href="http://www.brand.de">http://www.brand.de</a>
Branson	Danbury, CT, USA, <a href="http://www.bransonultrasonics.com">http://www.bransonultrasonics.com</a>
Braun Biotech Int.	Göttingen, <a href="http://www.sartorius.de">http://www.sartorius.de</a>
Cawo	Schrobenhausen, <a href="http://www.cawo.com">http://www.cawo.com</a>
Cell Signaling	Beverly, MA, USA, <a href="http://www.cellsignal.com">http://www.cellsignal.com</a>
Covance	Princeton, NJ, USA, <a href="http://www.covance.com">http://www.covance.com</a>
Dharmacon	Waltham, MA, USA, <a href="http://www.dharmacon.com">http://www.dharmacon.com</a>
Edgebio	Gaithersburg, MD, USA, <a href="http://www.edgebio.com">http://www.edgebio.com</a>
Eppendorf	Hamburg, <a href="http://www.eppendorf.de">http://www.eppendorf.de</a>
Eurogentec	Köln, <a href="http://www.eurogentec.com">http://www.eurogentec.com</a>
Fermentas	Helsinki, <a href="http://www.fermentas.com">http://www.fermentas.com</a>
Fluka	München, <a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
Fujifilm	Kiel, <a href="http://www.fujifilm.de">http://www.fujifilm.de</a>
GATC	Konstanz, <a href="http://www.gatc.de">http://www.gatc.de</a>
GE Healthcare	München, <a href="http://www.gehealthcare.com">http://www.gehealthcare.com</a>
Gibco	Karlsruhe, <a href="http://www.invitrogen.com">http://www.invitrogen.com</a>
Gilson	Den Haag, <a href="http://www.gilson.com">http://www.gilson.com</a>
Heidolph	Schwabach, <a href="http://www.heidolph-instruments.de">http://www.heidolph-instruments.de</a>
Hereaus	Hanau, <a href="http://www.heraeus.de">http://www.heraeus.de</a>

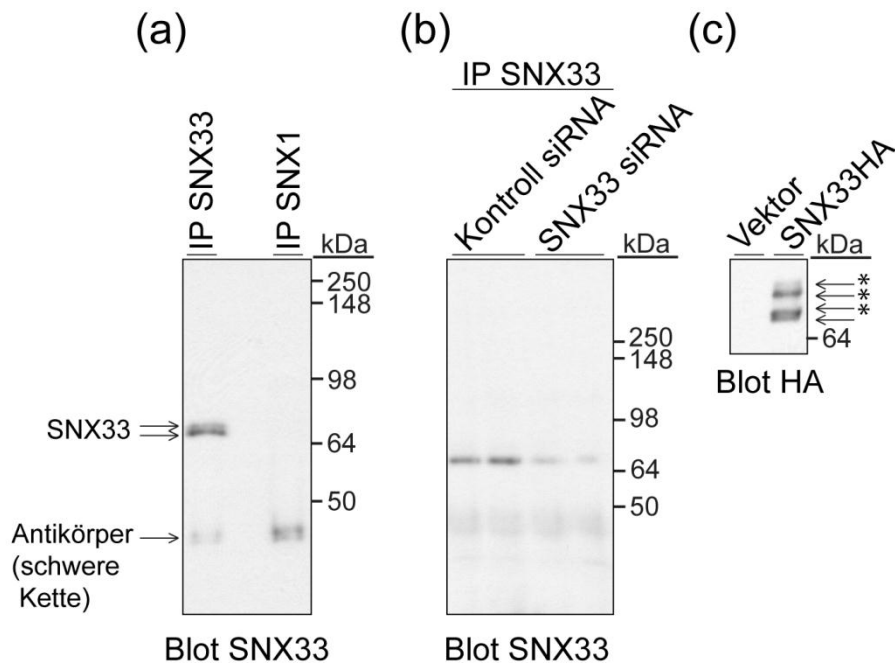
---

HLC Biotech	Bovenden, <a href="http://www.hlc-biotech.de">http://www.hlc-biotech.de</a>
Hoefler	San Francisco, <a href="http://www.hoeferinc.com">http://www.hoeferinc.com</a>
Intas	Göttingen, <a href="http://www.intas.de">http://www.intas.de</a>
Invitrogen	Karlsruhe, <a href="http://www.invitrogen.com">http://www.invitrogen.com</a>
Macherey-Nagel	Düren, <a href="http://www.mn-net.com/">http://www.mn-net.com/</a>
Merck	Darmstadt, <a href="http://www.merck.de">http://www.merck.de</a>
Millipore	Schwalbach, <a href="http://www.millipore.com">http://www.millipore.com</a>
Mitsubishi	Ratingen, <a href="http://www.mitsubishiprinter.net">http://www.mitsubishiprinter.net</a>
New England Biolabs	Franfurt a. M., <a href="http://www.neb-online.de">http://www.neb-online.de</a>
Nunc	Wiesbaden, <a href="http://www.nunc.de">http://www.nunc.de</a>
Owl Separation Syst.	Wiesbaden, <a href="http://www.owlsci.com">http://www.owlsci.com</a>
Pechiney Plastic Pack.	Chicago, IL, USA, <a href="http://www.packworld.com">http://www.packworld.com</a>
Peqlab	Erlangen, <a href="http://www.peqlab.de">http://www.peqlab.de</a>
Pierce	München, <a href="http://www.piercenet.com">http://www.piercenet.com</a>
Promega	Mannheim, <a href="http://www.promega.com">http://www.promega.com</a>
Roche	Grenzach, Basel <a href="http://www.roche.de">http://www.roche.de</a>
Roth	Karlsruhe, <a href="http://www.carl.roth.de">http://www.carl.roth.de</a>
Santa Cruz Biotech.	Santa Cruz, <a href="http://www.scbt.com/">http://www.scbt.com/</a>
Sartstedt	Nümbrecht, <a href="http://www.sarstedt.com">http://www.sarstedt.com</a>
Schleicher u. Schuell	Dassel, <a href="http://www.schleicher-schuell.de">http://www.schleicher-schuell.de</a>
Scientific Industries	Karlsruhe, <a href="http://www.scientificindustries.com/">http://www.scientificindustries.com/</a>
Serva	Heidelberg, <a href="http://www.serva.de">www.serva.de</a>
Sigma (Sigma–Aldrich)	Taufkirchen, <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>
Thermo-Scientific	München, <a href="http://www.thermo.com">www.thermo.com</a>
Uptima / Interchim	San Pedro, CA, USA, <a href="http://www.interchim.com">http://www.interchim.com</a>
Zeiss	Göttingen, <a href="http://www.zeiss.de">http://www.zeiss.de</a>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. SNX33 Expressionsniveau

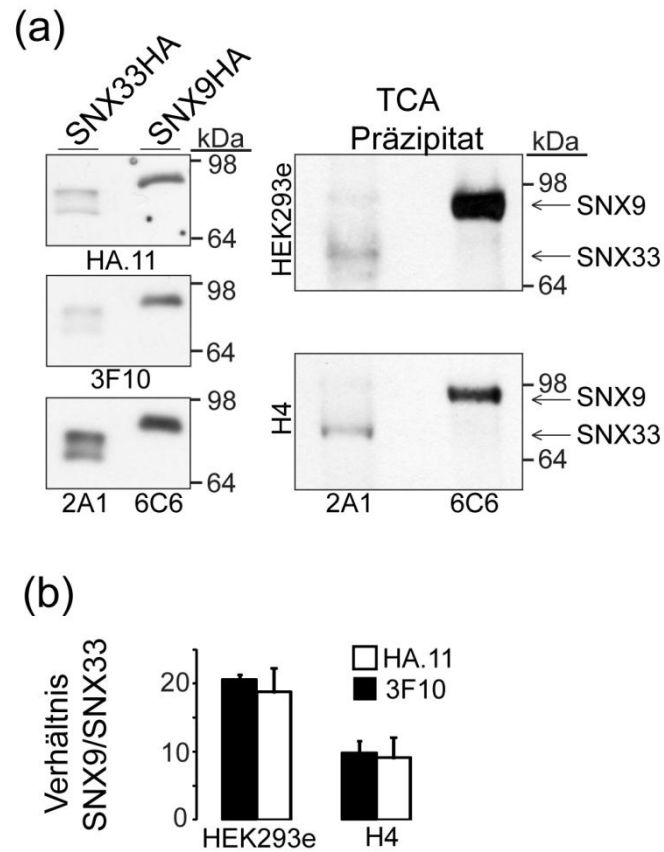
SNX33 besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 65 kDa, migriert unter denaturierenden Bedingungen in der Gelelektrophorese jedoch bei 75 kDa. Im Western Blot ist eine Doppelbande detektierbar, wobei die obere Bande die phosphorylierte Variante dieses Proteins darstellt (12). Endogenes SNX33 konnte nicht im Direktauftrag mittels Western Blot detektiert werden, jedoch nach Immunpräzipitation mit dem SNX33 spezifischen Antikörper 2A1 (Abbildung 6). Als Spezifitätskontrolle erfolgte die Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen SNX1. In diesem Ansatz konnte im Western Blot jedoch kein Signal mit dem 2A1 Antikörper detektiert werden. Der transiente „Knock down“ von endogenem SNX33 mit sequenzspezifischer „short interfering“ RNA (siRNA) führte zu einer Abnahme des SNX33 Signals im Western Blot, wodurch die Spezifität der verwendeten Antikörper (Klon 2A1 und Klon 67) bestätigt werden konnte (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Detektion von endogenem und überexprimiertem SNX33 in HEK293e Zellen im Westernblot** (a) Immunpräzipitation von endogenem SNX33 aus HEK-293e Zellen mit dem SNX33 spezifischen Antikörper 2A1. Anschließend Detektion mit dem SNX33 spezifischen Antikörper 67. Als Kontrolle wurde parallel eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen SNX1 durchgeführt. SNX33 erscheint als Doppelbande, wobei die obere Bande der phosphorylierten Form von SNX33 entspricht (b) Transienter Knockdown von SNX33 mit SNX33-siRNA oder Kontroll-siRNA in HEK-293e Zellen. Anschließend Immunpräzipitation und Detektion im Westernblot wie unter (a) beschrieben (c) Transiente Überexpression von SNX33 in HEK-293e Zellen. Das SNX33 Konstrukt wurde mit einem C-terminalen HA-Tag versehen und im Direktauftrag mit einem HA-Antikörper detektiert. Die unter (a) beschriebenen SNX33 Doppelbande kann bei längerer Laufzeit des Proteins in der Gelelektrophorese nochmals in jeweils 2 Banden aufgelöst werden. Dabei stellen die drei mit (\*) markierten Banden verschiedenen phosphorylierte Spezies von SNX33 dar.

Aufgrund der schwachen SNX33 Signale im Western Blot wurde zunächst bestimmt, ob dieses Protein in den untersuchten Zelllinien nur sehr gering exprimiert ist oder ob die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen SNX33 nur wenig sensitiv sind. Es folgte eine Bestimmung des relativen SNX33 Expressionslevels im Vergleich zu dem stark exprimierten SNX9, welches im Direktauftrag nachweisbar ist (16; 62). Dafür wurden in einem ersten Schritt die Signalstärken der für die SNX33 und SNX9 Detektion verwendeten Antikörper verglichen. Mit einem C-terminalen HA-Tag versehenes SNX33 (SNX33-HA) und SNX9 (SNX9-HA) wurden transient in HEK-293e Zellen koexprimiert. Identische Aliquots des Zelllysats wurden dann im Western Blot mit jeweils zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen den HA-Tag (HA.11, 3F10) oder mit spezifischen Antikörpern gegen SNX33 (2A1) beziehungsweise SNX9 (6C6)

analysiert (Abbildung 7). Die Intensität der detektierten Banden wurde durch Chemolumineszenz bestimmt und die Signalstärke der SNX spezifischen Antikörper auf die Signalstärke der HA- Antikörper normiert. Der SNX33 Antikörper (2A1) zeigte eine zweifach höhere Signalstärke als der SNX9 Antikörper (6C6) (Abbildung 7a, linke 3 Kästen). Um nun den relativen Expressionslevel von SNX33 im Vergleich zu SNX9 zu bestimmen, wurden die endogenen Proteine mittels Trichloressigsäure (TCA) aus HEK-293e und H4 Zellen präzipitiert, auf einem 10% Harnstoffelektrophoretisch aufgetrennt und wiederum im Western Blot mit den Antikörpern 2A1 und 6C6 detektiert (Abbildung 7a, rechte 2 Kästen). Die Signalstärken der SNX spezifischen Antikörper, normiert auf die Signalintensität der HA- Antikörper, ließ in HEK-293e Zellen auf eine ~20-fach höhere SNX9 Expression im Vergleich zu SNX33, in H4 Zellen auf eine ~10-fach höhere Expression im Vergleich zu SNX33 schließen (Abbildung 7b). Die SNX33 Expression in den getesteten Zelllinien war also tatsächlich viel geringer als die SNX9 Expression. Daher wurde für einige der folgenden Experimente SNX33 mäßig überexprimiert, um eine Detektion des Proteins im Direktauftrag zu ermöglichen.



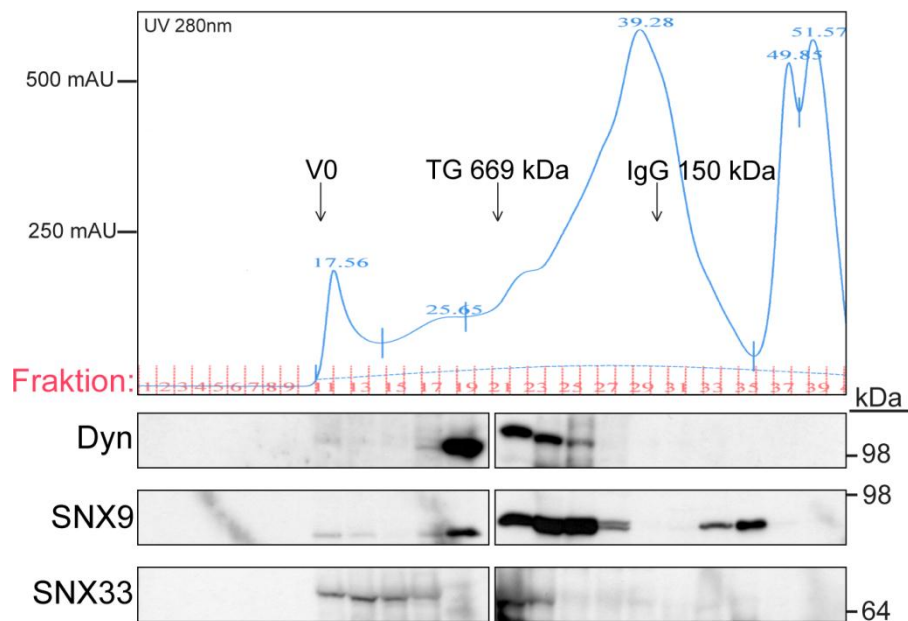
**Abbildung 7: Expressionslevel von SNX33 im Verhältnis zu SNX9 (a)** Linker Teil: Vergleich der Sensitivität des SNX33-2A1 Antikörper mit dem SNX9-6C6 Antikörper. HEK-293e Zellen wurden transient mit SNX33-HA und SNX9-HA transfiziert. Identische Aliquots des Zelllysats wurden mit zwei verschiedenen HA-Antikörpern (HA.11; 3F10) oder dem jeweiligen SNX33 beziehungsweise SNX9 spezifischen Antikörper detektiert (2A1; 6C6). Die Signalstärken der Banden des 2A1 und 6C6 Antikörpers wurden auf die Signalstärken der Banden der HA-Antikörper normalisiert: 2A1 zeigte im Vergleich zu 6C6 eine zweifach höhere Bandenintensität (2,0-fach beim Normalisieren auf HA.11, 1,8-fach beim Normalisieren auf 3F10). Rechter Teil: TCA Präzipitation und Detektion von endogenem SNX33 und SNX9 aus HEK-293e und H4 Zellen. Die Proben wurden auf einem 10% Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend wurde das Gel in zwei Teile geschnitten und mit dem 2A1 beziehungsweise 6C6 Antikörper analysiert. **(b)** Quantifizierung der Ergebnisse aus (a). Die Bandintensitäten des 2A1 und 6C6 Antikörpers aus der TCA Präzipitation wurden gemessen. Es wurden die korrigierten 6C6/2A1 Verhältnisse berechnet. Dies erfolgte aufgrund der Tatsache, dass 2A1 ein zweifach stärkeres Signal als 6C6 lieferte (im Vergleich zu den HA Antikörpern, siehe (a)). Dargestellt ist der relative Proteinlevel von SNX9 im Vergleich zu endogenem SNX33 (10-20-fach höher). Die gezeigten Western Blots stellen repräsentativ die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Balkendiagramme repräsentieren Mittelwerte, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken in beide Richtungen aufgetragen.



## 4.2 SNX33 ist Bestandteil eines höher molekularen Komplexes

Falls SNX33 wie andere SNXe in der Lage ist zu dimerisieren beziehungsweise über seine zahlreichen Protein-Protein Interaktionsdomänen mit anderen Proteinen interagiert, sollte ein Nachweis des endogenen Proteins in einem höher-molekularen Komplex möglich sein. Um diese Annahme zu überprüfen, erfolgte zunächst die Fraktionierung des Zelllysats nach der Größe der in wässriger Lösung vorhandenen Proteine und Proteinkomplexe durch Gelfiltrationschromatographie. Um keine nativen zytosolischen Proteinkomplexe zu zerstören wurden große Mengen an HEK-293e Zellen ohne Zugabe von Detergenzien lysiert und von der Membranfraktion durch Zentrifugation getrennt. Die so gewonnene Zytosolfraction wurde dann durch Ultrazentrifugation und Filtration von noch eventuell vorhandenen Zelltrümmern geklärt. Anschließend wurde die Zytosolfraction mit 0,1% Triton X-100 inkubiert und auf die stationäre Phase der Gelfiltrationssäule, welche aus einem auf Agarose basierenden Biopolymer bestand, aufgetragen. Das Eluat wurde auf 20 Fraktionen verteilt und die dort enthaltenen löslichen Proteine und Proteinkomplexe mittels TCA-Fällung präzipitiert. Dann erfolgte der Nachweis von SNX33 mit dem 2A1 Antikörper im Western Blot. Außerdem wurde ein Teil des Präzipitates verwendet, um in den einzelnen Fraktionen zusätzlich SNX9 und Dynamin2 nachzuweisen. SNX9 wurde als Positivkontrolle verwendet, da dessen Verhalten in der Gelfiltration bereits 2002 beschrieben wurde (17). Dynamin2 wurde in unserem Labor bereits als Interaktionspartner von SNX33 beschrieben, jedoch nur bei transienter Koexpression der beiden Proteine (12). SNX33 zeigte in mehreren unabhängigen Experimenten das gleiche Verteilungsmuster in der Gelfiltration. Der Hauptanteil des endogenen SNX33 konnte im Eluat zwischen dem Leervolumen ( $V_0$ ; Void Volume), welches das Volumen der mobilen Phase in einer Säule darstellt, und einem Größenbereich von mehreren hundert kDa, definiert durch den Größenstandard Thyreoglobulin (TG) mit 669 kDa, detektiert werden (Abbildung 8). Im Bereich des Größenstandards Immunglobulin G (IgG) mit 150 kDa und darunter war nur ein sehr schwaches Signal detektierbar. SNX9 (80 kDa) konnte wie Dynamin (100 kDa) vor allem im Bereich zwischen den beiden Markerproteinen TG und IgG nachgewiesen werden, wobei SNX9 darüber hinaus auch im Bereich unter 150 kDa zu finden war. SNX33, das ein errechnetes Molekulargewicht von 65 kDa besitzt, wurde endogen also vorwiegend in einem höher-molekularen Komplex, in einer Größenordnung von mehreren hundert

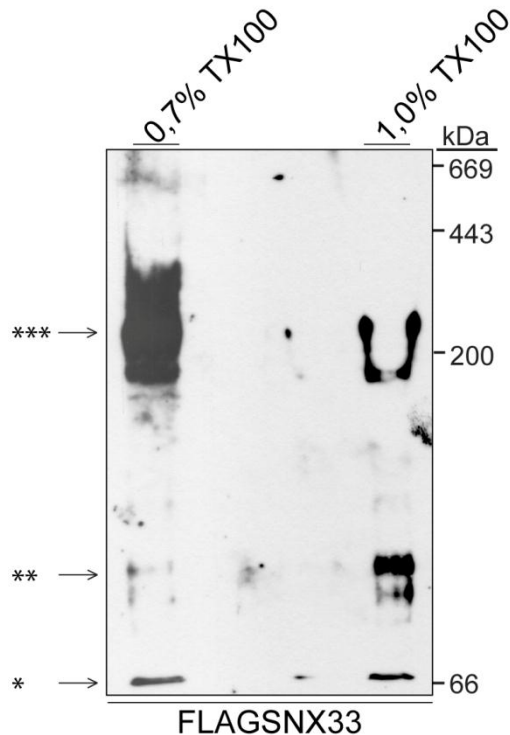
kDa bis hin zu mehreren MDa (Eluat direkt nach V0) nachgewiesen. SNX9, dessen Elutionsmuster den bereits veröffentlichten Daten entspricht, und Dynamin überschneiden sich mit SNX33 zu ~50% in ihrem Elutionsverhalten (17) (Abbildung 8). Daher könnten beide letztgenannten Proteine zumindest in einem Teil der Komplexe gemeinsam mit SNX33 vorliegen.



**Abbildung 8: Detektion von SNX33 in höher-molekularen Komplexen im Zytosol von HEK-293e Zellen** Das Zytosol von HEK-293e Zellen wurde auf einer Superose 6 10/300 GL Säule durch Gelfiltration nach absteigendem Molekulargewicht fraktioniert. Die Säule wurde mit Dextranblau (V0), Thyreoglobulin (TG; 669kDa) und Immunglobulin G (IgG; 150 kDa) kalibriert, das Eluat wurde auf 40 Fraktionen aufgeteilt. Anschließend wurden je zwei Fraktionen vereinigt und die vorhandenen Proteinkomplexe mit TCA gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt und mit Antikörpern gegen SNX33 (2A1), SNX9 (6C6) und Dynamin ( $\alpha$ -Dyn1/2) im Western Blot detektiert. Die Kurve in blau stellt die relative Proteinkonzentration im Zeitverlauf dar, die anhand der gemessenen Absorption (mAU) mit einem UV Detektor (280nm) bestimmt wurde. Zahlen in blau = Zeitpunkt in Minuten.

Zusätzlich zur Gelfiltration erfolgte der Nachweis von SNX33 in der nativen Gelelektrophorese. Dieses Experiment konnte aufgrund der geringen Expression von SNX33 nicht unter endogenen Bedingungen durchgeführt werden. Eine vorgeschaltete Immunpräzipitation oder TCA-Fällung, welche für den Nachweis des endogenen Proteins nötig ist, verhinderte aufgrund der Kontamination der Probe mit Sepharose-Beads beziehungsweise zu hoher Proteinkonzentrationen das Einlaufen in das native Gel. Deshalb wurden HEK-293e Zellen, die stabil N-terminal FLAG-Tag

markiertes SNX33 exprimieren (HEK-293e/FLAG-SNX33), verwendet. Diese Zellen wurden mit Hilfe eines hypotonen Puffers lysiert, die Zytosolfraktion durch Ultrazentrifugation von zellulären Membranen befreit und anschließend mit dem Detergens Triton X-100 (finale Konzentration: 0,7%; 1%) versetzt. Dann folgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine ohne den Zusatz von SDS, um vorhandene Proteinkomplexe nicht zu zerstören. Bei der anschließenden Detektion von FLAG-SNX33 mit dem FLAG- Antikörper FLAGM2 konnten im Wesentlichen zwei Banden detektiert werden. Die erste Bande im Bereich von 200-300 kDa, eine zweite, deutlich schwächere Bande im Bereich von 100-150 kDa (Abbildung 9). Eine Erhöhung der Triton X-100 Konzentration von 0,7% auf 1% führte zu einer deutlichen Abnahme der Signalintensität der ersten Bande, gepaart mit einer Signalzunahme der zweiten Bande. Der Proteinkomplex im Bereich von 200-300 kDa wurde also in Anwesenheit einer höheren Detergenkonzentration zerstört. Im Gegenzug wurde die Assemblierung des gegenüber Detergenzien resistenteren Proteinkomplexes im Bereich von 100-150 kDa durch die freigewordenen Interaktionspartner gefördert. Das gezeigte Bandenmuster für SNX33 entspricht demjenigen für aufgereinigtes SNX9, und könnte, wie im Fall des homologen SNX9, SNX33 Dimeren und Oligomeren entsprechen (45). Zusätzlich konnte eine dritte Bande identifiziert werden, die bei 66 kDa lokalisiert ist und somit dem errechneten Molekulargewicht des SNX33 Monomers entspricht (Abbildung 9). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass SNX33 sowohl in der Gelfiltration als auch in der nativen Gelelektrophorese in unterschiedlichen Proteinkomplexen vorgefunden wurde, auch in einem Größenbereich, der die Existenz eines SNX33 Dimers vermuten lässt. Daher wurde nun systematisch untersucht, mit welchen weiteren Proteinen SNX33 diese Komplexe eingeht und ob es in der Lage ist, mit sich selbst oder anderen SNXe zu Dimerisieren.

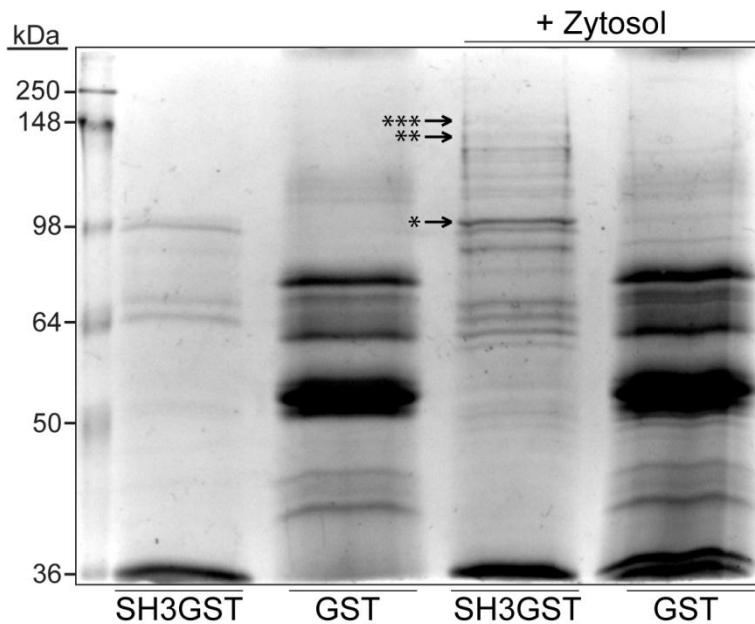


**Abbildung 9: Nachweis von SNX33 in höhermolekularen Proteinkomplexen in der nativen Gelelektrophorese** Lysat von HEK-293 Zellen, die stabil N-terminal FLAG-Tag markiertes SNX33 exprimieren (FLAGSNX33), wurde mit 0,7 beziehungsweise 1% Triton X-100 (TX100) inkubiert und anschliessend unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte die Detektion von SNX33 mit dem FLAG Antikörper FLAGM2 im Westernblot. Die mit (\*) markierten Pfeile zeigen die drei unterschiedliche Banden, in denen SNX33 detektiert werden konnte. \* potentielles SNX33 Monomer, \*\* potentielles SNX33 Dimer, \*\*\* potentielles SNX33 Oligomer

### 4.3 Identifikation neuer SNX33 Interaktionspartner

Da SH3 Domänen zu den häufigsten und am besten charakterisierten Protein-Protein Interaktionsdomänen gehören und bereits zahlreiche Bindungspartner der SNX9 SH3 Domäne bekannt waren, wurde die SH3 Domäne von SNX33 ausgewählt, um neue Interaktionspartner zu identifizieren. Um diejenigen Mengen an Bindungspartnern anzureichern, die für eine Identifikation einzelner Banden im Coomassie Gel durch massenspektrometrische Analyse nötig sind, wurde die SNX33 SH3 Domäne als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt. Dieses Fusionsprotein wurde dann für den „Pull-Down“ Assay eingesetzt. Dazu wurde eine große Menge an HEK293e Zellen lysiert, die Zytosolfraction isoliert und anschließend mit einer finalen Konzentration von 0,1% Triton X-100 inkubiert. Anschließend wurde die Zytosolfraction in zwei Ansätze aufgeteilt und mit dem SH3-GST-Fusionsprotein beziehungsweise GST als Kontrolle

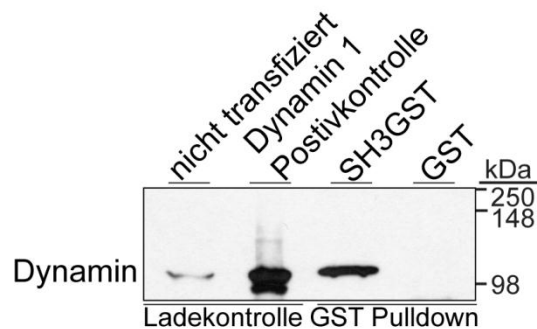
versetzt. Es folgte die Präzipitation des GST/GST-Fusionsproteins mit Glutathion-Beads. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Präzipitats erfolgte die Detektion der präzipitierten Proteine durch Färbung des Gels mit Coomassie Blau (Abbildung 10). Als zusätzliche Kontrolle wurden bei der Gelelektrophorese auch nur GST und SH3-GST in Lysepuffer, ohne vorherige Inkubation mit der Zytosolfraktion, auf das Gel aufgetragen. Auf dem Coomassie Gel wurden diejenigen Banden des SH3-GST „Pull-downs“ im LC-MS/MS Massenspektrometer analysiert, die weder im GST-Zytosol Ansatz noch im SH3-GST-Lysepuffer Ansatz vorhanden waren. Dabei konnten folgende Proteine eindeutig identifiziert werden: Dynamin 2 (\*), Protein diaphanous homolog 1 (DIAPH1)\*\*), Synaptojanin2 (\*\*\*) und Pyruvatkinase. Alle identifizierten Proteine sind in der Literatur als SH3 Domänen bindende Proteine beschrieben (99-102). Dynamin und Synaptojanin wurden bereits als Interaktionspartner der SNX9 SH3 Domäne beschrieben, beide Proteine sind an der Endozytose beteiligt (17; 103). Das Protein diaphanous homolog 1 ist an der Elongation nicht-verzweigter Aktin Filamente beteiligt (100).



**Abbildung 10: Identifikation neuer SNX33 Interaktionspartner** Ein GST Fusionsprotein mit der SH3 Domäne von SNX33 (SH3-GST) wurde kloniert und aus E.coli aufgereinigt. „Pull down“ Assay: Lysat von HEK-293e Zellen wurde mit SH3-GST oder GST inkubiert, anschließend erfolgte die Anreicherung der GST-Proteine mit Glutathion-Beads. Die Proben wurden elektrophoretisch getrennt und die einzelnen Banden durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurden GST beziehungsweise SH3-GST ohne vorherige Inkubation mit dem Zellysate auf das Gel aufgetragen. Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und anschließend im Massenspektrometer identifiziert. \* Dynamin 2, \*\* Protein diaphanous homolog 1, \*\*\* Synaptojanin 2. Zur Kontrolle wurden auch die entsprechenden Bereiche des GST-mit-Zytosol und SH3-GST-ohne-Zytosol Ansatzes massenspektrometrisch analysiert. Es konnten dort jedoch nur GST und die SH3 Domäne beziehungsweise deren Abbauprodukte identifiziert werden. Alle anderen im SH3-GST-mit-Zytosol Ansatz identifizierten Proteine waren ebenfalls Abbauprodukte des Fusionsproteins, Kernproteine oder Kontaminationen durch humanes Keratin. Die vor allem im GST / GST-Zytosol Ansatz stark sichtbaren Banden im Größenbereich von 50-70 kDa stellen Multimere und/oder Aggregate des GST Protein Monomers (26kDa) dar.

Die Spezifität der Interaktion von Dynamin mit dem SH3-GST Fusionsprotein wurde zusätzlich noch im Western Blot überprüft. Dazu erfolgte die Analyse jeweils eines Aliquots des SH3-GST beziehungsweise GST Präzipitats mit einem Dynamin spezifischen Antikörper (Dyn1/2) (Abbildung 11). Um die Spezifität des Antikörpers zu kontrollieren, wurde Dynamin 1 in HEK-293e Zellen überexprimiert und ein Teil dieser Zellysate parallel zu den „Pull down“ Lysaten geladen. Endogenes Dynamin 2 konnte nur im SH3-GST „Pull down“ detektiert werden, wodurch eine spezifische Interaktion von Dynamin mit der SNX33 SH3 Domäne erneut bestätigt werden

konnte. Ein unspezifisches Binden von Dynamin an GST oder die Glutathion-Sephrose konnte ausgeschlossen werden.



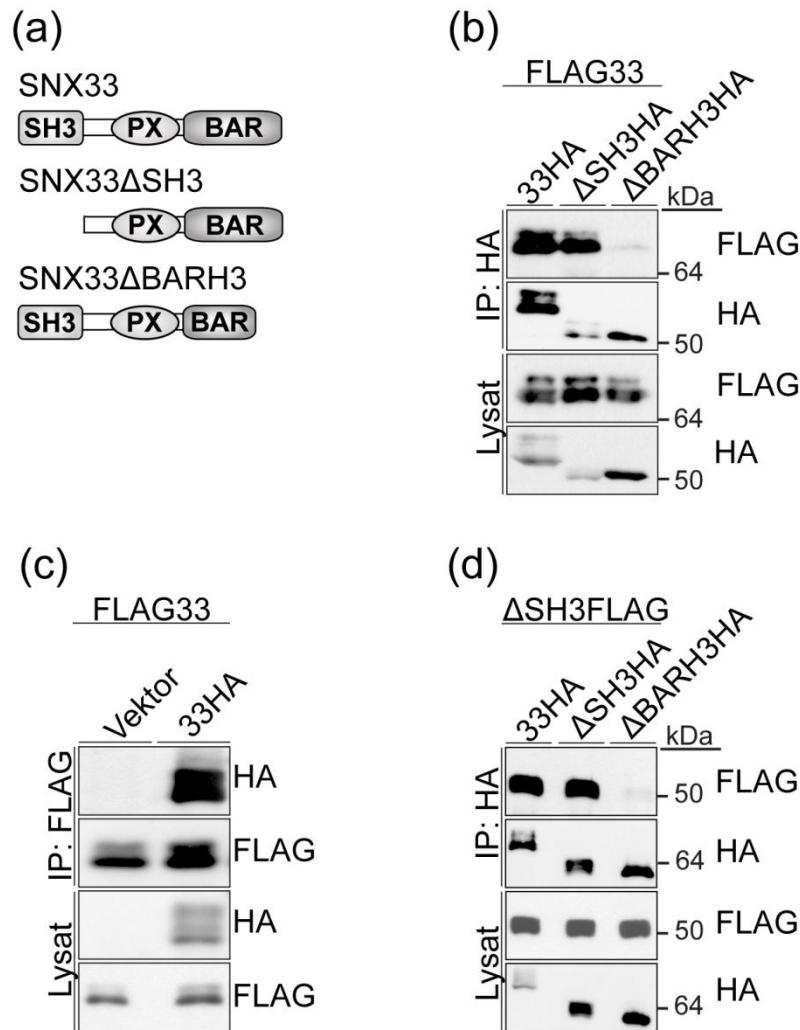
**Abbildung 11: Interaktion der SNX33 SH3 Domäne mit endogenem Dynamin** Lysat von HEK-293e Zellen wurde wie in Abbildung 10 beschrieben mit SH3-GST oder GST inkubiert. Anschließend erfolgte der „Pull down“ mit Glutathion-Sephrose und der Nachweis von präzipitiertem Dynamin mit dem Antikörper Dyn1/2 im Western Blot. Dynamin konnte nur im „Pull down“ mit SH3-GST detektiert werden. HEK-293e Lysat und Lysat von transient mit Dynamin 1 transfizierten HEK-293e Zellen wurde zusätzlich als Ladekontrolle aufgetragen.

#### 4.4 Die N-terminale BAR Domäne vermittelt die Homodimerisierung von SNX33

Nach der Identifikation neuer SNX33 Interaktionspartner wurde als nächstes getestet, ob SNX33 analog zu anderen BAR Proteinen in der Lage ist Homodimere zu bilden. Diese könnten eine weitere Erklärung für die Anwesenheit von SNX33 in den unter Abschnitt 4.2 beschriebenen Proteinkomplexen darstellen. Dazu wurde in HEK-293e/FLAG-SNX33 Zellen transient SNX33 exprimiert, das mit einem C-terminalen HA-Tag markiert war (SNX33-HA). Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation mit dem HA.11 Antikörper und der Nachweis des kopräzipitierten FLAG-SNX33 mittels FLAGM2 Antikörper im Western Blot (Abbildung 12b, Spur 1). Zusätzlich erfolgte die Koimmunpräzipitation in die entgegengesetzte Richtung, indem FLAG-SNX33 mit dem FLAGM2 Antikörper präzipitiert und anschließend kopräzipitiertes SNX33-HA mit dem HA.11 Antikörper nachgewiesen wurde (Abbildung 12c). In beiden Fällen konnte eine Interaktion von SNX33-HA mit FLAG-SNX33 und somit eine SNX33 Homodimerisierung bestätigt werden. Da SNX33 sowohl über die C-terminale BAR Domäne als auch über die N-terminale SH3 Domäne (via PXXP Motiv der PX Domäne oder über einer SH3-SH3 Interaktion (93; 94)) dimerisieren könnte, wurden mehrere SNX33 Deletionskonstrukte kloniert

(Abbildung 12a). Zum einen SNX33 $\Delta$ SH3, dem die SH3 Domäne fehlt, zum anderen SNX33 $\Delta$ BARH3, bei dem die letzte Helix der BAR Domäne deletiert wurde. Die Identifikation der Aminosäuren, die für die einzelnen Helices der SNX33 BAR Domäne kodieren, erfolgte dabei mit der Software Coils (104). Anschließend erfolgte der bereits beschriebene Koimmunpräzipitations- Assay. Dabei zeigte nur SNX33 $\Delta$ SH3-HA eine Interaktion mit FLAG-SNX33, eine Interaktion von SNX33 $\Delta$ BARH3-HA mit FLAG-SNX33 konnte trotz stärkerem Expressionslevel nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12b, Spur 2 und 3). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die SNX33 BAR Domäne und nicht die SH3 Domäne für eine SNX33-SNX33 Interaktion nötig ist. Um die Beteiligung der SH3 Domäne vollständig auszuschließen, wurde das Experiment mit transient exprimierten SNX33 $\Delta$ SH3-Flag und wiederum koexprimiertem SNX33-HA, SNX33 $\Delta$ SH3-HA und SNX33 $\Delta$ BARH3-HA wiederholt. Eine Interaktion von SNX33 $\Delta$ SH3-Flag mit SNX33 $\Delta$ SH3-HA konnte weiterhin nachgewiesen werden, die Interaktion mit SNX33 $\Delta$ BARH3-HA blieb aus (Abbildung 12d). Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass eine SNX33-SNX33 Interaktion möglich und eine Beteiligung der BAR Domäne nötig ist. Eine Beteiligung der SH3 Domäne konnte ausgeschlossen werden.

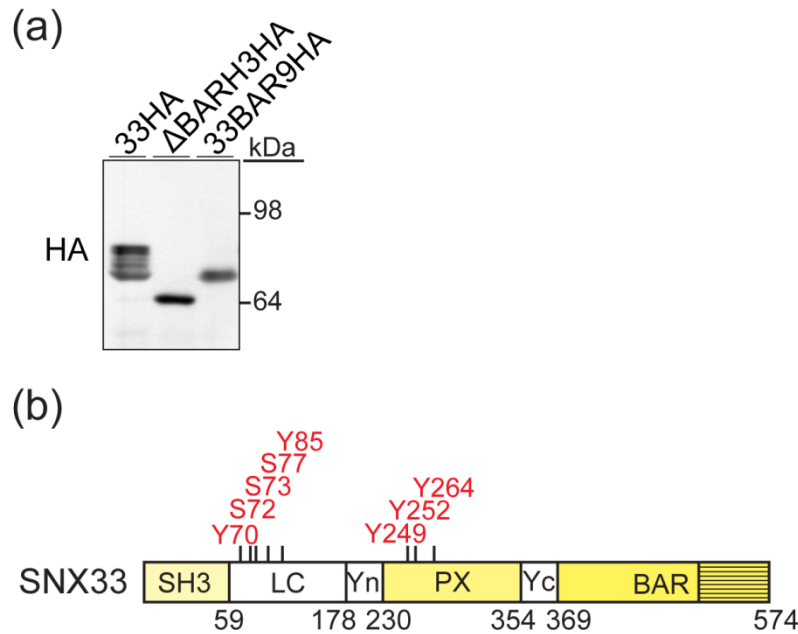




**Abbildung 12: Die Homodimerisierung von SNX33 wird durch die BAR Domäne vermittelt** (a) Vereinfachte Darstellung der Domänenstruktur von SNX33 und dessen Mutanten (b) HEK-293e Zellen, welche stabil FLAG-SNX33 (FLAG33) exprimieren, wurden transient mit dem Vollängen-Protein (33HA) oder SNX33 Mutanten ohne die N-terminale SH3- (SNX33 $\Delta$ SH3) oder C-terminale BAR Domäne (SNX33 $\Delta$ BARH3) transfiziert. Die transient exprimierten Konstrukte waren mit einem C-terminalen HA Tag versehen. SNX33 $\Delta$ SH3 ( $\Delta$ SH3HA) wurde dabei geringer exprimiert als das Vollängen-Protein beziehungsweise SNX33 $\Delta$ BARH3 ( $\Delta$ BARH3HA) (Aliquots des Zelllysats (Ladekontrollen), untere zwei Kästen). Die mit einem HA-Tag markierten Konstrukte wurden präzipitiert und anschließend mit dem HA.11 Antikörper detektiert (Zweiter Kasten von oben). Parallel dazu erfolgte die Detektion der kopräzipitierten Konstrukte mit einem Antikörper gegen den FLAG Tag von FLAG-SNX33 (oberer Kasten). (c) FLAG-SNX33 stabil exprimierende HEK-293e Zellen wurden transient mit SNX33-HA oder leerem Vektor transfiziert. Anschließend erfolgte die Präzipitation des FLAG-SNX33 und die Detektion des kopräzipitierten SNX33-HA (oberer Kasten). (d) HEK293e Zellen wurden transient mit SNX33 $\Delta$ SH3-FLAG (33 $\Delta$ SH3FLAG) und jeweils SNX33-HA, SNX $\Delta$ SH3-HA oder SNX33 $\Delta$ BARH3-HA kotransfiziert. Dabei konnte nur eine Kopräzipitation von SNX33-HA und SNX33 $\Delta$ SH3-HA beobachtet werden. Eine Interaktion zwischen SNX33 $\Delta$ SH3-FLAG und SNX33 $\Delta$ BARH3-HA konnte nicht nachgewiesen werden. Die gezeigten Western Blots stellen repräsentativ die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten dar.

#### **4.5 SNX33 $\Delta$ BARH3 wird vermutlich nicht phosphoryliert**

SNX33 wurde im Western Blot als Doppelbande detektiert, wobei die obere Bande die phosphorylierte Form von SNX33 repräsentiert (12). Dieses war auch für SNX33 $\Delta$ SH3 der Fall (Abbildung 12b,d). Im Gegensatz dazu war SNX33 $\Delta$ BARH3 nur als Einzelbande detektierbar, was auf eine ausbleibende Phosphorylierung dieser Mutante hindeuten könnte (Abbildung 13a). Interessanterweise zeigt eine SNX9 Mutante, der die letzten 13 Reste der BAR Domäne fehlen und daher kein Dimer mehr ausbilden kann, auch einen Phosphorylierungsdefekt (74). Die fehlenden 13 Reste dieser SNX9 Mutante enthalten weder Serin, Threonin oder Tyrosin, so dass eine fehlende Phosphorylierungsstelle ausgeschlossen werden konnte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von SNX9 Voraussetzung für eine anschließende Phosphorylierung durch ACK2 ist. Die fehlende Phosphorylierung der SNX33 Mutante, die nicht mehr in der Lage ist zu dimerisieren, könnte also auf einen ähnlichen Mechanismus hinweisen. Von den bisher bekannten Phosphorylierungsstellen von SNX33 finden sich keine im Bereich der dritten Helix der BAR Domäne ([phosphosite.org](http://phosphosite.org), Protein Page: MGC32065) (Abbildung 13b).

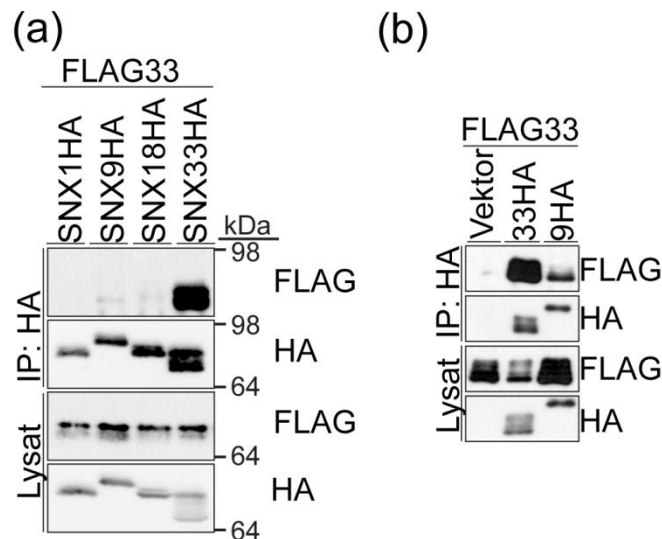


**Abbildung 13: SNX33 Mutanten, die nicht mehr Dimerisieren, werden nicht phosphoryliert (a)** HEK293e Zellen wurden transient mit SNX33-HA und SNX33 Mutanten, die mit SNX33 nicht mehr dimerisieren, transfiziert (SNX33ΔBARH3-HA; SNX33BAR9-HA, ein Konstrukt bei dem die BAR Domäne von SNX33 gegen die BAR Domäne von SNX9 ausgetauscht wurde, siehe Abschnitt 4.7). Während SNX33-HA (33HA) mehrere Banden aufgrund unterschiedlich phosphorylierter Reste zeigte, konnten SNX33ΔBARH3-HA (ΔBARH3HA) und SNX33BAR9-HA (33BAR9HA) nur als eine einzelne Bande detektiert werden **(b)** Bekannte Phosphorylierungsstellen von SNX33 sind rot dargestellt (Phosphosite.org, Protein Page: MGC32065). Die Zahlen unter dem Schema entsprechen der jeweils letzten Aminosäure der vorangehenden Domäne. Der schraffierte Teil der BAR Domäne wurde im SNX33ΔBARH3 Konstrukt deletiert.

#### 4.6 SNX33 bildet keine Heterodimere mit anderen SNXen

SNXe und andere BAR Proteine sind in der Lage Heterodimere auszubilden (8; 10; 95; 105). Derartige Heterodimere könnten eine weitere Erklärung für das Vorliegen von SNX33 in höher-molekularen Komplexen und das überlappenden Elutionsverhalten von SNX33 und SNX9 in der Gelfiltration sein. Daher wurde nun mit dem unter Abschnitt 4.4 beschriebenen Koimmunpräzipitations-Assay eine potentielle Heterodimerisierung von SNX33 mit anderen SNXe untersucht. Die beiden SNX33 Homologe SNX9 und SNX18 sowie das zur SNX<sup>PX-BAR</sup> Gruppe zugehörige SNX1 wurden mit einem C-terminalen HA-Tag versehen, transient in HEK-293e/FLAG-SNX33 Zellen exprimiert und auf Kopräzipitation mit SNX33 überprüft. Als Positivkontrolle wurde SNX33-HA verwendet. Die Expressionslevel und die Effizienz der Präzipitation der verwendeten HA-Konstrukte mit dem HA.11

Antikörper waren annähernd gleich, dennoch konnte nur eine Interaktion zwischen SNX33-HA und FLAG-SNX33 beobachtet werden (Abbildung 14a). SNX33 bildet unter diesen Bedingungen also keine Heterodimere mit SNX1, SNX9 oder SNX18 aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in früheren Versuchsreihen sowohl SNX33 als auch der jeweilige Interaktionspartner transient überexprimiert. Unter diesen Bedingungen konnte eine Interaktion zwischen SNX33 und jeweils SNX1, SNX9 oder SNX18 beobachtet werden, diese war jedoch deutlich schwächer als die SNX33-SNX33 Interaktion. Abbildung 14b zeigt die Verhältnisse bei transienter Koexpression von SNX33-FLAG und SNX9-HA beziehungsweise SNX33-HA. Da diese Form der Heterodimerisierung nach Reduktion der Expressionslevel durch stabile Expression von SNX33 nicht mehr zu beobachten war, wurde für alle Folgeexperimente auf die transiente Kotransfektion beider Interaktionspartner verzichtet. Es sei darauf hingewiesen, dass auch die stabile Expression von SNX33 einem Vielfachen des endogenen Proteinlevels entsprach. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SNX33 auch bei einem Expressionslevel oberhalb des endogenen Proteinlevels keine Heterodimere mit SNX1, SNX9 und SNX18 ausbildet.



**Abbildung 14: SNX33 bildet keine Heterodimere mit SNX1, SNX9 oder SNX18**

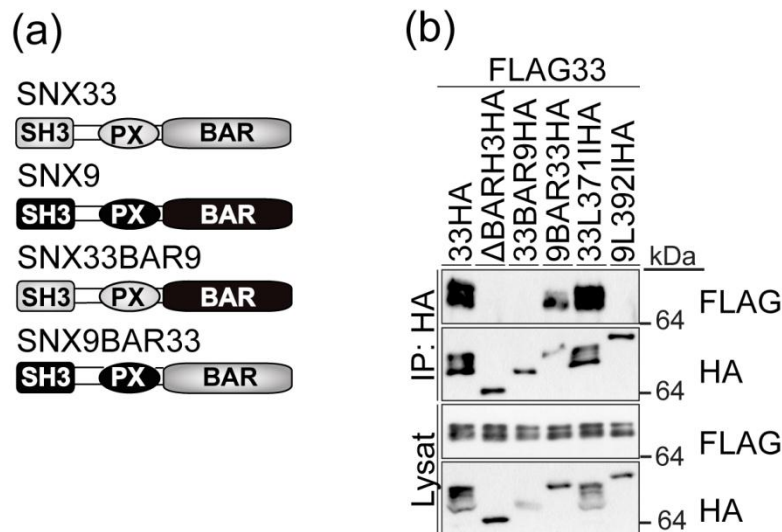
**(a)** HEK-293e Zellen, die stabil FLAG-SNX33 (FLAG33) exprimieren, wurden transient mit den C-terminal HA-getaggten Konstrukten von SNX1, SNX9, SNX18 und SNX33 transfiziert. Die Analyse der Koimmunpräzipitation erfolgte dabei wie in Abbildung 12. Dabei kopräzipitierte SNX33 nur mit SNX33, aber nicht mit SNX1, SNX9 und SNX18.

**(b)** HEK-293e Zellen wurden transient mit FLAG-SNX33 und jeweils SNX33-HA (33HA), SNX9-HA (9HA) oder dem leeren Vektor kotransfiziert. Die transiente Überexpression beider Interaktionspartner führte zur artifiziellen Koimmunpräzipitation von FLAG-SNX33 mit SNX9-HA. Die gezeigten Western Blots stellen repräsentativ die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten dar.

#### **4.7 Die SNX33 BAR Domäne bestimmt die Spezifität der SNX33-SNX33 Interaktion**

Aus den Experimenten zu Abschnitt 4.4 konnte gefolgert werden, dass die SNX33 BAR Domäne Voraussetzung für die SNX33 Homodimerisierung ist. Darauf aufbauend sollte nun untersucht werden, ob diese Domäne die Spezifität der Dimerisierung bestimmt und so eine SNX33 Homodimerisierung ermöglicht, während eine SNX33-SNX9 Heterodimerisierung verhindert wird. Falls diese Annahme zutrifft, dann sollte ein SNX9 Konstrukt, bei dem die SNX9 BAR Domäne gegen die BAR Domäne des SNX33 ausgetauscht worden ist, mit SNX33 ein Heterodimer bilden. Im Umkehrschluss sollte ein SNX33 Konstrukt, dessen BAR Domäne durch die von SNX9 ausgetauscht worden ist, nicht mehr mit SNX33 interagieren. Abbildung 15a zeigt die Konstrukte, bei denen die BAR Domänen entsprechend vertauscht wurden. Diese Konstrukte wurden dann wie in Abschnitt 4.4. beschrieben durch Koimmunpräzipitation auf ihre Interaktion mit FLAG-SNX33 getestet. Als Positivkontrolle wurde SNX33-HA, als Negativkontrolle SNX33 $\Delta$ BARH3-HA verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurden zwei weitere SNX33 beziehungsweise SNX9 Mutanten getestet, SNX33L371I-HA und SNX9L392I-HA. Diese Konstrukte enthalten jeweils einen Austausch der Aminosäure Leucin zu Isoleucin, der notwendig war, um eine EcoR1 Schnittstelle vor Beginn der BAR Domäne zu generieren. Diese Schnittstelle diente dann zum Austausch der BAR Domänen. Da diese Punktmutation auch in den finalen Konstrukten mit vertauschter BAR Domäne vorhanden ist, wurden diese Konstrukte ebenfalls im Koimmunpräzipitations-Assay auf Dimerisierung mit SNX33 untersucht. Wie in Abbildung 15b ersichtlich, interagierte SNX9BAR33 im Gegensatz zu SNX33BAR9 mit SNX33. Die Interaktion war dabei schwächer als die beobachtete SNX33-SNX33 Interaktion, das SNX9BAR33 Konstrukt wurde jedoch auch schwächer exprimiert. Das Interaktionsverhalten der beiden Konstrukte mit der Leucin zu Isoleucin Mutation zeigte keinen Unterschied zu dem des korrespondierenden Wildtyp-Proteins. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass diese Punktmutation einen Einfluss auf die Interaktion mit SNX33 hatte. Aus diesen Experimenten konnte geschlossen werden, dass die SNX33 BAR Domäne die Spezifität der SNX33 Dimerisierung bestimmt und

so eine SNX33-SNX33 Interaktion vermittelt, während eine SNX33-SNX9 Interaktion verhindert wird.



**Abbildung 15: Die SNX33 BAR Domäne bestimmt die Spezifität der SNX33-SNX33 Homodimerisierung und verhindert eine SNX33-SNX9 Heterodimerisierung (a)**

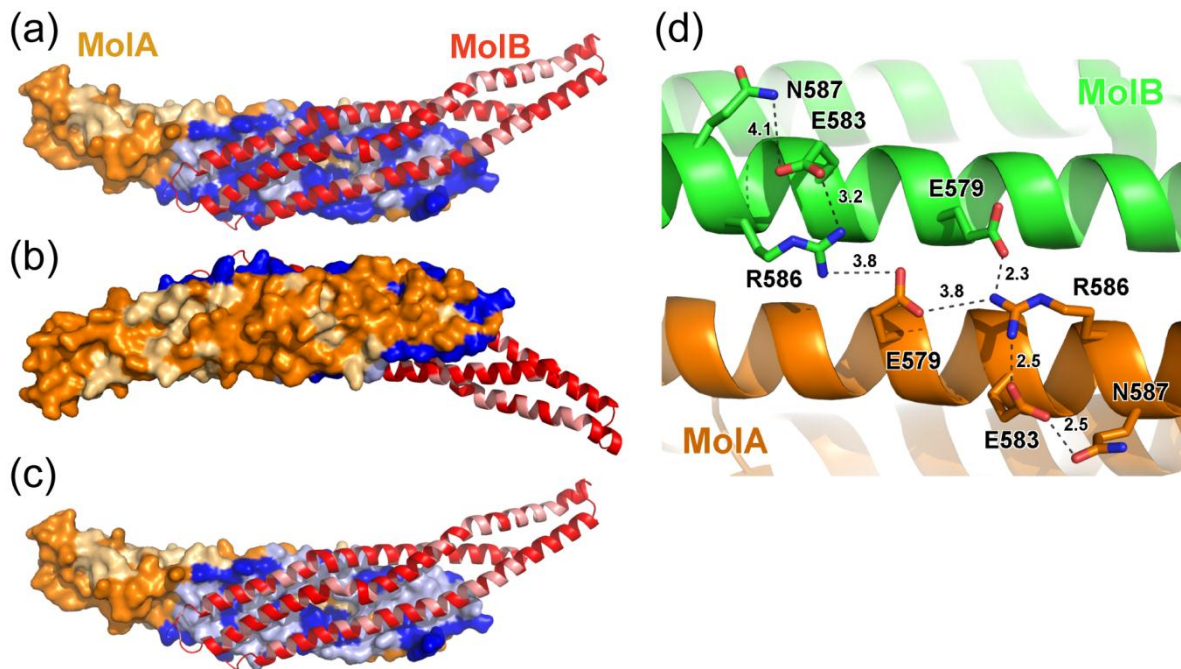
Domänenstruktur der SNX33 beziehungsweise SNX9 Konstrukte mit reziprok vertauschten BAR Domänen. SNX33 Domänen sind in grau, SNX9 Domänen in schwarz dargestellt (b) Um die Spezifität der BAR Domäne für die Homodimerisierung von SNX33 zu überprüfen, wurden Konstrukte generiert, bei denen die BAR Domäne von SNX33 und SNX9 vertauscht wurde. Es folgte die transiente Transfektion von HEK-293e Zellen, die stabil FLAG-SNX33 exprimieren. Dabei wurden jeweils SNX33 (33HA), SNX33ΔBARH3 (ΔBARH3HA), das SNX33 Konstrukt mit der BAR Domäne von SNX9 (33BAR9HA), das SNX9 Konstrukt mit der BAR Domäne von SNX33 (9BAR33HA) und die SNX33 beziehungsweise SNX9 Mutanten mit der angegebenen Leucin zu Isoleucin Punktmutation transfiziert (33L371IHA, 9L392IHA). Alle Konstrukte waren mit einem C-terminalen HA Tag versehen. SNX9BAR33 konnte mit SNX33 kopräzipitiert werden, SNX33BAR9 wurden nicht kopräzipitiert. Die gezeigten Western Blots stellen repräsentativ die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten dar.

**4.8 Strukturelle Unterschiede zwischen den BAR Domänen von SNX33 und SNX9 verhindern eine Heterodimerisierung.**

Welche mechanistische Grundlagen vermitteln die SNX33-SNX33 Interaktion und verhindern zeitgleich die Heterodimerisierung von SN33 und SNX9? Um mehr über die strukturellen Eigenschaften der SNX33 BAR Domäne zu erfahren und Details über Mechanismen der Homodimerisierung dieses SNX zu gewinnen, wurde auf die bereits veröffentlichte Kristallstruktur der SNX9 BAR Domäne zurückgegriffen (18; 55; 106). Dabei kam das sogenannte komparative „Homologie-Modelling“ zur

Anwendung. Dieses basiert auf der Annahme, dass sich homologe Proteine, also Proteine mit einem gemeinsamen Vorfahren, deren Aminosäurereste zu mindestens 30% identisch sind, auch in ihrer Tertiärstruktur ähneln. Durch Identifikation kritischer Reste des Proteins mit bekannter Kristallstruktur und deren Vergleich mit den korrespondierenden Resten des homologen Partners lässt sich eine Vorhersage über dessen Tertiärstruktur treffen (107-110). Diese Vorhersage erreicht dabei nicht die Genauigkeit einer Röntgenstrukturanalyse, kann aber unter anderem als Entscheidungsgrundlage für den Austausch gezielter Aminosäurereste dienen (111). Das „Homologie Modelling“ der SNX33 und SNX18 BAR Domäne, basierend auf der Kristallstruktur der SNX9 BAR Domäne, wurde von unserem Kollaborationspartner Dr. Manuel Than (Leibnitz-Institut für Altersforschung und Fritz-Lipmann-Institut, Jena) durchgeführt. 36,3% (74 von 294) der Aminosäurereste der SNX33 und SNX9 BAR Domäne sind identisch, darüber hinaus weisen viele der nicht-identischen Aminosäuren ähnliche chemisch-physikalische Eigenschaften auf. Damit waren die Voraussetzungen für ein „Homologie-Modelling“ gegeben und eine ähnliche räumliche Struktur der beiden BAR Domänen zu erwarten. Nach Berechnung der SNX33 Tertiärstruktur konnten diejenigen Aminosäurereste identifiziert werden, welche am Aufbau der Kontaktstellen des BAR Dimers beteiligt sind. Der Vergleich mit SNX9 zeigte, dass 35.9% (23 von 64) der Reste im Bereich der Dimerkontaktfläche identisch sind und diese daher einen ähnlichen Konservierungsgrad wie die gesamte BAR Domäne aufweist. Die übrigen zwei Drittel der Dimerkontaktflächen von SNX33 und SNX9 bestehen also aus unterschiedlichen Resten, welches eine Erklärung für die ausbleibende Heterodimerisierung sein könnte. Abbildung 16a,b zeigt anschaulich die Anzahl konservierter und nicht-konservierter Reste der SNX9 beziehungsweise SNX33 BAR Domäne innerhalb der berechneten Dimerkontaktfläche. Das Strukturmodell dieser Abbildung beruht auf den Raumkoordinaten der SNX9 Kristallstruktur. Um die Anzahl und räumliche Orientierung der betroffenen Reste darzustellen, wurde die bekannte Tertiärstruktur von SNX9 mit der berechneten Tertiärstruktur von SNX33 abgeglichen und konservierte beziehungsweise nicht-konservierte Reste farbig unterschiedlich markiert.





**Abbildung 16: Molekulare Analyse und „Homologie-Modelling“ der BAR Domänen von SNX9, SNX33 und SNX9mod (a), (b), (c)** Räumliche und farbkodierte Darstellung konservierter und nicht-konservierter Aminosäurereste innerhalb der BAR Domänen Dimers von SNX33 und SNX9 (a,b) beziehungsweise SNX33 und SNX9mod (c). Bei der SNX9mod Mutante wurden 19 Reste innerhalb der BAR Domäne gegen die korrespondierenden Reste von SNX33 ausgetauscht. Die atomaren Koordinaten entstammen der bekannten Kristallstruktur von SNX9 (Eintrag 2RAI der Protein Datenbank PDB). Molekül B ist dabei in rot als „Ribbon“ Diagramm dargestellt. Molekül A (MoIA) ist raumfüllend in orange hinter Molekül B (MoIB) dargestellt. Der Teil der Oberfläche von Molekül A, der während der Dimerformation von Molekül B bedeckt wird, ist in blau dargestellt. Dabei wurden in (a) und (b) diejenigen Reste hellblau dargestellt, welche zwischen SNX33 und SNX9 konserviert sind. Dunkelblaue Reste stellen dementsprechend nicht-konservierte Reste dar. (c) zeigt den Vergleich zwischen SNX33 und der SNX9mod Mutante. Dabei wird eine vergrößerte Kontaktfläche zwischen den beiden Protomeren sichtbar, die eine Dimerformation ermöglicht. **(d)** Detaildarstellung des SNX9 Dimers. Darstellung der Aminosäuren E579-R586-E538, die an dem intermolekularen, verzweigten und geladenem Netzwerk aus Wasserstoffbrücken zwischen den SNX9 BAR Protomeren beteiligt sind. Sauerstoffatome sind dabei in rot, Stickstoffatome in blau dargestellt. Kohlenstoffatome und die Darstellung der Helices im „Ribbon“ Diagramm sind für Molekül A in orange und für Molekül B in grün dargestellt. Die Distanzen der Wasserstoffbrückenbindungen sind in Å angegeben. E583 ist nicht direkt an der Kontaktfläche des Dimers beteiligt, aber dennoch essentiell für die Formation dieses Netzwerks aus Wasserstoffbrückenbindungen. Dieses Modell wurde dabei im Vergleich zu (a) 90° um eine horizontale Achse gedreht. Somit entspricht dies einem Blick von unten auf das Modell (a).



Es erfolgte eine detaillierte Untersuchung der Dimerkontaktfläche, bei der die jeweiligen korrespondierenden Reste von SNX33 und SNX9 einzeln gegenübergestellt und auf eine mögliche Beteiligung bei einer Heterodimerisierung überprüft wurden. Dazu wurden zunächst die Reste der SNX9 Dimerkontaktfläche untersucht, die hauptsächlich zur Interaktion der beiden Protomere und somit zur Bildung eines stabilen Dimers beitragen. Von den 64 Resten, welche die Dimerkontaktfläche ausbilden, sind 24 Reste mit jeweils über 2% an der Gesamtfläche beteiligt. Das SNX9 Dimer wird durch 24 Wasserstoffbrücken, 8 Ionenbindungen und zahlreiche hydrophobe Interaktionen zusammengehalten (Tabelle 22, Spalte 1-3). 19 dieser Reste waren nicht in SNX33 konserviert und deshalb nicht mit einer Heterodimerisierung vereinbar. Die Aminosäuren an den entsprechenden Stellen waren entweder zu groß und führten so zu einer sterischen Inkompatibilität der beiden Protomere, oder bedeuteten den Verlust einer kritischen Ionenbindung, einer Wasserstoffbrückenbindung oder einer hydrophoben Wechselwirkung. Die betroffenen Aminosäuren von SNX33 sind in Tabelle 22, Spalte 4 aufgeführt und die jeweilige Auswirkung auf die Dimerkontaktfläche in Tabelle 22, Spalte 6 beschrieben.

**Tabelle 22: Stabilisierung und konservierte Reste der SNX9/SNX33 Dimer-Kontaktfläche**

Aminosäure (SNX9)	Beteiligung an Kontaktfläche des Dimers > 2%	Anzahl der Wasserstoffbrücken	Konservierte Aminosäure (+) oder Aminosäure in SNX33	Austausch in 9mod	Kommentar
F 405	+		+	-	
A408			K	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
M409			+	-	
G412			S	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
V413			+	-	
E415			Q	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
L416	+		+	-	
V419	+		+	-	
G420			A	-	A wird räumlich gut toleriert
E422		1	+	-	Ionenbindung zu K437
H423	+	1	L	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar
R426	+	1	K	Ja	Ionenbindung zu E434 ist weiterhin möglich
P430			G	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
L431			F	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar, kein Raum für F431
E434	+	2	+	-	Ionenbindung zu R426
Y435		2	F	Ja	Verlust der starken Wasserstoffbrückenbindung zu Y578
K437		1	+	-	Ionenbindung zu E422
I438	+		L	-	L wird räumlich gut toleriert
K440			S	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
A441	+		+	-	
L442			F	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar
S444			A	-	A wird räumlich gut toleriert
L445	+		I	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar
V448	+		S	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar, Verlust einer hydrophoben Wechselwirkung
F449	+		+	-	
S451			Q	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
S452			M	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar – kein Raum für M452
Y454	+	1	P	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar – P ist zu klein
Q455			F	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
G456			C	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
E457		1	S	Ja	Verlust der Ionenbindung zu R559
L460	+		+	-	
I464			+	-	
A467			T	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar - kein Raum für T467
Y471		1	+	-	
L486			+	-	
L489			M	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar - kein Raum für M489
N553		1	+	-	
H556			+	-	
S557			+	-	
R559		1	+	-	Ionenbindung zu E547
I560	+		E	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar - gegensätzliche Ladung
Y561			L	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
Y563			F	-	F wird räumlich gut toleriert
N564	+	1	K	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar – kein Raum für K564
I567	+		M	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar – kein Raum für M567
R568	+	1	Q	Ja	Verlust der starken Wasserstoffbrückenbindung zu P593
Y570			+	-	
L571	+		+	-	
E572			R	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
Q574		1	+	-	
V575	+		I	-	I wird räumlich gut toleriert
Y578	+	2	+	-	
E579		2	Q	Ja	Verlust der Ionenbindung zu R568
I581			V	-	V wird räumlich gut toleriert
A582			G	-	G wird räumlich gut toleriert
E583			+	-	*
L585	+		+	-	
R586		2	E	Ja	Verlust der Ionenbindung zu E579
A588			T	Ja	Nicht mit einem Heterodimer vereinbar – kein Raum für T588
L589	+		+	-	

#### 4. Ergebnisse

F592	+	I	Y	-	Y wird räumlich gut toleriert
P593		I	D	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
V594			N	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag
M595	+		L	-	Randständig lokalisiert – kein energetisch wichtiger Beitrag

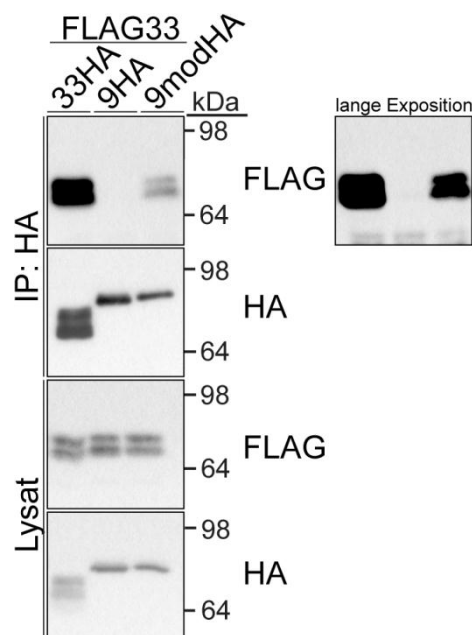
Um die Validität des „Homologie Modelling“ und die Analyse kompatibler und inkompatibler Reste von SNX33 in Bezug auf eine potentielle Heterodimerisierung mit SNX9 zu überprüfen, wurden diejenigen Reste in SNX9 mutiert, welche eine Interaktion mit der SNX33 BAR Domäne verhinderten. Dafür wurden die in Tabelle 22, Spalte 5 beschriebenen 19 kritischen Reste der SNX9 BAR Domäne gegen die korrespondierenden Reste von SNX33 ausgetauscht. Der Austausch der einzelnen Aminosäuren des resultierenden SNX9mod Konstrukts ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

SNX9	(351)	QQFLNFRDEKEWKTGKRKAERDELAVMIFSTMEPEAPDLL	<b>LVEIEQKCE</b>
SNX9mod	(351)	QQFLNFRDEKEWKTGKRKAERDELAVMIFSTMEPEAPDLL	<b>LVEIEQKCE</b>
SNX9	(401)	<b>AVGKFTKAMDDGVKELLTVGQEH</b> <b>HWKR</b> <b>CTG</b> <b>PLP</b> <b>KPEY</b> <b>QKIGKALQ</b> <b>SLATV</b> <b>FS</b>	
SNX9mod	(401)	<b>AVGKFTKAMDDGVKELLTVGQEL</b> <b>LWKK</b> <b>CTG</b> <b>FP</b> <b>KPEF</b> <b>QKIGKAF</b> <b>QSIATS</b> <b>SFS</b>	
SNX9	(451)	<b>SSGY</b> <b>QGE</b> <b>TDLNDAITE</b> <b>AG</b> <b>KTYEE</b> <b>IASLV</b> <b>AEQPKKDLHF</b> <b>LMECN</b> <b>HEYKGF</b> <b>L</b>	
SNX9mod	(451)	<b>SMG</b> <b>PQGS</b> <b>TDLNDAITE</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>KTYEE</b> <b>IASLV</b> <b>AEQPKKDLHF</b> <b>MMECN</b> <b>HEYKGF</b> <b>L</b>	
SNX9	(501)	<b>GCFPDI</b> <b>I</b> <b>GTHKGAIEKVKESDKLV</b> <b>ATSKI</b> <b>TLQDKQ</b> <b>NMVKRV</b> <b>SIMSYALQA</b>	
SNX9mod	(501)	<b>GCFPDI</b> <b>I</b> <b>GTHKGAIEKVKESDKLV</b> <b>ATSKI</b> <b>TLQDKQ</b> <b>NMVKRV</b> <b>SIMSYALQA</b>	
SNX9	(551)	<b>EMNH</b> <b>FHSNR</b> <b>IYDYN</b> <b>SVIR</b> <b>LYLEQQVQFY</b> <b>ETIAEKL</b> <b>RQAL</b> <b>SRFPV</b> <b>MGLEYP</b>	
SNX9mod	(551)	<b>EMNH</b> <b>FHSNR</b> <b>EYDY</b> <b>KSV</b> <b>MOL</b> <b>YLEQQVQFY</b> <b>QTIAEKL</b> <b>EQT</b> <b>LSRFPV</b> <b>MGLEYP</b>	
SNX9	(601)	YDVPDYA	
SNX9mod	(601)	YDVPDYA	

**Abbildung 17: Vergleich der Primärstrukturen von SNX9 und der SNX9 Mutante mit modifizierter BAR Domäne (SNX9mod)** Dargestellt ist der Bereich der SNX9 BAR Domäne im Einbuchstabencode für Aminosäuren. Die rot, grün und blau markierten Bereiche entsprechen den einzelnen Helices der BAR Domäne. Fettgedruckt und unterstrichen sind diejenigen Reste dargestellt, die in SNX9mod gegen die korrespondierenden Reste von SNX33 ausgetauscht worden sind.

Das SNX9mod Konstrukt wurde mit einem HA-Tag versehen und anschließend in dem unter Abschnitt 4.4 beschriebenen Koimmunpräzipitations-Assay auf Interaktion mit FLAG-SNX33 getestet. Als Positivkontrolle wurde SNX33-HA, als Negativkontrolle SNX9-HA verwendet. Die Expressionslevel aller transfizierten Konstrukte waren auf einem ähnlichen Niveau. SNX9mod-HA wurde im

Gegensatz zu SNX9-HA mit FLAG-SNX33 kopräzipitiert, jedoch deutlich schwächer als SNX33-HA (Abbildung 18). Damit konnte gezeigt werden, dass der Ansatz des „Homologie Modelling“ zu einer experimentell überprüfbareren Aussage führte. Die Validität der berechneten Tertiärstruktur von SNX33 und die daraus ermittelten kritischen Aminosäurereste konnte bestätigt werden. Der Austausch dieser Reste führte zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche des SNX9-SNX33 Heterodimers und zur Ausbildung ausreichend starker Bindungen. Abbildung 16c zeigt den erhöhten Anteil kompatibler Aminosäurereste im SNX33-SNX9mod Dimer. Eine Reduktion der Interaktionsstärke zwischen SNX33-SNX9mod im Vergleich zu SNX33-SNX33 beruht wahrscheinlich auf den nicht-konservierten Resten, die zusätzlich zu den mutierten kritischen Resten einer Formation des Heterodimers entgegenwirken. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, wie spezifische Reste innerhalb der Dimerkontaktfläche von SNX9 und SNX33 eine Heterodimerisierung verhindern. Außerdem wurde gezeigt, dass die Tertiärstruktur der SNX33 BAR Domäne derjenigen der SNX9 BAR Domäne sehr ähnlich ist.



**Abbildung 18: Der Austausch gezielter Aminosäurereste in SNX9 führt zur Heterodimerisierung mit SNX33** HEK-293e Zellen, die stabil FLAG-SNX33 exprimieren, wurden transient mit SNX33-HA (33HA), SNX9-HA (9HA) oder einer SNX9 Mutante mit modifizierter BAR Domäne (9modHA), bei der 19 Reste gegen die entsprechenden Reste von SNX33 ausgetauscht wurden, transfiziert. SNX9mod-HA konnte mit FLAG-SNX33 kopräzipitiert werden, jedoch zu einem geringeren Anteil als SNX33-HA. Die gezeigten Western Blots stellen repräsentativ die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten dar.

#### **4.9 Strukturelle Unterschiede zwischen den BAR Domänen von SNX33 und SNX18 verhindern eine Heterodimerisierung.**

Wie unter Abschnitt 4.6 gezeigt, bildet SNX33 auch mit SNX18 keine Heterodimere. Daher wurden von Dr. Manuel Than analog zu Abschnitt 4.8 ein „Homologie Modelling“ für ein potentielles SNX18-SNX33 Heterodimer durchgeführt. Da weder die Kristallstruktur von SNX33 noch SNX18 bekannt ist, musste diese Analyse unter der Annahme durchgeführt werden, dass die räumlichen Koordinaten der Reste, die an der Dimerkontaktfläche von SNX9 beteiligt sind, auch auf die korrespondierenden Resten von SNX33 und SNX18 zutreffen. Der Prozentsatz konservierter Reste zwischen SNX33 und SNX18 ist mit 54,9% höher als zwischen SNX33 und SNX9 mit 36,3%. Die Anzahl inkompatibler Reste war daher wie erwartet niedriger als beim Vergleich der SNX9 und SNX33 BAR Domäne. Dennoch waren der Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals Kräften und die sterische Inkompatibilität so groß, dass nicht von einem stabilen Heterodimer ausgegangen werden konnte (Tabelle 23). Die Ergebnisse der „in silico“ Analyse entsprachen also den Ergebnissen der Koimmunpräzipitation (Abbildung 14a).

**Tabelle 23: Stabilisierung und konservierte Reste der SNX33/SNX18 Dimer-Kontaktfläche**

Aminosäure (SNX9)	Beteiligung an Kontaktfläche des Dimers von SNX9 > 2%	Aminosäure in SNX18	Aminosäure in SNX33	Kommentar: Vergleich der Aminosäuren zwischen SNX18-SNX33. Die korrespondierende Aminosäure von SNX9 wird jeweils in Spalte 1 angegeben.
F 405	+	F	F	Konserviert
A408		K	K	Konserviert
M409		F	M	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
G412		S	S	Konserviert
V413		A	V	Ähnliche Aminosäure
E415		Q	Q	Konserviert
L416	+	L	L	Konserviert
V419	+	T	V	Ähnliche Form, aber Austausch eines polaren gegen einen hydrophoben Rests
G420		A	A	Konserviert
E422		E	E	Konserviert
H423	+	F	L	Unklar, hängt von strukturellen Details ab
R426	+	K	K	Konserviert
P430		G	G	Konserviert
L431		F	F	Konserviert
E434	+	E	E	Konserviert
Y435		Y	F	Ähnliche Aminosäure, aber möglicher Verlust einer Wasserstoffbrücke
K437		K	K	Konserviert
I438	+	V	L	Möglicher Verlust eines VDW-Kontakts
K440		Q	S	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
A441	+	S	A	Ähnliche Form, aber Austausch eines polaren gegen einen hydrophoben Rests
L442		F	F	Konserviert
S444		G	A	Ähnliche Größe, aber nicht identisch
L445	+	L	I	Ähnliche Größe und Eigenschaften, aber nicht identisch
V448	+	A	S	Ähnliche Form, aber Austausch eines polaren gegen einen hydrophoben Rests
F449	+	F	F	Konserviert
S451		L	Q	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
S452		D	M	Nicht kompatibel, andere Größe und Polarität
Y454	+	Q	P	Nicht kompatibel, andere Größe, Form und Polarität
Q455		A	F	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
G456		F	C	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
E457		S	S	Konserviert
L460	+	L	L	Konserviert
I464		I	I	Konserviert
A467		T	T	Konserviert
Y471		Y	Y	Konserviert
L486		L	L	Konserviert
L489		V	M	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
N553		H	N	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
H556		H	H	Konserviert
S557		Q	S	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
R559		R	R	Konserviert
I560	+	V	E	Nicht kompatibel, andere Größe und Ladung
Y561		R	L	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimerkontaktfläche von SNX9
Y563		F	F	Konserviert
N564	+	K	K	Konserviert
I567	+	M	M	Konserviert
R568	+	Q	Q	Konserviert
Y570		F	Y	Ähnliche Aminosäure, aber möglicher Verlust einer Wasserstoffbrücke

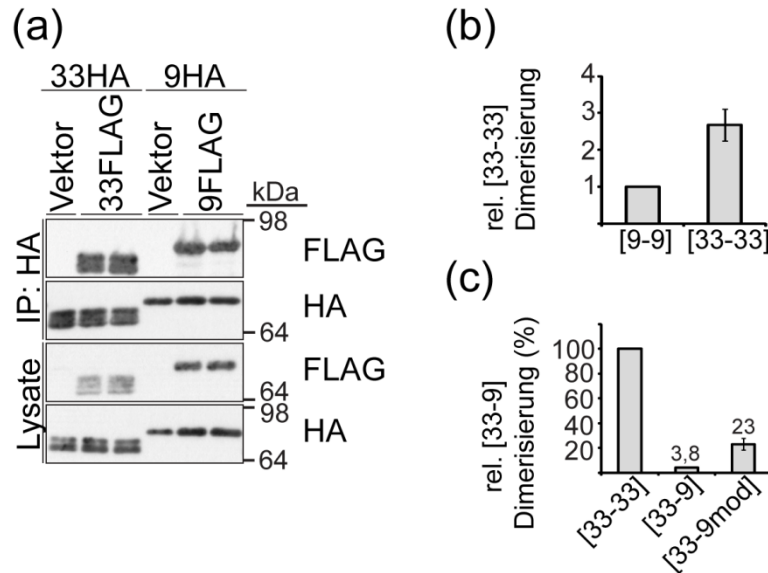
#### 4. Ergebnisse

L571	+	L	L	Konserviert
E572		Q	R	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimer-kontakfläche von SNX9
Q574		Q	Q	Konserviert
V575	+	I	I	Konserviert
Y578	+	F	Y	Ähnliche Aminosäure, aber möglicher Verlust einer Wasserstoffbrücke
E579		Q	Q	Konserviert
I581		V	V	Konserviert
A582		T	G	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimer-kontakfläche von SNX9
L585	+	L	L	Konserviert
R586		E	E	Konserviert
A588		A	T	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimer-kontakfläche von SNX9
L589	+	L	L	Konserviert
F592	+	Y	Y	Konserviert
P593		D	D	Konserviert
V594		S	N	Nicht kompatibel, aber keine wichtige Beteiligung an der Dimer-kontakfläche von SNX9
M595	+	V	L	Nicht kompatibel, andere Größe und Form

#### 4.10 Dissoziationskonstanten der (SNX33)<sub>2</sub> und SNX33-SNX9mod Dimere

Um zusätzliche Hinweise auf die Existenz oder Nichtexistenz eines SNX33-SNX9 Heterodimers zu erlangen, wurden die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Konstante) dieser Dimere abgeschätzt. Die  $K_d$ -Konstante von SNX9 liegt bei 7,9  $\mu\text{M}$  und berechnet sich aus der Konzentration des Dimers (AB) im Vergleich zum Monomer ( $K_d = [A] * [B] / [AB]$ ) (55). Die Menge des präzipitierten Interaktionspartners in der Koimmunpräzipitation ist ebenfalls direkt von der Dimerkonzentration abhängig. Daher wurden durch Vergleich der Koimmunpräzipitations-Effizienz die relativen  $K_d$ -Konstanten der unterschiedlichen Dimere abgeschätzt. Zunächst wurde die Menge an kopräzipitiertem Material zwischen SNX9-HA und SNX9-FLAG beziehungsweise SNX33-HA und SNX33-FLAG abgeschätzt. Die beiden jeweiligen Konstrukte wurden transient in HEK-293e Zellen koexprimiert und anschließend analog zu Abschnitt 4.4 im Koimmunpräzipitations-Assay analysiert. Die densitometrische Auswertung ergab eine im Vergleich zur Koimmunpräzipitation zwischen SNX9-HA und SNX9-FLAG 2,5-fache Menge an durch SNX33-HA präzipitiertem SNX33-FLAG (Abbildung 19a,b). Daraus errechnete sich ein  $K_d$ -Wert von  $\sim 3 \mu\text{M}$  für das SNX33 Dimer ( $7.9 \mu\text{M} / 2.5 = 3,16 \mu\text{M}$ ). Die  $K_d$ -Konstante des SNX33 Dimers liegt somit in der gleichen Größenordnung wie diejenige des SNX9 oder Amphiphysin Homodimers (39; 55). In einem weiteren Experiment wurde die  $K_d$ -Konstante der SNX33-SNX9 und SNX33-SNX9mod Heterodimere relativ zum (SNX33)<sub>2</sub> Homodimer untersucht. SNX33 zeigte wie bereits unter Abschnitt 4.4 beschrieben keine nennenswerte Interaktion mit SNX9, die geschätzte  $K_d$ -Konstante eines SNX33-SNX9 Homodimers war folglich

~30-fach höher als für das (SNX33)<sub>2</sub> Homodimer. Der Austausch kritischer Reste im SNX9mod Konstrukt führte zu einer ~6-fachen Zunahme der K<sub>d</sub>-Konstante und so zu einem K<sub>d</sub>-Wert von 13 µM für das SNX33-SNX9mod Heterodimer (Abbildung 19c).



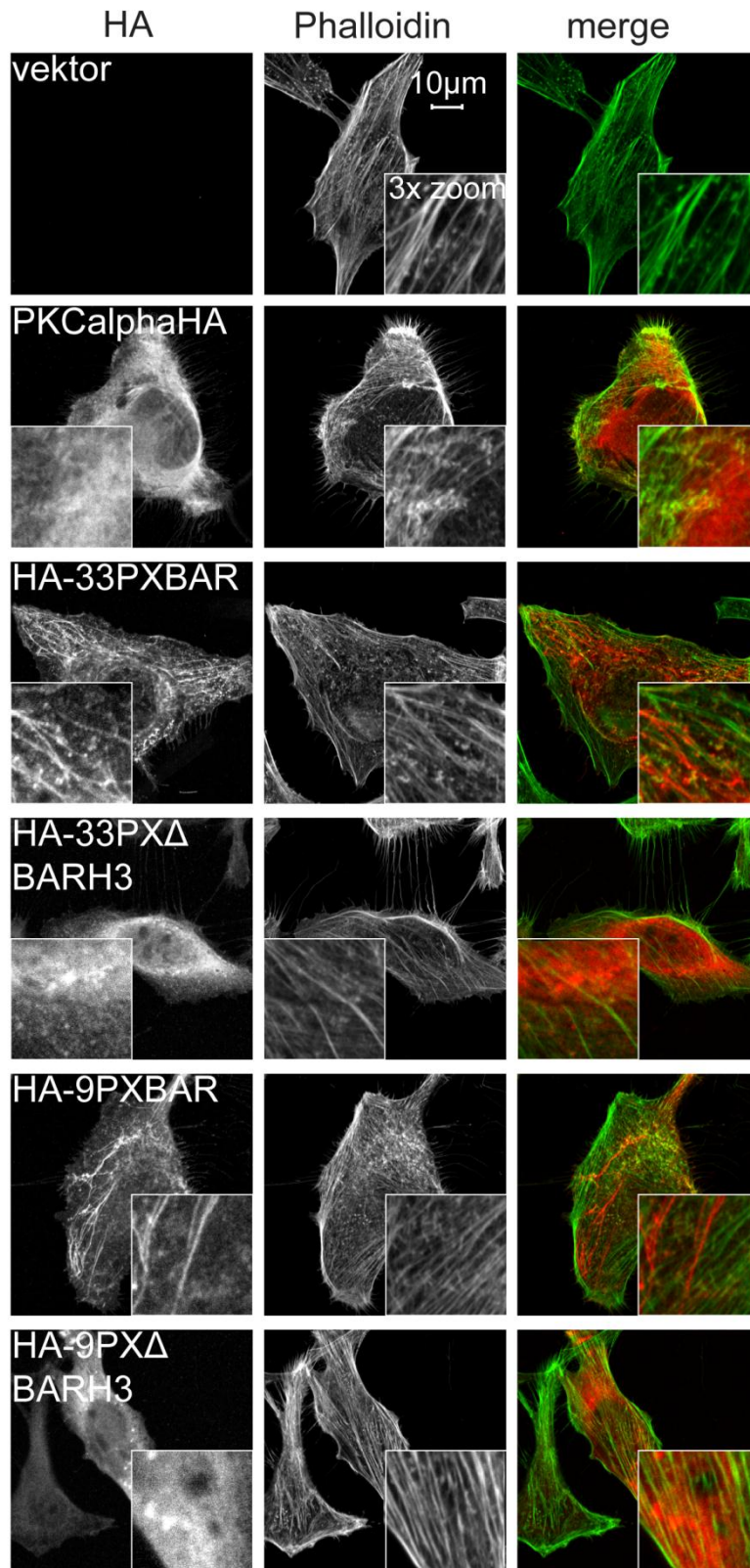
**Abbildung 19: Abschätzung der SNX33-SNX33 und SNX33-SNX9mod Dissoziationskonstanten** (a) HEK-293e Zellen wurden transient mit FLAG- oder HA-getaggetem SNX33 beziehungsweise SNX9 kotransfiziert (33HA, 33FLAG, 9HA, 9FLAG). Als Kontrolle wurde der leere Vektor jeweils mit SNX33-HA beziehungsweise SNX9-HA kotransfiziert. Die Analyse der Koimmunpräzipitation erfolgte wie in Abschnitt 4.4 beschrieben (b) Die relative Menge an SNX33-FLAG, welches mit SNX33-HA kopräzipitierte, wurde berechnet (Anreicherung der FLAG Konstrukte in der HA Ko-IP geteilt durch die Effizienz der Immunpräzipitation (IP) = [(IP HA und Blot FLAG : Ladekontrolle FLAG) : (IP HA und Blot HA : Ladekontrolle HA)] und mit der relativen Menge an SNX9-FLAG, welches von SNX9-HA präzipitiert wurde, verglichen (c) Analog zu (b) wurde die relative Menge an SNX33-FLAG, die von SNX9/SNX9mod präzipitiert wurde im Vergleich zur relativen Menge von SNX33-FLAG, welches von SNX33-HA präzipitiert wurde, verglichen. Dabei dienten die Western Blots in Abbildung 18 als Grundlage für die dargestellten Quantifizierungen. Die gezeigten Western Blots stellen repräsentativ die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Balkendiagramme repräsentieren Mittelwerte, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken in beide Richtungen aufgetragen.

#### 4.11 Die Deformation der Plasmamembran durch SNX33 benötigt eine intakte BAR Domäne

BAR Domänen sind neben ihrer Eigenschaft als Dimerisierungsmodule an der Deformation zellulärer Membranen beteiligt (8; 9; 36; 40; 42). Die SNX33 PXBAR Domäne ist ebenso wie die PXBAR Domänen von SNX9 und SNX18 in der Lage, die Plasmamembran zu deformieren. Dies führt zur Entstehung zahlreicher zytosolischer



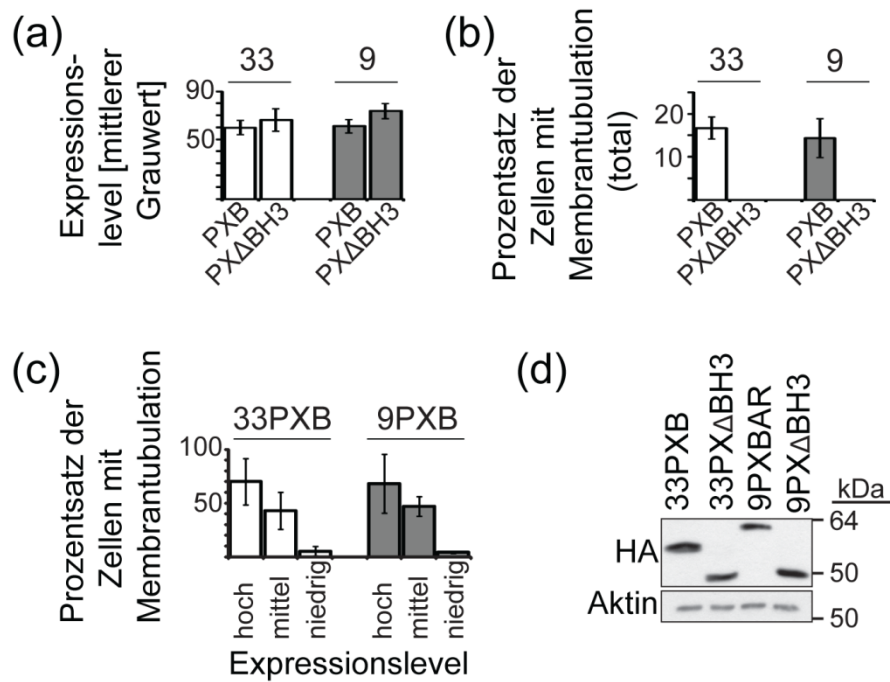
Membrantubuli, die eine Länge von mehreren Mikrometern erreichen können (11; 112). Dieses Phänomen der Membrantubulierung wurde bisher für eine Reihe weiterer BAR Proteine beobachtet (113-116). Im Fall der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe ist die PXBAR Domäne ausreichend, um die Membran aktiv zu deformieren. Die so generierten Tubuli sind dabei länger, als dies nach Transfektion des jeweiligen Vollängen-Proteins der Fall ist. Dies wird auf die Abwesenheit der SH3 Domäne zurückgeführt. Diese Domäne rekrutiert wahrscheinlich Dynamin an die einzelnen Tubuli, das dort durch mehrfaches Abschnüren kleiner Vesikel beziehungsweise ganzer Tubulusabschnitte zu deren Verkürzung führt (11; 18; 71). Unter endogenen Bedingungen und bei leichter Überexpression des Vollängen-Proteins zeigen die SNX<sup>9/18/33</sup> daher nur ein punktförmiges Verteilungsmuster und sehr kurze Tubuli, welche sowohl im Zytosol als auch an der Zellplasmamembran beobachtet werden können (11). Das Phänomen der Membrantubulierung kann also als Nachweis dienen, dass ein BAR Protein in der Lage ist aktiv die Membran zu deformieren. Eine SNX33 Mutante, bei der die letzte Helix der BAR Domäne deletiert worden ist (SNX33 $\Delta$ BARH3), konnte wie in Abschnitt 4.4 gezeigt keine Dimere mit SNX33 ausbilden. Das Dimerisieren der BAR Domäne ist jedoch Voraussetzung für die Ausbildung eines funktionellen, halbmondförmigen Dimers und damit für die Fähigkeit, an zelluläre Membranen zu binden und deren Krümmungszustand zu beeinflussen (8; 36; 40). Um zu testen, ob eine Deletion der letzten Helix der SNX33 BAR Domäne auch deren Potential zur Membrandeformation beeinflusst, wurde mehrere SNX33 Konstrukte generiert. Zunächst wurde ein Konstrukt kloniert, welches lediglich aus der PXBAR Superdomäne von SNX33 bestand (SNX33PXBAR-HA). Zusätzlich wurde ein PXBAR Konstrukt mit defekter BAR Domäne (SNX33PX $\Delta$ BARH3-HA) analog zu SNX33 $\Delta$ BARH3 kloniert. Diese Konstrukte wurden transient in HeLa Zellen exprimiert, die Zellen anschließend fixiert und mit dem HA.11 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper der HA Antikörper sichtbar gemacht und die Zellen unter einem konfokalen Mikroskop analysiert (Abbildung 20, Spalte 1).



**Abbildung 20: Die Ausbildung der Membrantubuli durch die SNX33PXBAR Domäne ist von einer intakten BAR Domäne abhängig** Mit einem N-terminalem HA Tag versehene Konstrukte der PXBAR Domäne von SNX33 und SNX9 (HA-33PXBAR, HA-9PXBAR) wurden transient in HeLa Zellen exprimiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich der leere Vektor und ein cytosolisches Protein ohne BAR Domäne (PKCalpha) transfiziert. Die Zellen wurden sowohl mit einem Antikörper gegen den HA

Tag als auch mit Phalloidin angefärbt, um das Aktin-Zytoskelett darzustellen. Die Analyse in der Immunfluoreszenz zeigte eine Tubulierung der Zellplasmamembran. Diese Form der Membrandeformation war bei den Konstrukten mit defekter BAR Domäne (HA-33PX $\Delta$ BARH3 und HA-9PX $\Delta$ BARH3) nicht mehr nachweisbar. Merge: überlappende Darstellung der HA- und Phalloidin-Färbung.

Zellen, die mit SNX33PXBAR transfiziert wurden, zeigten in ~15% der Fälle die typische Membrantubulierung (Abbildung 21b). Die Tubuli hatten eine Länge von teilweise über 20  $\mu$ M, mit gelegentlichen Verzweigungen. Die restlichen 85% der Zellen zeigten ein diffus bis punktförmiges, vorwiegend zytosolisches Muster. Bei den Zellen, die mit SNX33PX $\Delta$ BARH3 transfiziert wurden, konnte keine Membrantubulierung festgestellt werden. Hier konnte lediglich ein feines, punktförmiges Muster beobachtet werden. Die defekte PXBAR Superdomäne war also nicht mehr in der Lage, die Membran zu deformieren. Als Kontrolle wurden auch die entsprechenden Konstrukte für SNX9 kloniert und in HeLa Zellen exprimiert (Abbildung 20, Spalte 1). Auch hier konnte in ~15% der mit SNX9PXBAR transfizierten Zellen eine Membrantubulierung nachgewiesen werden, wohingegen dieses Phänomen bei Zellen, die mit SNX9PX $\Delta$ BARH3 transfiziert wurden, nicht zu beobachten war (Abbildung 21b). Um auszuschließen, dass die Abwesenheit der Membrantubuli nicht durch einen vergleichsweise niedrigen Expressionslevel hervorgerufen wurde, wurden die relativen Expressionslevel der einzelnen Konstrukte bestimmt. Dazu wurde jeder Zelle nach Aufnahme mit der Kamera des konfokalen Mikroskops ein individuell ein Grauwert zugewiesen, welcher in direkter Relation zum Expressionslevel des transfizierten Konstrukts stand. Wie in Abbildung 21a ersichtlich, waren die Expressionslevel der vier untersuchten Konstrukte annähernd gleich.



### Abbildung 21: Quantitative Auswertung der Membrantubulierung durch SNX33PXBAR

(a) Die Expressionslevel individueller Zellen wurden mit der Bildauswertungs Software Fiji bestimmt. Dabei wurden nur Zellen ausgewertet, deren Signalintensität über einem zuvor bestimmten Grenzwert (über dem Hintergrundsignal der mit leerem Vektor transfizierten Zellen) lag. Die Zahlen oberhalb der Querbalken geben an, ob die jeweiligen Konstrukte von SNX33 oder SNX9 abstammen. PXB: PXBAR Konstrukt; PX $\Delta$ BH3: PX $\Delta$ BARH3 Konstrukt. (b) Individuelle Zellen wurden auf die An- oder Abwesenheit von Membrantubuli untersucht. (c) Es folgte eine Klassifikation der Zellen anhand der unter (b) gemessenen Signalstärke. Dabei wurde der Bereich zwischen dem kleinsten und größten Grauwert in 3 gleiche Unterbereiche aufgeteilt. Anschließend erfolgte so eine Einteilung der einzelnen Zellen in eine Gruppe mit hohem, mittlerem oder niedrigem Expressionslevel. Der Prozentsatz der Zellen mit Membrantubulierung ist für jede Gruppe dargestellt. (d) Analyse der transfizierten Konstrukte im Western Blot. Die einzelnen SNX33 und SNX9 Mutanten zeigten dabei relativ ähnliche Expressionslevel. Die quantitative Auswertung und die gezeigten Bilder aus der Immunfluoreszenz beruhen auf der Analyse von je 100 Zellen in 4 unabhängigen Experimenten. Die Balkendiagramme repräsentieren Mittelwerte, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken in beide Richtungen aufgetragen.

Auch bei der Detektion der einzelnen Konstrukte im Western Blot waren die Signale der beobachteten Konstrukte relativ ähnlich (Abbildung 21d). Es erfolgte eine Einteilung der Zellen nach Expressionslevel in drei verschiedenen Gruppen (hohe-, mittlere- und niedrige Expression). So konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz der Zellen mit Membrantubulierung unter den stark exprimierenden Zellen wesentlich höher ist (~ 70%) als bei den schwach exprimierenden Zellen (~5%). Die Membrantubulierung war also direkt von der Konzentration des PXBAR Proteins

---

abhängig (Abbildung 21c). Dabei schien es einen kritischen Grenzwert zu geben, ab welchem die Tubulierung ähnlich einem Alles-oder-Nichts Gesetz erfolgte, da die Zellen entweder zahlreiche Tubuli aufwiesen oder eine diffuse zytosolische Verteilung der PXBAR Konstrukte zeigten. Als weitere Kontrolle wurde die Proteinkinase C Alpha (PKCalpha), ein zytosolisches Protein ohne bekannte BAR Domäne oder membrandeformierenden Eigenschaften transfiziert (Abbildung 20, Spalte 1) (117; 118). Damit sollte ausgeschlossen werden, dass Artefakte während der Präparation der Zellen für die Immunfluoreszenz zu Strukturen führten, die mit Membrantubuli verwechselt werden konnten.

Eine Studie weist auf eine WASP vermittelte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch SNX33 hin (81). Dabei bindet SNX33 entweder über die SH3 oder BAR Domäne an den Aktin Modulator WASP. Um eine mögliche Assoziation der SNX33 PXBAR induzierten Tubuli zum Aktin-Zytoskelett nachzuweisen, wurden die Zellen zusätzlich mit fluoreszierendem Phalloidin angefärbt (Abbildung 20, Spalte 2). Dabei war jedoch keine signifikante Überlagerung zwischen Aktin-Filamenten und den Membrantubuli sichtbar (Abbildung 20, Spalte 3). Auch eine Änderung der Struktur des Aktin-Zytoskeletts konnte im Vergleich zu Zellen, welche nur mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, nicht festgestellt werden. Zusammenfassend konnte in diesem Experiment also gezeigt werden, dass eine intakte BAR Domäne für die membrantubulierenden Eigenschaften von SNX33 nötig ist. Die spezifische Invagination der Plasmamembran in Form von Tubuli war dabei direkt von der Konzentration der PXBAR Domäne abhängig. Die tubulären Strukturen waren dabei unabhängig vom Aktin-Zytoskelett, dessen Morphologie nicht durch die Anwesenheit der PXBAR Proteine verändert wurde.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die C-terminale BAR Domäne von SNX33 sowohl für dessen Dimerisierung als auch für die aktive Deformation der Plasmamembran verantwortlich ist. Dabei konnten die strukturellen und physikalisch-chemischen Mechanismen der SNX33 Dimerisierung auf atomarer Ebene aufgeklärt werden. Diese detaillierte Analyse führte zu einem besseren Verständnis der physiologischen Funktion von SNX33 und schafft die Grundvoraussetzung für die Vorhersage möglicher Interaktionen zwischen BAR Proteinen anhand der dargestellten Methodik. Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Struktur-Funktionsanalyse von SNX33 im Hinblick auf die physiologische Funktion dieses Proteins analysiert und kritisch diskutiert werden. Vor allem die methodisch bedingte Aussagekraft individueller Experimente sowie bereits veröffentlichte Daten zu SNX33 und den homologen Proteinen SNX9 und SNX18 sollen dabei berücksichtigt werden.

### 5.1 Funktionelle Gemeinsamkeiten von SNX33, SNX9 und SNX18

SNXe stellen eine heterogene Gruppe von zytosolischen und membranassoziierten Proteinen dar (1-3; 10). Die funktionelle Heterogenität dieser Proteinfamilie kann dadurch erklärt werden, dass deren Klassifikation lediglich auf der Anwesenheit der SNX-PX Domäne innerhalb des jeweiligen Proteins beruht (1; 6). Innerhalb der einzelnen SNX Untergruppen, die im Wesentlichen nach phylogenetischen Kriterien eingeteilt werden, findet sich jedoch eine funktionelle Redundanz zwischen den einzelnen Mitgliedern (6). Dieses konnte zum Beispiel für die homologen Proteine SNX1 und SNX2 gezeigt werden, die Orthologe des Hefeproteins Vps17 darstellen und während der Embryonalentwicklung der Maus und beim Ras homology Growth-related (RhoG)-abhängigem Umbau der Plasmamembran funktionell redundant sind (6; 119-122). SNX33 ist Bestandteil der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe, von der bis jetzt lediglich SNX9 befriedigend charakterisiert werden konnte. Es bietet sich daher eine vergleichende Analyse von SNX33 und SNX9 an, um mögliche Rückschlüsse auf die Funktion des weniger gut charakterisierten homologen Proteins zu ziehen. Bisher konnte durch

Überexpressionsstudien gezeigt werden, dass SNX33 über seine SH3 Domäne an Dynamin bindet und so die Endozytose von Transmembranproteinen wie APP, PrP oder Transferrin moduliert (12; 82). Eine weitere Studie deutet darauf hin, dass SNX33 mit WASP interagiert und so die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst (81). Diese Studien sprechen also dafür, dass SNX33 in eukaryotischen Zellen eine ähnliche Funktion wie SNX9 besitzt, welches ein essentielles Protein für die Koppelung der Endozytose an die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts darstellt (45; 57; 60; 61).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass SNX33 unter endogenen Bedingungen in einem höher-molekularen Komplex vorliegt. Die Elution in der Gelfiltration erfolgte direkt nach dem Marker für das Leervolumen der Säule und somit mit Proteinkomplexen im Megadaltonbereich. Darüber hinaus konnte SNX33 in einem Größenbereich von ~800kDa nachgewiesen werden, in Fraktionen, in denen parallel auch SNX9 und Dynamin nachgewiesen werden konnten. Dynamin konnte in Folgeexperimenten und anderen Studien als Interaktionspartner von SNX33 identifiziert werden (11; 12). SNX33 scheint also endogen in mindestens zwei verschiedenen Komplexen vorzuliegen, einem höher molekularen Komplex und einem niedriger molekularen Komplex, in letzterem zusammen mit der GTPase Dynamin. Außerdem ist SNX33 unabhängig von weiteren Interaktionspartnern in der Lage, durch Homodimerisierung und potentielle Oligomerisierung zum Aufbau der beobachteten Proteinkomplexe beizutragen. Zum einen konnte durch Koimmunpräzipitation gezeigt werden, dass mindestens zwei SNX33 Moleküle miteinander interagieren können. Zum anderen konnten in der nativen Gelelektrophorese drei unterschiedliche SNX33-positive Banden detektiert werden, in einem Größenbereich von erwarteten SNX33 Mono-, Di- und Oligomeren. SNX33 wurde fast ausschließlich im Größenbereich des berechneten SNX33 Oligomers und Dimers gefunden, und das trotz Anwesenheit von Detergenzien. Daher ist davon auszugehen, dass unter endogenen und daher detergenzfreien Bedingungen praktisch keine SNX33 Monomere vorliegen und das SNX33 Dimer die kleinste funktionelle Einheit von SNX33 darstellt. Durch „Pull down“ mit einem GST Fusionsprotein, das die N-terminale SH3 Domäne von SNX33 enthielt, konnten potentielle Bindungspartner der SNX33-SH3 Domäne identifiziert werden, darunter Dynamin2, Synaptojanin2 und DIAPH1. Dynamin2, das für das Abschnüren neu

entstandener Vesikel von biologischen Membranen verantwortlich ist, wurde bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe als Interaktionspartner von SNX33 beschrieben, der essentiell für die Modulation der Endozytose durch SNX33 ist (12; 123; 124). Parallel dazu zeigt eine weitere Studie die Interaktion von endogenem SNX33 und Dynamin2 (11). Synaptojanin, eine PI-Phosphatase mit C-terminaler PRD, ist für die Lipid Hydrolyse in den initialen Stadien der CME verantwortlich und verändert so lokal das PtdInsPs Profil der Plasmamembran. (125-127). Zusätzlich bindet Synaptojanin über die PRD Dynamin und besitzt daher eine duale Funktion bei der CME, insbesondere bei der Endozytose von synaptischen Vesikeln (128; 129). Auch SNX9 und SNX 18 wurden als Interaktionspartner dieser Phosphatase identifiziert (77; 103). DIAPH1 ist an der Elongation nicht-verzweigter Aktinfilamente beteiligt (100; 130). Diese neu identifizierten Interaktionspartner deuten also auf einer Rolle von SNX33 bei der Endozytose und der Aktin-Polymerisierung hin und lassen sich mit den bereits publizierten Daten zur möglichen Funktion von SNX33 vereinbaren. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der durchgeführte „Pull down“ Assay eine beschränkte Aussagekraft besitzt, da die isolierte SNX33 SH3 Domäne eine andere Bindungsspezifität im Vergleich zum Volllängen-Protein besitzen könnte, bedingt durch eine geringfügig andere Faltung oder der Anwesenheit zusätzlich an der Interaktion beteiligter Protein-Protein Interaktionsdomänen.

Zusammenfassend sprechen diese Daten für viele mechanistische Gemeinsamkeiten von SNX33 und dessen Homologen SNX9 und SNX18. SNX33 liegt wie SNX9 in einem höher-molekularen Komplex vor und bildet Homodimere aus, welche wahrscheinlich die kleinste funktionelle Einheit unter endogenen Bedingungen darstellen (57). Dabei scheint eine Dimerisierung von SNX33 Voraussetzung für eine anschließende Phosphorylierung zu sein, parallel zur Phosphorylierung von SNX9 durch ACK2 (74). Weiterhin teilt SNX33 mit Dynamin, Synaptojanin und NWASP mehrere gleiche Interaktionspartner mit SNX9 und SNX18, und daher möglicherweise eine funktionelle Redundanz im Hinblick auf die Endozytose und die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (11; 12; 63; 77; 81).



## 5.2 Die BAR Domäne ermöglicht die Homodimerisierung und verhindert die Heterodimerisierung von SNX33

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die C-terminale BAR Domäne für die Dimerisierung und Membrantubulierung von SNX33 verantwortlich ist. BAR Domänen können dabei sowohl der Homo- als auch der Heterodimerisierung zwischen BAR Proteinen dienen (8; 10; 95; 105). Daher könnte eine Analyse der SNX33 BAR Domäne darüber Aufschluss geben, ob über diese Domäne ein funktioneller „Cross Talk“ zwischen den Mitgliedern der SNX<sup>9/81/33</sup> Untergruppe stattfindet. Koimmunpräzitationsstudien im Rahmen dieser Dissertation führten zu der Erkenntnis, dass SNX33 über seine BAR-Domäne ebenso wie SNX9 und andere BAR-Proteine Homodimere ausbildet. Eine Dimerisierung durch die SH3 Domäne konnte durch Domänendeletionsanalyse ausgeschlossen werden. Durch reziproken Austausch der BAR Domänen von SNX33 und SNX9 wurde darüber hinaus bestätigt, dass die intakte BAR Domäne nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend ist, um spezifisch die beobachtete SNX33-SNX33 Interaktion zu vermitteln. Eine Heterodimerisierung, wie sie für andere SNXe und BAR Proteine beschrieben wurde, konnte für SNX33-SNX9 und SNX33-SNX18 jedoch nicht bestätigt werden. Diese Daten unterstützen eine Studie, bei der endogenes SNX33 erfolgreich präzipitiert wurde, jedoch ohne nachweisbare Kopräzitation von SNX9 oder SNX18. Auch in der Immunfluoreszenz, bei der SNX33 mäßig überexprimiert wurde, konnten die Autoren dieser Studie keine Kolokalisierung der drei Proteine feststellen (11). Im Gegensatz dazu spricht eine weitere Arbeit für eine Heterodimerisierung von SNX33 mit SNX9. Zhang und Kollegen zeigen die Koimmunpräzitation von SNX9 mit SNX18 und eine Kolokalisierung der beiden Proteine in der Immunfluoreszenz (81). Bei dieser Studie wurden jedoch beide Interaktionspartner transient stark überexprimiert. Auch während der Anfertigung dieser Arbeit konnte eine artifizielle Heterodimerisierung nach transienter Überexpression von SNX33 und SNX9 beobachtet werden. Durch Verwendung einer Zelllinie, die SNX33 stabil auf geringem Niveau exprimiert, und leichter transienter Überexpression von SNX9, war diese Heterodimerisierung jedoch nicht mehr zu beobachten. Die endogenen Expressionslevel von SNX9 und SNX33 lagen bei dem zuletzt erwähnten Ansatz immer noch ein Vielfaches unter den angegebenen Bedingungen, was zusätzlich gegen eine Heterodimerisierung der beiden Proteine in vivo spricht. Auch der Austausch der SNX33 BAR Domäne gegen

die von SNX9 führte nicht zu einer Interaktion des mutierten SNX33 Konstrukts mit SNX33. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die SNX33 BAR Domäne ausreichend ist, eine Heterodimerisierung mit SNX9 zu verhindern.

Um einen detaillierteren Einblick in die Mechanismen der SNX9 und SNX33 BAR Domäne zu erhalten, welche die Spezifität der Homo- beziehungsweise Heterodimerisierung bestimmen, erfolgte eine vergleichende Analyse der SNX33 und SNX9 BAR Domänen. Das „Homologie Modelling“ der SNX33 BAR Domäne anhand der bekannten SNX9 Kristallstruktur ermöglichte die Identifikation kritischer Aminosäuren innerhalb der Dimerkontaktfläche, welche mit der Ausbildung eines stabilen Heterodimers nicht vereinbar waren. Die einzelnen Reste waren dabei entweder für eine sterische Inkompatibilität der beiden Protomere verantwortlich, oder führten zum Verlust von essentiellen hydrophoben Wechselwirkungen, Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindungen, die für die Ausbildung des jeweiligen Homodimers verantwortlich waren. Die Präzision der „in silico“ Analyse einer Proteinstruktur ist methodisch der experimentell erhobenen Kristallstruktur unterlegen. Durch anschließende Mutation der inkompatiblen Reste innerhalb der SNX9 BAR Domäne zu den korrespondierenden Resten von SNX33 konnte jedoch eine Heterodimerisierung des modifizierten SNX9 mit SNX33 nachgewiesen und somit die Validität der „in silico“ Analyse experimentell bestätigt werden. Auch die experimentelle Abschätzung der Dissoziationskonstanten argumentiert gegen eine SNX9-SNX33 Heterodimer, da dessen Dissoziationskonstante 30-fach über der des SNX9 Homodimers lag. Zwischen SNX33 und SNX18 konnte ebenfalls keine Heterodimerisierung festgestellt werden, obwohl diese Proteine über einen höheren Prozentsatz an konservierten Aminosäuren verfügen als dies für das SNX33 beziehungsweise SNX9 ist. Die anschließende „in silico“ Analyse bestätigte auch diese Aussage. Diese „in silico“ Analyse muss jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, da hier zwei Moleküle ohne bekannte Kristallstruktur miteinander verglichen wurden. Die Position der einzelnen Reste von SNX33 und SNX18 wurde dabei auf die Raumkoordinaten der SNX9 Struktur bezogen. Kleine Veränderungen, zum Beispiel eine leichte Rotation oder ein zusätzlicher Knick einer einzelnen Helix, könnten jedoch zu einer abweichenden Konfiguration der berechneten Kontaktfläche des jeweiligen Protomers führen.

### 5.3 Redundante Mechanismen und funktionelle Unterschiede der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe

Die Daten der verfügbaren Literatur und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mechanistische Gemeinsamkeiten von SNX33 und seinen homologen Partnern SNX9 und SNX18. Eine Heterodimerisierung, wie sie für redundante Proteine erwartet werden könnte, findet zwischen den Mitgliedern der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe jedoch nicht statt. Auf einem zellphysiologisch notwendigen Heterodimer würde ein größerer evolutionärer Druck lasten, als dies für das theoretische SNX33-SNX9 beziehungsweise SNX33-SNX18 Heterodimer der Fall ist. Die 36% beziehungsweise 55% identischen Reste der BAR Domänen zwischen diesen beiden Proteinen sprechen dafür, dass sich die Proteine nach Abspaltung von ihrem Vorfahren unabhängig voneinander entwickelt haben. Die fehlende Heterodimerisierung spricht also für eine unabhängige Funktion der untersuchten SNXe. SNX33, SNX9 und SNX18 könnten daher an verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert sein, dort jedoch aufgrund ihrer mechanistischen Gemeinsamkeiten durch Deformation zellulärer Membranen und in ihrer Eigenschaft als Adapterproteine ähnliche Aufgaben übernehmen. Gegen diese Theorie sprechen Studien die für eine redundante Funktion der SNXe<sup>9/18/33</sup> sprechen (12; 77; 81). So modulieren sowohl SNX33 als auch SNX9 und SNX18 nach transienter Überexpression die Endozytose. Außerdem kann transient überexprimiertes SNX18 den durch „Knock down“ von SNX9 hervorgerufenen Endozytosedefekt kompensieren (12; 81; 131). Diese Experimente wurden jedoch stets unter transienter Überexpression durchgeführt, und damit unter Bedingungen, die nicht der Situation in vivo entsprechen. Dem gegenüber zeigt eine andere Studie, dass endogenes SNX33 und SNX18 auf leichteren Membranen als SNX9 lokalisiert sind und auch in der Immunfluoreszenz eine unterschiedliche Lokalisation aufweisen. Auch konnte gezeigt werden, dass sich SNX9 und SNX18 in ihrem PI-Bindungsmuster unterscheiden und unterschiedliche Adapterproteine (AP-1 beziehungsweise AP-2) binden (11). Die einzelnen SNXe könnten dadurch an unterschiedliche Membranen rekrutiert werden, um dort mit ihren jeweiligen Interaktionspartnern in Kontakt zu treten. Die jeweiligen Interaktionspartner müssen sich dabei nicht zwangsläufig unterscheiden. Beispielhaft sei Dynamin2 genannt, dessen Funktion beim Abschnüren neu entstandener Vesikel vor allem bei der CME genau charakterisiert ist (123; 124). Dynamin2 ist jedoch auch an der Clathrin-unabhängige Endozytose

---

und dem Transport zellulärer Membranen zwischen einzelnen Kompartimenten beteiligt, zum Beispiel beim Abschnüren von Vesikeln von Endosomen und dem TGN (123; 124; 132-136). Es wäre also denkbar, dass die unterschiedlichen Dynamamin Pools durch die jeweiligen Mitglieder der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe reguliert werden. Auch die Reorganisation des Zytoskeletts, vor allem in Verbindung mit einer Deformation der Plasmamembran, könnte von SNX9, SNX18 und SNX33 an ihrem spezifischen Wirkungsort reguliert werden. Die SNX<sup>9/18/33</sup> interagieren mit WASP, SNX33 wie in dieser Arbeit gezeigt auch mit dem Aktin-Regulator DIAPH1. Eine Studie weist zusätzlich auf eine regulatorische Funktion von SNX33 bei der Aktin-abhängigen Zytokinese hin (81; 137-139). Ähnlich wie SNX9 an der Plasmamembran könnten also auch SNX33 und SNX18 an ihrem Wirkungsort die Deformation zellulärer Membranen mit der Reorganisation des Aktin Zytoskeletts verknüpfen.

#### **5.4 Ausblick**

Diese Arbeit bestätigt und ergänzt die bis dato veröffentlichten Daten zu SNX33. Darüber hinaus konnten durch die detaillierte und umfassende Analyse der SNX33 BAR Domäne für das gesamte Feld der BAR Proteine im Allgemeinen und das der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe im Speziellen neue Einblicke in die Spezifität der BAR Domänen Dimerisierung gewonnen werden. Durch Kombination struktureller „in silico“ Analysen mit zellbiologischen und biochemischen Methoden konnte die Existenz von Heterodimeren in dieser SNX Untergruppe ausgeschlossen und damit eine kontroverse Fragestellung in diesem Forschungsgebiet beantwortet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass „Homologie Modelling“ in Kombination mit biochemischen Analysen zur Vorhersage potentieller Heterodimere dienen kann, insbesondere wenn die Kristallstruktur eines Interaktionspartners bekannt ist. Die Möglichkeit der Heterodimerisierung könnte dabei das Funktionsspektrum der jeweiligen Protomere dadurch erweitern, dass unterschiedliche Bindungspartner rekrutiert und in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Somit würde die Formation funktionell bedeutender Proteinkomplexe, deren Assemblierung von den beiden rekrutierten Bindungspartnern abhängig ist, begünstigt oder erst ermöglicht.

## 6. Zusammenfassung

Anhand der Struktur-Funktionsanalyse von SNX33 im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

Endogenes SNX33 lag im Zytosol vorwiegend in Form höher-molekularer Komplexe vor. SNX33 konnte zum einen in Proteinkomplexen im Megadaltonbereich, als auch in einem Komplex von ~800 kDa nachgewiesen werden. Außerdem erfolgte ein Nachweis von SNX33 in kleineren Proteinkomplexen, in einem Größenbereich von erwarteten SNX33 Dimeren und Oligomeren. Als Bestandteile der beobachteten Proteinkomplexe konnten als potentielle neue Bindungspartner der SNX33 SH3 Domäne Dynamin2, Synaptojanin2, Pyruvatkinase und Protein diaphanous homolog 1 identifiziert werden. Diese Bindungspartner deuten auf eine Funktion von SNX33 bei der Endozytose und der Reorganisation des Aktin Zytoskeletts hin. Eine detaillierte Untersuchung dieser neu identifizierten Interaktionspartner konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen. Die identifizierten Bindungspartner schaffen jedoch Anreiz für weiterführende Studien.

SNX33 war in der Lage Homodimere auszubilden, eine Heterodimerisierung mit SNX1, SNX9 und SNX18 konnte nicht beobachtet werden. Dieses spricht für eine unabhängige Funktion von SNX33 innerhalb der SNX<sup>9/18/33</sup> Untergruppe. Die SNX33-SNX33 Interaktion wurde dabei von der intakten BAR Domäne vermittelt, welche auch für die Membrandeformation durch die PXBAR Superdomäne verantwortlich war. Durch die Kombination biochemischer Methoden mit einer systematischen Mutationsanalyse und komparativem „Homologie Modelling“ konnte gezeigt werden, dass durch die SNX33 BAR Domäne gezielt eine Homodimerisierung vermittelt und eine SNX33-SNX9 beziehungsweise SNX33-SNX18 Heterodimerisierung verhindert wurde. Dabei wurden kritische Aminosäurereste innerhalb der SNX-BAR Domäne identifiziert, die für die Spezifität der beobachteten BAR-BAR Interaktion verantwortlich waren.

Durch die Struktur-Funktionsanalyse von SNX33 konnten daher sowohl neue Erkenntnisse über dieses bisher kaum untersuchte Familienmitglied der SNXe

---

gewonnen als auch eine neue Herangehensweise zur Untersuchung von BAR-BAR Interaktionen etabliert werden. Die Kombination der dargestellten Methoden ermöglicht die systematische Analyse potentieller Interaktionen von BAR Domänen. Dadurch können Vorhersagen über die Homo- oder Heterodimerisierung dieser Proteine und die damit verbundenen funktionellen Konsequenzen getroffen werden.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ACK2	aktivierten Cdc42-assoziierten Tyrosin Kinase 2
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AP	Adapterprotein
Arp	Actin related protein
BAR	Bin 1, Amphiphysin 1, RVS 161/167
BN	blue native
CCP	Stachelsaumbläschen, clathrin coated pit
CD	cluster of differentiation
CME	Clathrin abhängige Endozytose, clathrin mediated endocytosis
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidest
DIAPH1	Protein diaphanous homolog 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, epidermal Growth factor receptor
FASL	Fas Ligand
F-BAR	Fer CIP4 homology BAR
FCS	Fötale Kälberserum, fetal calf serum
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	Merrettich-Peroxidase, horseradish Peroxidase
I-BAR	Inverse-BAR
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
K <sub>d</sub> -Konstante	Dissoziationskonstante
LC	Domäne mit geringer Komplexität, low-complexity
OD	Optische Dichte
PACS1	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferten Salzlösung, phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PGS	Protein G Sepharose
PGS	Protein-G-Sepharose
PH	pleckstrin homology
Phox	phagozytische Oxidase
PI	Phosphatidylinositol
PI-Mix	Proteaseinhibitor-Mixtur
PKCalpha	Proteinkinase C alpha
PRD	prolinreiche Domäne
PrP	Prion-Protein
PtdInsPs	Phosphatidylinositolphosphate
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PX	Phox Homology
RE	Restriktionsendonuklease, Restriktionsenzym
RhoG	Ras homology Growth-related
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SH3	Src homology 3
siRNA	kurze interferierende RNA, short interfering ribonucleic acid
SNXe	Sorting Nexine
Sos	Son-of-Sevenless
TCA	Trichloressigsäure, trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Thyreoglobulin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
V0	Leervolumen, void volume
WASP	Wiscott Aldrich Syndrom Protein
Wnt	Wingless und Int1



---

$\beta$ APP

Beta-Amyloid Vorläuferprotein, beta amyloid precursor protein

---

## 8. Aminosäurecode

**Tabelle 24: Aminosäuren Einbuchstabencode**

Alanin	A	Glycin	G	Prolin	P
Arginin	R	Histidin	H	Serin	S
Asparagin	N	Isoleucin	I	Threonin	T
Aspartat	D	Leucin	L	Tryptophan	W
Cystein	C	Lysin	K	Tyrosin	Y
Glutamin	Q	Methionin	M	Valin	V
Glutamat	E	Phenylalanin	F		

## 9. Literaturverzeichnis

1. Seet L, Hong W. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta* 2006 Aug;1761(8):878-896.
2. Worby CA, Dixon JE. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2002 Dez;3(12):919-931.
3. Carlton J, Bujny M, Rutherford A, Cullen P. Sorting nexins--unifying trends and new perspectives. *Traffic* 2005 Feb;6(2):75-82.
4. Carlton JG, Cullen PJ. Sorting nexins. *Curr. Biol* 2005 Okt;15(20):R819-820.
5. Teasdale RD, Loci D, Houghton F, Karlsson L, Gleeson PA. A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochem. J* 2001 Aug;358(Pt 1):7-16.
6. Cullen PJ. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2008 Juli;9(7):574-582.
7. Kurten RC, Cadena DL, Gill GN. Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science* 1996 Mai;272(5264):1008-1010.
8. Habermann B. The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep* 2004 März;5(3):250-255.
9. Frost A, Unger VM, De Camilli P. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* 2009 Apr;137(2):191-196.
10. van Weering JRT, Verkade P, Cullen PJ. SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin. Cell Dev. Biol* 2010 Juni;21(4):371-380.
11. Håberg K, Lundmark R, Carlsson SR. SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking. *J. Cell. Sci* 2008 Mai;121(Pt 9):1495-1505.
12. Schöbel S, Neumann S, Hertweck M, Dislich B, Kuhn P, Kremmer E, Seed B, Baumeister R, Haass C, Lichtenthaler SF. A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem* 2008 Mai;283(21):14257-14268.
13. Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell. Sci* 2001 Apr;114(Pt 7):1253-1263.
14. Kaneko T, Li L, Li SS. The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front. Biosci* 2008;13:4938-4952.

15. Pawson T, Gish GD. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 1992 Okt;71(3):359-362.
16. Lundmark R, Carlsson SR. Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components. *J. Biol. Chem* 2003 Nov;278(47):46772-46781.
17. Lundmark R, Carlsson SR. The beta-appendages of the four adaptor-protein (AP) complexes: structure and binding properties, and identification of sorting nexin 9 as an accessory protein to AP-2. *Biochem. J* 2002 März;362(Pt 3):597-607.
18. Pylypenko O, Lundmark R, Rasmuson E, Carlsson SR, Rak A. The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9. *EMBO J* 2007 Nov;26(22):4788-4800.
19. Castagnoli L, Costantini A, Dall'Armi C, Gonfloni S, Montecchi-Palazzi L, Panni S, Paoluzi S, Santonico E, Cesareni G. Selectivity and promiscuity in the interaction network mediated by protein recognition modules. *FEBS Lett* 2004 Juni;567(1):74-79.
20. Sparks AB, Rider JE, Kay BK. Mapping the specificity of SH3 domains with phage-displayed random-peptide libraries. *Methods Mol. Biol* 1998;84:87-103.
21. Mongioví AM, Romano PR, Panni S, Mendoza M, Wong WT, Musacchio A, Cesareni G, Di Fiore PP. A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J* 1999 Okt;18(19):5300-5309.
22. Kato M, Miyazawa K, Kitamura N. A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *J. Biol. Chem* 2000 Dez;275(48):37481-37487.
23. Li SS. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem. J* 2005 Sep;390(Pt 3):641-653.
24. McCormick F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 1993 Mai;363(6424):15-16.
25. Hing H, Xiao J, Harden N, Lim L, Zipursky SL. Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* 1999 Juni;97(7):853-863.
26. McGee AW, Bredt DS. Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J. Biol. Chem* 1999 Juni;274(25):17431-17436.
27. Shiose A, Sumimoto H. Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem* 2000 Mai;275(18):13793-13801.

28. Tonikian R, Xin X, Toret CP, Gfeller D, Landgraf C, Panni S, Paoluzi S, Castagnoli L, Currell B, Seshagiri S, Yu H, Winsor B, Vidal M, Gerstein MB, Bader GD, Volkmer R, Cesareni G, Drubin DG, Kim PM, Sidhu SS, Boone C. Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS Biol* 2009 Okt;7(10):e1000218.
29. Evangelista M, Klebl BM, Tong AH, Webb BA, Leeuw T, Leberer E, Whiteway M, Thomas DY, Boone C. A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol* 2000 Jan;148(2):353-362.
30. Ellson CD, Andrews S, Stephens LR, Hawkins PT. The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J. Cell. Sci* 2002 März;115(Pt 6):1099-1105.
31. Ponting CP. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci* 1996 Nov;5(11):2353-2357.
32. Wishart MJ, Taylor GS, Dixon JE. Phoxy lipids: revealing PX domains as phosphoinositide binding modules. *Cell* 2001 Juni;105(7):817-820.
33. Lemmon MA. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2008 Feb;9(2):99-111.
34. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006 Okt;443(7112):651-657.
35. Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson CD, Anderson KE, Butler PJ, Lavenir I, Perisic O, Hawkins PT, Stephens L, Williams RL. The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol. Cell* 2001 Okt;8(4):829-839.
36. Masuda M, Mochizuki N. Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Semin. Cell Dev. Biol* 2010 Juni;21(4):391-398.
37. David C, Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity in stiff-Man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 and Rvs161. *FEBS Lett* 1994 Aug;351(1):73-79.
38. Suetsugu S, Toyooka K, Senju Y. Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin. Cell Dev. Biol* 2010 Juni;21(4):340-349.
39. Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJG, Evans PR, McMahon HT. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 2004 Jan;303(5657):495-499.
40. McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 2005 Dez;438(7068):590-596.

41. Zimmerberg J, McLaughlin S. Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers. *Curr. Biol* 2004 März;14(6):R250-252.
42. Gallop JL, McMahon HT. BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem. Soc. Symp* 2005;(72):223-231.
43. Henne WM, Kent HM, Ford MGJ, Hegde BG, Daumke O, Butler PJG, Mittal R, Langen R, Evans PR, McMahon HT. Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure* 2007 Juli;15(7):839-852.
44. Owen DJ, Luzio JP. Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol* 2000 Aug;12(4):467-474.
45. Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL. SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev. Cell* 2007 Juli;13(1):43-56.
46. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003 März;422(6927):37-44.
47. Jao CC, Hegde BG, Gallop JL, Hegde PB, McMahon HT, Haworth IS, Langen R. Roles of amphipathic helices and the bin/amphiphysin/rvs (BAR) domain of endophilin in membrane curvature generation. *J. Biol. Chem* 2010 Juni;285(26):20164-20170.
48. Ford MGJ, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJK, Evans PR, McMahon HT. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 2002 Sep;419(6905):361-366.
49. Pant S, Sharma M, Patel K, Caplan S, Carr CM, Grant BD. AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat. Cell Biol* 2009 Dez;11(12):1399-1410.
50. Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa G, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 2002 Aug;297(5584):1193-1196.
51. Itoh T, De Camilli P. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta* 2006 Aug;1761(8):897-912.
52. Yamagishi A, Masuda M, Ohki T, Onishi H, Mochizuki N. A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J. Biol. Chem* 2004 Apr;279(15):14929-14936.
53. Mattila PK, Pykäläinen A, Saarikangas J, Paavilainen VO, Vihinen H, Jokitalo E, Lappalainen P. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P<sub>2</sub>-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J. Cell Biol* 2007

März;176(7):953-964.

54. Frost A, Perera R, Roux A, Spasov K, Destaing O, Egelman EH, De Camilli P, Unger VM. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* 2008 März;132(5):807-817.
55. Wang Q, Kaan HYK, Hooda RN, Goh SL, Sondermann H. Structure and plasticity of Endophilin and Sorting Nexin 9. *Structure* 2008 Okt;16(10):1574-1587.
56. Richardson JS. Schematic drawings of protein structures. *Meth. Enzymol* 1985;115:359-380.
57. Lundmark R, Carlsson SR. SNX9 - a prelude to vesicle release. *J. Cell. Sci* 2009 Jan;122(Pt 1):5-11.
58. Howard L, Nelson KK, Maciewicz RA, Blobel CP. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J. Biol. Chem* 1999 Okt;274(44):31693-31699.
59. Soulet F, Yarar D, Leonard M, Schmid SL. SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 2005 Apr;16(4):2058-2067.
60. Yarar D, Surka MC, Leonard MC, Schmid SL. SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains. *Traffic* 2008 Jan;9(1):133-146.
61. Rangarajan ES, Park H, Fortin E, Sygusch J, Izard T. Mechanism of aldolase control of sorting nexin 9 function in endocytosis. *J. Biol. Chem* 2010 Apr;285(16):11983-11990.
62. Lundmark R, Carlsson SR. Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *J. Biol. Chem* 2004 Okt;279(41):42694-42702.
63. Badour K, McGavin MKH, Zhang J, Freeman S, Vieira C, Filipp D, Julius M, Mills GB, Siminovitch KA. 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* 2007 Jan;104(5):1593-1598.
64. MaCaulay SL, Stoichevska V, Grusovin J, Gough KH, Castelli LA, Ward CW. Insulin stimulates movement of sorting nexin 9 between cellular compartments: a putative role mediating cell surface receptor expression and insulin action. *Biochem. J* 2003 Nov;376(Pt 1):123-134.
65. Ayscough KR. Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. *Curr. Biol* 2000 Dez;10(24):1587-1590.
66. Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 2005

Dez;1746(3):349-363.

67. Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2006 Juni;7(6):404-414.
68. Smythe E, Ayscough KR. Actin regulation in endocytosis. *J. Cell. Sci* 2006 Nov;119(Pt 22):4589-4598.
69. Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell* 2005 Dez;9(6):791-804.
70. Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol* 1998 Dez;8(25):1347-1356.
71. Shin N, Ahn N, Chang-Ileto B, Park J, Takei K, Ahn S, Kim S, Di Paolo G, Chang S. SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2. *J. Cell. Sci* 2008 Apr;121(Pt 8):1252-1263.
72. Lundmark R, Carlsson SR. Expression and properties of sorting nexin 9 in dynamin-mediated endocytosis. *Meth. Enzymol* 2005;404:545-556.
73. Lin Q, Lo CG, Cerione RA, Yang W. The Cdc42 target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J. Biol. Chem* 2002 März;277(12):10134-10138.
74. Childress C, Lin Q, Yang W. Dimerization is required for SH3PX1 tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor signalling and interaction with ACK2. *Biochem. J* 2006 März;394(Pt 3):693-698.
75. Schulze WX, Mann M. A novel proteomic screen for peptide-protein interactions. *J. Biol. Chem* 2004 März;279(11):10756-10764.
76. Thornhill PB, Cohn JB, Drury G, Stanford WL, Bernstein A, Desbarats J. A proteomic screen reveals novel Fas ligand interacting proteins within nervous system Schwann cells. *FEBS Lett* 2007 Sep;581(23):4455-4462.
77. Park J, Kim Y, Lee S, Park JJ, Park ZY, Sun W, Kim H, Chang S. SNX18 shares a redundant role with SNX9 and modulates endocytic trafficking at the plasma membrane. *J. Cell. Sci* 2010 Mai;123(Pt 10):1742-1750.
78. Edeling MA, Smith C, Owen D. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2006 Jan;7(1):32-44.
79. Crump CM, Xiang Y, Thomas L, Gu F, Austin C, Tooze SA, Thomas G. PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J* 2001 Mai;20(9):2191-2201.
80. Schöbel S, Neumann S, Seed B, Lichtenthaler SF. Expression cloning screen



- for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int. J. Dev. Neurosci* 2006 Mai;24(2-3):141-148.
81. Zhang J, Zhang X, Guo Y, Xu L, Pei D. Sorting nexin 33 induces mammalian cell micronucleated phenotype and actin polymerization by interacting with Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J. Biol. Chem* 2009 Aug;284(32):21659-21669.
82. Heiseke A, Schöbel S, Lichtenthaler SF, Vorberg I, Groschup MH, Kretzschmar H, Schätzl HM, Nunziante M. The novel sorting nexin SNX33 interferes with cellular PrP formation by modulation of PrP shedding. *Traffic* 2008 Juli;9(7):1116-1129.
83. Kärkkäinen S, Hiipakka M, Wang J, Kleino I, Vähä-Jaakkola M, Renkema GH, Liss M, Wagner R, Saksela K. Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO Rep* 2006 Feb;7(2):186-191.
84. Kleino I, Ortiz RM, Yritys M, Huovila AJ, Saksela K. Alternative splicing of ADAM15 regulates its interactions with cellular SH3 proteins. *J. Cell. Biochem* 2009 Nov;108(4):877-885.
85. Ren G, Vajjhala P, Lee JS, Winsor B, Munn AL. The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 2006 März;70(1):37-120.
86. Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, De Pooter T, De Deyn PP, Sleegers K, Van Broeckhoven C. DNMBP is genetically associated with Alzheimer dementia in the Belgian population. *Neurobiol. Aging* 2009 Dez;30(12):2000-2009.
87. Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y. Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet* 2006 Juli;15(13):2170-2182.
88. Morgan AR, Hollingworth P, Abraham R, Lovestone S, Brayne C, Rubinsztein DC, Lynch A, Lawlor B, Gill M, O'Donovan MC, Owen MJ, Williams J. Association analysis of dynamin-binding protein (DNMBP) on chromosome 10q with late onset Alzheimer's disease in a large caucasian UK sample. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet* 2009 Jan;150B(1):61-64.
89. Martin S, Kardorf J, Schulte B, Lampeter EF, Gries FA, Melchers I, Wagner R, Bertrams J, Roep BO, Pfützner A. Autoantibodies to the islet antigen ICA69 occur in IDDM and in rheumatoid arthritis. *Diabetologia* 1995 März;38(3):351-355.
90. Winer S, Astsaturon I, Gaedigk R, Hammond-McKibben D, Pilon M, Song A, Kubiak V, Karges W, Arpaia E, McKerlie C, Zucker P, Singh B, Dosch H. ICA69(null) nonobese diabetic mice develop diabetes, but resist disease acceleration by cyclophosphamide. *J. Immunol* 2002 Jan;168(1):475-482.
91. Small SA, Kent K, Pierce A, Leung C, Kang MS, Okada H, Honig L, Vonsattel J,

- Kim T. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol* 2005 Dez;58(6):909-919.
92. Muhammad A, Flores I, Zhang H, Yu R, Staniszewski A, Planel E, Herman M, Ho L, Kreber R, Honig LS, Ganetzky B, Duff K, Arancio O, Small SA. Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and Abeta accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008 Mai;105(20):7327-7332.
93. Kristensen O, Guenat S, Dar I, Allaman-Pillet N, Abderrahmani A, Ferdaoussi M, Roduit R, Maurer F, Beckmann JS, Kastrup JS, Gajhede M, Bonny C. A unique set of SH3-SH3 interactions controls IB1 homodimerization. *EMBO J* 2006 Feb;25(4):785-797.
94. Levinson NM, Visperas PR, Kuriyan J. The tyrosine kinase Csk dimerizes through its SH3 domain. *PLoS ONE* 2009;4(11):e7683.
95. Wigge P, Köhler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP, McMahon HT. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 1997 Okt;8(10):2003-2015.
96. Haft CR, de la Luz Sierra M, Barr VA, Haft DH, Taylor SI. Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol. Cell. Biol* 1998 Dez;18(12):7278-7287.
97. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug;227(5259):680-685.
98. Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem* 1991 Dez;199(2):223-231.
99. Okamoto PM, Herskovits JS, Vallee RB. Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis. *J. Biol. Chem* 1997 Apr;272(17):11629-11635.
100. Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2010 Apr;11(4):237-251.
101. Gad H, Ringstad N, Löw P, Kjaerulff O, Gustafsson J, Wenk M, Di Paolo G, Nemoto Y, Crun J, Ellisman MH, De Camilli P, Shupliakov O, Brodin L. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* 2000 Aug;27(2):301-312.
102. Nahm D, Tkaczyk C, Fukuishi N, Colucci-Guyon E, Gilfillan AM, Metcalfe DD. Identification of Fyn-binding proteins in MC/9 mast cells using mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2003 Okt;310(1):202-208.
103. Yeow-Fong L, Lim L, Manser E. SNX9 as an adaptor for linking synaptojanin-1 to the Cdc42 effector ACK1. *FEBS Lett* 2005 Sep;579(22):5040-5048.

104. Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 1991 Mai;252(5009):1162-1164.
105. Leprince C, Le Scolan E, Meunier B, Fraissier V, Brandon N, De Gunzburg J, Camonis J. Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J. Cell. Sci* 2003 Mai;116(Pt 10):1937-1948.
106. Pylypenko O, Ignatev A, Lundmark R, Rasmuson E, Carlsson SR, Rak A. A combinatorial approach to crystallization of PX-BAR unit of the human Sorting Nexin 9. *J. Struct. Biol* 2008 Mai;162(2):356-360.
107. Forster MJ. Molecular modelling in structural biology. *Micron* 2002;33(4):365-384.
108. Gruber J, Zawaira A, Saunders R, Barrett CP, Noble MEM. Computational analyses of the surface properties of protein-protein interfaces. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* 2007 Jan;63(Pt 1):50-57.
109. Venselaar H, Joosten RP, Vroiling B, Baakman CAB, Hekkelman ML, Krieger E, Vriend G. Homology modelling and spectroscopy, a never-ending love story. *Eur. Biophys. J* 2010 März;39(4):551-563.
110. Ginalski K. Comparative modeling for protein structure prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol* 2006 Apr;16(2):172-177.
111. Baker D, Sali A. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 2001 Okt;294(5540):93-96.
112. Shin N, Lee S, Ahn N, Kim S, Ahn S, YongPark Z, Chang S. Sorting nexin 9 interacts with dynamin 1 and N-WASP and coordinates synaptic vesicle endocytosis. *J. Biol. Chem* 2007 Sep;282(39):28939-28950.
113. Ayton GS, Lyman E, Krishna V, Swenson RD, Mim C, Unger VM, Voth GA. New insights into BAR domain-induced membrane remodeling. *Biophys. J* 2009 Sep;97(6):1616-1625.
114. Bu W, Lim KB, Yu YH, Chou AM, Sudhakaran T, Ahmed S. Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis. *PLoS ONE* 2010;5(8):e12153.
115. Yoon Y, Tong J, Lee PJ, Albanese A, Bhardwaj N, Källberg M, Digman MA, Lu H, Gratton E, Shin Y, Cho W. Molecular basis of the potent membrane-remodeling activity of the epsin 1 N-terminal homology domain. *J. Biol. Chem* 2010 Jan;285(1):531-540.
116. Wu M, Huang B, Graham M, Raimondi A, Heuser JE, Zhuang X, De Camilli P. Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system. *Nat. Cell Biol* 2010 Sep;12(9):902-908.

117. Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J. Cell. Sci* 2004 Jan;117(Pt 2):131-132.
118. Mackay HJ, Twelves CJ. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat. Rev. Cancer* 2007 Juli;7(7):554-562.
119. Carlton JG, Bujny MV, Peter BJ, Oorschot VMJ, Rutherford A, Arkell RS, Klumperman J, McMahon HT, Cullen PJ. Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. *J. Cell. Sci* 2005 Okt;118(Pt 19):4527-4539.
120. Griffin CT, Trejo J, Magnuson T. Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2005 Okt;102(42):15173-15177.
121. Prosser DC, Tran D, Schooley A, Wendland B, Ngsee JK. A Novel, Retromer-Independent Role for Sorting Nexins 1 and 2 in RhoG-Dependent Membrane Remodeling [Internet]. *Traffic* 2010 Aug;[zitiert 2010 Nov 4 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20604901>
122. Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol. Cell. Biol* 2007 Feb;27(3):1112-1124.
123. Durieux A, Prudhon B, Guicheney P, Bitoun M. Dynamin 2 and human diseases. *J. Mol. Med* 2010 Apr;88(4):339-350.
124. Mettlen M, Pucadyil T, Ramachandran R, Schmid SL. Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans* 2009 Okt;37(Pt 5):1022-1026.
125. Hill E, van Der Kaay J, Downes CP, Smythe E. The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J. Cell Biol* 2001 Jan;152(2):309-323.
126. Liu Y, Bankaitis VA. Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog. Lipid Res* 2010 Juli;49(3):201-217.
127. Rusk N, Le PU, Mariggio S, Guay G, Lurisci C, Nabi IR, Corda D, Symons M. Synaptojanin 2 Functions at an Early Step of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Current Biology* 2003 Apr;13(8):659-663.
128. Song W, Zinsmaier KE. Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 2003 Nov;40(4):665-667.
129. Simpson F, Hussain NK, Qualmann B, Kelly RB, Kay BK, McPherson PS, Schmid SL. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat. Cell Biol* 1999 Juni;1(2):119-124.

- 
130. Higashi T, Ikeda T, Murakami T, Shirakawa R, Kawato M, Okawa K, Furuse M, Kimura T, Kita T, Horiuchi H. Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of diaphanous-related formins (DRFs) Daam1 and mDia1 in cooperation with active Rho GTPase. *J. Biol. Chem* 2010 Mai;285(21):16231-16238.
131. Schoebel S. Analyse eines neuen Sorting Nexins und seiner Funktion in der  $\beta$ APP-Prozessierung [Internet]. 2007;[zitiert 2010 Nov 8 ] Available from: <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/7506/>
132. Gold ES, Underhill DM, Morrissette NS, Guo J, McNiven MA, Aderem A. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med* 1999 Dez;190(12):1849-1856.
133. Loerke D, Mettlen M, Yarar D, Jaqaman K, Jaqaman H, Danuser G, Schmid SL. Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol* 2009 März;7(3):e57.
134. Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol* 1998 Apr;141(1):85-99.
135. Cao H, Chen J, Awoniyi M, Henley JR, McNiven MA. Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells. *J. Cell. Sci* 2007 Dez;120(Pt 23):4167-4177.
136. Maier O, Knoblich M, Westermann P. Dynamin II binds to the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1996 Juni;223(2):229-233.
137. Pollard TD. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol* 2010 Feb;22(1):50-56.
138. Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 2009 Nov;326(5957):1208-1212.
139. Kunda P, Baum B. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol* 2009 Apr;19(4):174-179.

## 10. Lebenslauf

---

## 11. Schriftenverzeichnis

**Bastian Dislich**, Manuel E Than and Stefan F Lichtenthaler

*Specific amino acids in the BAR domain allow homodimerization and prevent heterodimerization of sorting nexin 33. **Biochem. J.** (2010) 433(1):75 - 83*

Peer-Hendrik Kuhn, Huanhuan Wang, **Bastian Dislich**, Alessio Colombo, Ulrike Zeitschel, Joachim W Ellwart, Elisabeth Kremmer, Steffen Roßner and Stefan F Lichtenthaler

*ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive  $\alpha$ -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. **The EMBO Journal** (2010) 29:3020 - 3032*

Susanne Schöbel, Stefanie Neumann, Maren Hertweck, **Bastian Dislich**, Peer-Hendrik Kuhn, Elisabeth Kremmer, Brian Seed, Ralph Baumeister, Christian Haass,, Stefan F Lichtenthaler

*A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. **J. Biol. Chem** (2008) 283:14257-14268*

---

## 12. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Stefan Lichtenthaler für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen. Insbesondere möchte ich mich für die stetige und konsequente Unterstützung sowohl im Rahmen dieser Dissertation als auch darüber hinaus bedanken. Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass danke ich für die Möglichkeit innerhalb seines Lehrstuhls diese Dissertation durchzuführen. Herrn Prof. Dr. Heesemann und seinen Mitarbeitern danke ich für die Organisation des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin und die finanzielle Unterstützung.

Außerdem möchte ich bei meinen Kollegen und Kommilitonen bedanken, ohne deren Hilfe ich den Spagat zwischen Forschung und Medizinstudium nicht hätte bewältigen können. Ein besonderer Dank gilt: Martina Maurer, Veronika Sophie Lange, Ruth Eichner, Katrin Moschke, Peer-Hendrik Kuhn, Stefan Mitterreiter, Sylvia Fischer, Susanne Schöbel, Stefanie Neumann und Anna Münch.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und die begleitende Promotion nicht möglich gewesen wären.



## **13. Publikationen**

## Specific amino acids in the BAR domain allow homodimerization and prevent heterodimerization of sorting nexin 33

Bastian DISLICH\*†, Manuel E. THAN‡ and Stefan F. LICHTENTHALER\*†<sup>1</sup>

\*DZNE – German Center for Neurodegenerative Diseases, Munich, 80336 Munich, Germany, †Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany, and ‡Protein Crystallography Group, Leibniz Institute for Age Research – Fritz Lipmann Institute (FLI), 07745 Jena, Germany

SNX33 (sorting nexin 33) is a homologue of the endocytic protein SNX9 and has been implicated in actin polymerization and the endocytosis of the amyloid precursor protein. SNX33 belongs to the large family of BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) domain-containing proteins, which alter cellular protein trafficking by modulating cellular membranes and the cytoskeleton. Some BAR domains engage in homodimerization, whereas other BAR domains also mediate heterodimerization between different BAR domain-containing proteins. The molecular basis for this difference is not yet understood. Using co-immunoprecipitations we report that SNX33 forms homodimers, but not heterodimers, with other BAR domain-containing proteins, such as SNX9. Domain deletion analysis revealed that the BAR domain, but not the SH3 (Src homology 3) domain, was required for homodimerization of SNX33. Additionally, the BAR domain

prevented the heterodimerization between SNX9 and SNX33, as determined by domain swap experiments. Molecular modelling of the SNX33 BAR domain structure revealed that key amino acids located at the BAR domain dimer interface of the SNX9 homodimer are not conserved in SNX33. Replacing these amino acids in SNX9 with the corresponding amino acids of SNX33 allowed the mutant SNX9 to heterodimerize with SNX33. Taken together, the present study identifies critical amino acids within the BAR domains of SNX9 and SNX33 as determinants for the specificity of BAR domain-mediated interactions and suggests that SNX9 and SNX33 have distinct molecular functions.

**Key words:** Alzheimer's disease, BAR domain, endocytosis, molecular modelling, protein dimerization, sorting nexin.

### INTRODUCTION

BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) domain-containing proteins have been implicated in a variety of cellular functions, such as endocytosis, protein trafficking, cell polarity, regulation of the actin cytoskeleton, signal transduction, tumour suppression, learning and memory [1–3]. The BAR domain is 250–280 amino acids long and was named after the founding members of this family, Bin1, amphiphysin 1 and Rvs167. Most BAR domains consist of a three-helix bundle, which can dimerize and form a crescent-shaped structure. The positively charged concave surface of this dimeric structure senses and induces membrane curvature by binding to curved negatively charged membranes [3,4].

The BAR domain protein family includes several members of the SNX (sorting nexin) family, SNX1 and SNX2, SNX4–SNX9, SNX18, SNX30, SNX32 and SNX33 [5]. SNXs are a family of 33 cytosolic and membrane-associated proteins characterized by the presence of a SNX-type PX (Phox homology) domain, which is a subgroup of the phosphoinositide-binding PX domain superfamily [5–7]. In addition to the PX domain, SNXs may contain additional lipid or protein interaction domains. Few SNXs have been functionally studied, but are generally assumed to be involved in endosomal trafficking [7]. SNX9 (also known as SH3PX1), SNX18 and SNX33 form the SNX9-subfamily of SNXs and share the same domain structure. An N-terminal SH3 (Src homology 3) domain is followed by a variable linker region, the PX domain and the C-terminal BAR domain (Figure 1a). Among the three proteins, SNX9 has been best studied. It is involved in endocytosis and actin assembly and appears to couple actin dynamics to membrane remodelling during the endocytic

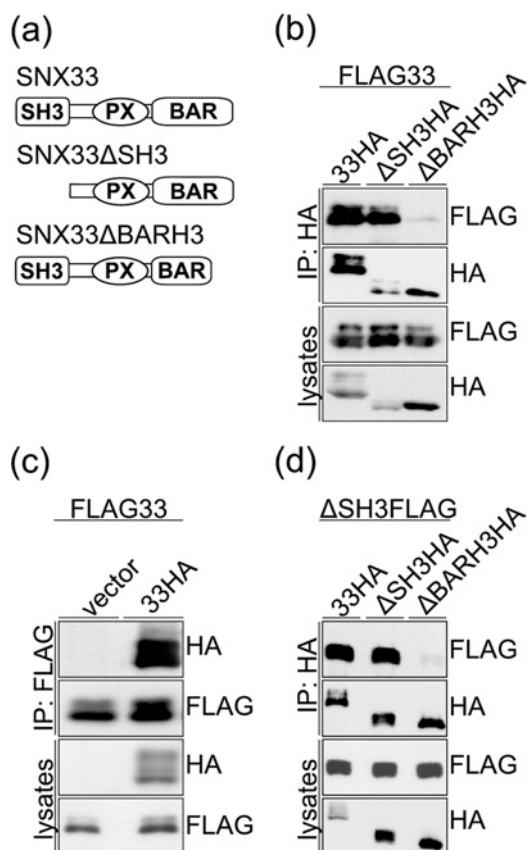
process [8,9]. Through its N-terminal SH3 domain it binds to several different cellular proteins, such as the endocytic GTPase dynamin and WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) [8–11].

The function of SNX18, and SNX33 is less well understood than that of SNX9. SNX18 appears to have a similar trafficking function as SNX9 and also binds dynamin [12]. SNX33 has been implicated in the endocytosis and processing of the amyloid precursor protein and the prion protein [13,14] as well as in actin polymerization [15]. In agreement with these findings, SNX33 binds through its SH3 domain to dynamin and WASP [12,14,15]. Additionally, SNX33 binds the metalloprotease ADAM15 (a disintegrin and metalloproteinase 15), but the physiological function of this interaction remains to be established [16,17]. SNX33 also appears to form homodimers [15], but it remains unknown whether this occurs through the SH3 domain, the BAR domain or both. Both domains can mediate protein homodimerization. Although the SH3 domain is well known to bind to proline-rich regions in target proteins and thereby link distinct proteins, it can also form homodimers, for example in the proteins IB1 and IB2 (also known as JIP1 and JIP2) and the tyrosine kinase Csk (C-terminal Src kinase) [18,19]. Additionally, BAR domains form dimers [4,20] and can mediate the homodimerization of the corresponding full-length proteins, such as amphiphysin 1 and SNX9 [21,22].

BAR domains are not only able to form homodimers, but in some cases also heterodimers between distinct BAR domain-containing proteins. This has been described for the close homologues SNX1 and SNX2 or amphiphysin 1 and amphiphysin 2 [23,24]. Heterodimerization has also been observed between more distant BAR domain family members, such as SNX4

Abbreviations used: ADAM15, a disintegrin and metalloproteinase 15; BAR, Bin/amphiphysin/Rvs; Csk, C-terminal Src kinase; HA, haemagglutinin; HEK-293, human embryonic kidney 293; PX, Phox homology; SH3, Src homology 3; SNX, sorting nexin; WASP, Wiskott–Aldrich syndrome protein.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email stefan.lichtenthaler@med.uni-muenchen.de).



**Figure 1 Homodimerization of SNX33 requires its BAR domain**

(a) Schematic domain structure of SNX33 and deletion mutants. (b) HEK-293 cells stably expressing FLAG-SNX33 (FLAG33) were transiently transfected with HA-tagged full-length SNX33 (33HA), or truncated SNX33 variants lacking the N-terminal SH3 domain ( $\Delta$ SH3HA) or the C-terminal helix of the BAR domain ( $\Delta$ BARH3HA). Aliquots of the cell lysates (lower two panels) show that  $\Delta$ SH3HA is expressed at slightly lower levels than full-length SNX33 and  $\Delta$ BARH3HA. HA-tagged proteins were immunoprecipitated (IP) and detected by anti-HA antibody (second top panel) or stained for co-immunoprecipitated FLAG-SNX33 (uppermost panel). 33HA and  $\Delta$ SH3HA co-immunoprecipitate FLAG-SNX33. (c) HEK-293/FLAG-SNX33 cells (FLAG33) were transiently transfected with control vector or SNX33-HA. FLAG-SNX33 was immunoprecipitated (IP) and tested for co-immunoprecipitated SNX33-HA (uppermost panel). (d) HEK-293 cells stably expressing SNX33 lacking its SH3 domain ( $\Delta$ SH3FLAG) were transiently transfected with constructs as in (c). Co-immunoprecipitation with  $\Delta$ SH3FLAG was observed for full-length SNX33 (33HA) and  $\Delta$ SH3HA, but not for  $\Delta$ BARH3HA. (b-d) Representative Western blots of three independent experiments.

and amphiphysin 2 [25]. Heterodimerization may increase the functional versatility of the corresponding proteins, as the heterodimers may have different functions or subcellular localizations than the homodimers. However, the molecular mechanisms, which determine whether a BAR domain is able to form heterodimers, remain unknown. In order to address this question we studied SNX33. Previously, conflicting results have been reported for a potential heterodimerization of SNX33 with its homologue SNX9. One study did not find evidence for SNX9-SNX33 heterodimers in HeLa cells expressing the endogenous proteins [12]. This contrasts with another study reporting that transiently overexpressed SNX9 and SNX33 do form heterodimers in HEK-293 (human embryonic kidney 293) cells [15]. In the present study, using molecular modelling and mutational analysis we show that critical amino acids within the BAR domain of SNX33 determine the specificity of the interaction with other BAR domains. We find that the BAR domain allows SNX33 homodimer formation, but prevents heterodimerization

with the BAR domains of the SNX33 homologues SNX9 and SNX18, and the more distant homologue SNX1.

## EXPERIMENTAL

### Reagents and antibodies

The following antibodies were used: anti-HA (haemagglutinin) HA.11 (Covance), anti-FLAG FLAGM2 (Sigma), HRP (horseradish peroxidase)-coupled goat anti-mouse and anti-rabbit (Promega), and Alexa Fluor<sup>®</sup> 555-coupled anti-mouse (Molecular Probes).

### Plasmid construction

SNX33 and SNX9 cDNAs have been described previously [14]. SNX1 and SNX18 cDNAs were obtained from A.T.C.C. cDNAs without UTRs (untranslated regions) and with C- or N-terminal fusions to HA- or FLAG-tag and/or lacking the SH3 and LC domains (PX-BAR) or part of the BAR domain ( $\Delta$ BARH3) were generated by PCR and cloned into the vector pEAK12 (SH3 region corresponding to amino acids 1-60 in SNX33, PX-BAR region corresponding to amino acids 159-574 in SNX33 and 185-595 in SNX9, the last helix of the BAR domain corresponding to amino acids 510-574 in SNX33 and 531-595 in SNX9). In order to generate SNX33BAR9HA and SNX9BAR33HA, an EcoRV site was introduced before the start of the BAR domain in SNX33 (L371I) and SNX9 (L392I) by PCR. The obtained constructs (SNX33L371IHA and SNX9L392IHA) were subsequently used to swap the BAR domains by EcoRV digestion and cloning into the vector pEAK12. 9mod-HA was generated by PCR in multiple rounds and the resulting fragments were cloned into the vector pEAK12 via triple ligation (see Table 1 for individual mutations). The identity of all constructs obtained by PCR was confirmed by DNA sequencing.

### Cell culture, Western blot analysis and immunoprecipitation

HEK-293 [EBNA (Epstein-Barr virus nuclear antigen)] and HeLa cells were cultured as described previously [26]. HEK-293 cells stably expressing FLAG-SNX33 were generated using plasmids pEAK12-FLAGSNX33 using 0.5  $\mu$ g/ml puromycin (Sigma). Transfections were performed using Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 (Invitrogen). At 1 day after transfection, cell lysates (in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 1% Nonidet P40) were collected and analysed as described previously [27-29]. Phosphatase inhibitors [50 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub> and phosphatase inhibitor (1:100; Sigma)] were added to cell lysates. The protein concentration in the cell lysate was measured and corresponding aliquots of lysate was separated by SDS/PAGE. For SNX33/SNX9 co-immunoprecipitation, lysates were incubated with 5  $\mu$ g of antibody (HA.11, 1:100) for 2 h (4 °C) using Protein G dynabeads (Dyna). After washing with STEN-NaCl [STEN buffer (0.05 M Tris/HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA and 0.2% Nonidet P40) plus 0.35 M NaCl] and twice with STEN, bound proteins were resolved by SDS/PAGE. Western blots were quantified using the luminescent image analyser LAS-4000 (Fujifilm).

### Immunofluorescence

HeLa cells were plated on poly-L-lysine-coated glass coverslips and transfected 24 h later with SNX33 and SNX9 deletion constructs. Medium was changed 5 h after transfection. At 16 h after the medium change, cells were washed in PBS, fixed

for 20 min in 4% paraformaldehyde/sucrose, quenched for 2 min with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and washed with PBS. Cells were permeabilized with 0.1% saponin in 8 mM Pipes, 0.5 mM EGTA, 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 2% BSA. Then cells were stained with HA.11 (1:1000), Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Phalloidin (6.6  $\mu\text{M}$ , Invitrogen), washed with 0.05% saponin in PBS and incubated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 555-conjugated secondary antibody (1:500). Cells were then washed in 0.05% saponin in PBS and water and fixed with Moviol. Fluorescence was imaged using a Zeiss LSM 510 Meta inverted confocal microscope, equipped with Zeiss LSM software and a Plan Apochromat 100 $\times$  lens. Expression levels of individual cells were monitored using the imaging processing software Fiji (<http://pacific.mpi-cbg.de>).

### Molecular modelling

The atomic structure of SNX9 dimers was analysed with the PROTORP server [30] and molecular graphics [31] using its published crystal structure (PDB code 2RAI) [20]. Amino acid differences to SNX33 and SNX18 and their effect on the formation of potential heterodimers were evaluated manually, thereby identifying key residues of the interface for mutational analysis. Figures were created using PyMOL (DeLano Scientific; <http://www.pymol.org>). The analysis of the potential SNX18–SNX33 heterodimer relies solely on the assumption that amino acid residues pairing in a sequence alignment between SNX18 or SNX33 with interface residues of SNX9 do also form the interface in SNX18 and SNX33.

## RESULTS

### Homodimerization and membrane tubulation requires the SNX33 BAR domain

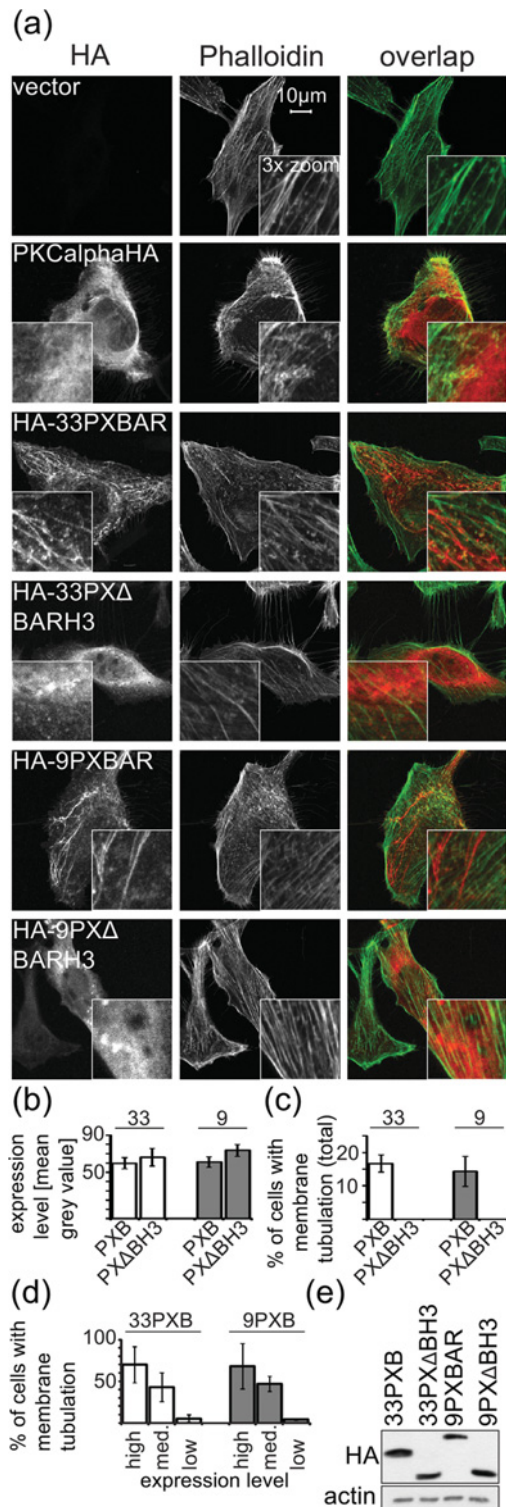
First, we tested whether SNX33 is able to form homodimers. To this aim, HEK-293 cells stably expressing FLAG-tagged SNX33 were used. They were transiently transfected with SNX33–HA. SNX33 was present as a doublet band in the immunoblot at approx. 75 kDa (Figure 1b), which represents the phosphorylated (upper band) and non-phosphorylated (lower band) form of SNX33, as we demonstrated previously [14]. Immunoprecipitation of SNX33–HA from the cell lysate co-precipitated FLAG–SNX33 (Figure 1b). The immunoprecipitation was also possible in the opposite way; immunoprecipitation of FLAG–SNX33 co-precipitated SNX33–HA (Figure 1c). This demonstrates that SNX33 is able to homodimerize. Next, we analysed whether the homodimerization of SNX33 is mediated by the SH3 domain, by the BAR domain or by both. Some cytosolic proteins, such as IB1 and Csk dimerize through their SH3 domains [18,19]. Other proteins, such as several BAR domain-containing proteins, homodimerize through their BAR domains [21,22]. To test the involvement of the SH3 and the BAR domains, two SNX33 mutants were used and tagged with an HA epitope tag. One mutant lacked the N-terminal SH3 domain ( $\Delta\text{SH3}$ ). A second mutant lacked the third helix at the C-terminus of the BAR domain ( $\Delta\text{BARH3}$ ) (Figure 1a). This truncation may induce a misfolding and consequently a loss of function of the BAR domain, as shown previously for SNX9 [22]. A loss of function was indeed found in a membrane tubulation assay for the  $\Delta\text{BARH3}$  mutant (see below in Figure 2). Similar to full-length SNX33, the mutant lacking the SH3 domain ( $\Delta\text{SH3}$ ) co-immunoprecipitated FLAG–SNX33, whereas  $\Delta\text{BARH3}$  did not, although it was expressed at similar levels as SNX33 and  $\Delta\text{SH3}$  (Figure 1b). This experiment demonstrates that the homodimerization of SNX33 requires the

intact BAR domain, but not the SH3 domain, of SNX33. This was confirmed in a second experimental setting. HEK-293 cells were used, which stably express SNX33 lacking the SH3 domain ( $\Delta\text{SH3}$ –FLAG). As in the experiment with the full-length FLAG–SNX33 (Figure 1b), SNX33 or the two deletion mutants  $\Delta\text{SH3}$  and  $\Delta\text{BARH3}$  were transiently transfected and tested for co-immunoprecipitation with the stably expressed  $\Delta\text{SH3}$ –FLAG. Again, co-immunoprecipitation was only observed for the full-length SNX33 and  $\Delta\text{SH3}$ , but not for the mutant with the truncated BAR domain (Figure 1d). Taken together, these experiments demonstrate that the homodimerization of SNX33 requires the intact BAR domain, but not the SH3 domain.

Dimerization of BAR domains generates the crescent-shaped structure, which is required for the membrane-binding and -tubulating activity of BAR domains [4]. Having found that the  $\Delta\text{BARH3}$  deletion mutant of SNX33 was not able to dimerize, we next tested whether it had also lost its membrane-tubulating activity. The intact BAR domains of SNX33 and SNX9 induced membrane tubulation in approx. 15% of HeLa cells when they were expressed together with their PX domains (SNX33 PX–BAR and SNX9 PX–BAR) (Figures 2a–2c), in agreement with previous reports [12,32]. The observed membrane-tubulating activity correlated with the expression level of the PX–BAR domain (Figure 2d). However, as expected, the deletion of the C-terminal helix ( $\Delta\text{BARH3}$ ) of SNX33 or SNX9 completely abolished the membrane-tubulating activity (Figures 2a–2c), demonstrating that the truncation of the BAR domain results in a loss of its membrane-tubulating activity in addition to the loss of its homodimerization capability (Figure 1b).

### SNX33 does not form heterodimers

Next, we analysed whether SNX33 is able to form heterodimers with other BAR domain-containing proteins, in particular with its homologues SNX9 and SNX18, but also with the more distantly related SNX1. As a positive control, SNX33 was used. All four proteins were transiently expressed as HA-tagged proteins in HEK-293/FLAG–SNX33 cells and probed for co-immunoprecipitation with FLAG–SNX33. In contrast with SNX33, neither SNX1, nor SNX9 or SNX18 co-immunoprecipitated significant amounts of FLAG–SNX33, although all four proteins were expressed at similar levels (Figure 3a). This clearly demonstrates that SNX33 does not form heterodimers with its homologues SNX9 and SNX18 or with SNX1. The only condition where we observed heterodimer formation between SNX33 and SNX9 was upon strong transient overexpression of both proteins (Figure 3b). However, this interaction was much less than the co-immunoprecipitation observed for SNX33 (Figure 3b). We conclude that under conditions where SNX9 and SNX33 are only mildly overexpressed, there is no heterodimerization of both proteins, similar to what has been reported for both proteins expressed at endogenous levels [12]. What prevents the heterodimerization between SNX33 and the other proteins? In view of the finding that the BAR domain is required for the homodimerization of SNX33, we speculated that the BAR domain of SNX33 may also determine the specificity of interactions with other BAR domains. To test this possibility, we made domain swap experiments in which the BAR domains of SNX9 and SNX33 were exchanged (Figures 3c and 3d). Both proteins were expressed with an HA-epitope tag. In contrast with wild-type SNX33, an SNX33 mutant carrying the SNX9 BAR domain (33BAR9) had lost the ability to co-immunoprecipitate wild-type FLAG–SNX33, similar to the SNX33 mutant with a truncated BAR domain ( $\Delta\text{BARH3}$ ) (Figure 3d). Conversely, the SNX9



**Figure 2** Membrane-tubulating activity of SNX33 requires the intact BAR domain

(a) Constructs encoding the HA-tagged PX and BAR domains of SNX33 and SNX9 were expressed in HeLa cells (33PXBAR, 9PXBAR). As a control, an unrelated cytosolic protein (HA-tagged protein kinase C $\alpha$ ; PKC $\alpha$ HA) as well as the empty vector were expressed. Cells were co-stained with phalloidin in order to visualize the actin cytoskeleton. Immunofluorescence analysis revealed membrane tubule formation, which was abolished when the BAR domains lacked the C-terminal third helix of SNX33 and SNX9 (PX $\Delta$ BARH3). The control protein PKC $\alpha$ HA showed diffuse cytosolic staining and no tubulation, similar to the PX $\Delta$ BARH3 constructs. (b) Expression levels of individual cells were monitored using the imaging processing

mutant carrying the SNX33 BAR domain (9BAR33) was able to interact with FLAG–SNX33. This demonstrates that the BAR domain determines the specificity of the interaction with other BAR domains. The mutant 9BAR33 co-immunoprecipitated less FLAG–SNX33 than the wild-type SNX33, but was also expressed at lower levels than wild-type SNX33 (Figure 3d, lower panel). This indicates that 9BAR33 is likely to be as efficient as wild-type SNX33–HA in forming dimers with FLAG–SNX33. As a control experiment, one more mutant of SNX9 and SNX33 was tested. For the exchange of the BAR domains, an EcoRV restriction site had been introduced into the cDNAs at the position where the BAR domain codons started. This resulted in a single amino acid change for SNX33 (L371I) and for SNX9 (L392I). Both mutants SNX33L371I and SNX9L392I were tested for co-immunoprecipitation with FLAG–SNX33 and showed the same result as the corresponding wild-type proteins (Figure 3d). This demonstrates that the single point mutations did not affect the binding behaviour to SNX33. Taken together, the BAR domain swap experiments for SNX9 and SNX33 demonstrate that the BAR domains control the specificity of the BAR domain dimerizations and prevent the heterodimerization between SNX9 and SNX33.

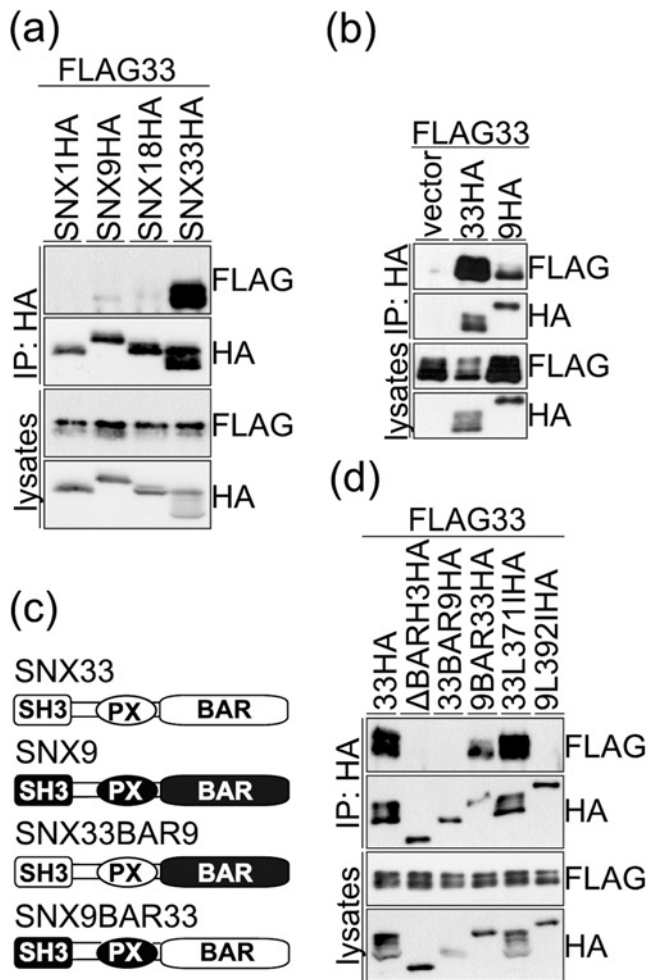
### Mechanism of prevention of heterodimer formation

In order to determine why the BAR domains of SNX9 and SNX33 are not able to heterodimerize, molecular graphics and modelling were used. The known crystal structure of the dimerized SNX9 BAR domain [20] was compared with SNX33, for which a crystal structure is not available. Within their BAR domains SNX9 and SNX33 are 36.3% identical (74 out of 204 amino acids) and share an even larger number of similar amino acid residues, strongly suggesting that the overall fold of the BAR domain of SNX9 is conserved in SNX33. A detailed analysis of the large dimer interface of SNX9 [ $\sim 3000 \text{ \AA}^2$  ( $1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$ ) buried accessible surface area per protomer] using the PROTORG server [30] was carried out. Mapping of the amino acid conservation between SNX9 and SNX33 to the molecular interface (Figures 4a and 4b) revealed that the dimer interface region shows a degree of conservation (23 out of 64 residues, 35.9%) similar to that observed for the whole BAR domain. This lack of a higher degree of conservation at the dimer interface is typical for molecules that evolved independently from one another. Correspondingly, no evolutionary pressure forced the dimer interface to retain the ability for heterodimerization between SNX9 and SNX33. These findings are in excellent agreement with the lack of co-immunoprecipitation between SNX9 and SNX33 (Figure 3a) and indicate that both proteins may have different biological functions.

A deeper analysis of the interface showed that many strong intermolecular salt bridges, hydrophobic interactions and hydrogen-bonding networks are responsible for the formation of tight SNX9 homodimers (Table 1). Out of the 64 residues that line the symmetrical interface in each protomer, 24 each

software Fiji. Only cells exceeding a predetermined signal intensity threshold (i.e. a mean grey value above background) were counted. The numbers above the lines indicate whether the construct derives from SNX9 or SNX33. PXB, PXBAR construct; PX $\Delta$ BH3, PX $\Delta$ BARH3 construct. (c) Cells were scored for the presence or absence of membrane tubule formation. (d) On the basis of the expression level of HA-tagged constructs the cells were divided into high-, medium- and low-expressing cells (based on the signal intensity measured in b). The percentage of cells with observed membrane-tubule formation within each category is shown. (b–d) Means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. (e) Western blot analysis of transfected HeLa cells showing similar expression levels of all four SNX9 and SNX33 constructs (with HA antibody) as well as of actin.





**Figure 3** SNX33 forms homodimers, but not heterodimers

(a) HEK-293 cells stably expressing FLAG-SNX33 (FLAG33) were transiently transfected with HA-tagged constructs encoding SNX1, SNX9, SNX18 or SNX33. Co-immunoprecipitation was analysed as described in Figure 1(b). FLAG-SNX33 co-immunoprecipitated with SNX33, but not with SNX1, SNX9 or SNX18. (b) HEK-293 cells were transiently co-transfected with FLAG-SNX33 and either the empty vector, HA-tagged SNX33 or HA-tagged SNX9. Transient overexpression of both interaction partners leads to artificial co-immunoprecipitation of FLAG-SNX33 with SNX9-HA, which is not observed if only one of the interaction partners is stably expressed at lower levels (compare with a). (c) Domain structure of BAR domain swap constructs. SNX33 domains are shown in white, SNX9 domains are indicated in black. (d) FLAG-SNX33-expressing HEK-293 cells were transiently transfected with HA-tagged constructs encoding full-length SNX33 (33HA), SNX33 lacking the C-terminal helix of its BAR domain ( $\Delta$ BARH3), SNX33 carrying the BAR domain of SNX9 (33BAR9), SNX9 carrying the BAR domain of SNX33 (9BAR33) or SNX33 and SNX9 carrying the indicated leucine-to-isoleucine residue point mutation (33L371I, 9L392I). SNX33 carrying the SNX9 BAR domain (33BAR9) did not co-immunoprecipitate with FLAG-SNX33, whereas 9BAR33 was able to co-immunoprecipitate. (a, b and d) Representative Western blots of three independent experiments. IP, immunoprecipitation.

contribute to more than 2% of the total molecular interface area, making a total of more than 50% of the interface area. Across the interface, 24 hydrogen bonds are formed. A total of eight tight salt bridges link the two protomers further together, including the bifurcated Glu<sup>579</sup>-Arg<sup>586</sup>-Glu<sup>583</sup> charged hydrogen-bonding network (Figure 4d). Many of the amino acids at the dimer interface of SNX9 are not conserved in the SNX33 sequence (Table 1). As a consequence, many of the interactions between the two BAR domains would be disrupted in the case of a heterodimerization between SNX9 and SNX33, providing a

molecular explanation for the observed lack of heterodimerization between both proteins. *In silico* analysis was also carried out for the potential interaction between SNX9 and SNX18 as well as between SNX33 and SNX18 (Supplementary Tables S1 and S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/433/bj4330075add.htm>). In agreement with a previous study [12] and the results from the present study (Figure 3a), a heterodimerization of SNX9-SNX18 and SNX33-SNX18 does not appear possible due to the lack of conserved amino acids at the dimer interface. To test further the validity of the *in silico* analysis, the interaction between rat amphiphysin 1 and amphiphysin 2 was analysed (Supplementary Table S3 at <http://www.BiochemJ.org/bj/433/bj4330075add.htm>). In contrast with the SNXs, both amphiphysins have been shown to heterodimerize through their BAR domains [24]. In agreement with the experimental data, the *in silico* analysis revealed that the residues at the dimer interface are either conserved between both proteins or replaced by structurally tolerated amino acids.

The *in silico* analysis of the BAR domains of SNX9 and SNX33 suggests that it should be possible to induce heterodimerization between a modified SNX9 and SNX33, if relevant amino acids in the BAR domain of SNX9 are replaced by the corresponding amino acids of SNX33. To test this hypothesis, 19 amino acid residues, each making a major contribution to the dimer interface in SNX9, but not being conserved in SNX33, were mutated to their counterparts in SNX33 (see Table 1). Indeed, this SNX9 variant with the modified BAR domain (9mod) was able to co-immunoprecipitate SNX33 (Figure 4e), showing that the chosen amino acids were critical for dimer formation. The observed reduction in interaction strength between FLAG-SNX33 and SNX9mod as compared with either wild-type SNX33 or SNX9 homodimers shows that for an optimal BAR domain dimerization, the many smaller alterations across the BAR domain interface are also necessary. The introduced mutations significantly increase the number of compatible surface patches within the larger interface, but a significant number of 'non-conserved' residues still exist for the SNX33-SNX9mod dimer (Figure 4c).

To clarify further whether a heterodimer between SNX33 and SNX9mod can exist, we estimated the dissociation constant ( $K_d$ ) for the SNX33-SNX9mod heterodimer in comparison with the SNX33 homodimer using a mild overexpression of the interaction partners in HEK-293 cells. First, the  $K_d$  of the SNX33 homodimer was estimated in relation to the SNX9 homodimer, which has a reported  $K_d$  of 7.9  $\mu$ M [33]. The amount of precipitated SNX33-FLAG after immunoprecipitation of SNX33-HA was in the same range, but slightly higher, than the amount of SNX9-FLAG precipitated by SNX9-HA (Figures 5a and 5b). Densitometric quantification revealed  $\sim$ 2.5-fold higher levels of SNX33 dimer compared with SNX9 dimer, leading to an estimated  $K_d$  value of  $\sim$ 3  $\mu$ M for the SNX33 homodimer. In contrast, the estimated  $K_d$  value of the SNX33-SNX9 heterodimer is  $\sim$ 30-fold higher (Figure 5c), based on the  $\sim$ 30-fold lower co-precipitation between SNX9 and SNX33 (Figure 3a). The mutations in SNX9mod increase the co-precipitation efficiency  $\sim$ 6-fold, leading to an estimated  $K_d$  of  $\sim$ 13  $\mu$ M, which is  $\sim$ 1.5-fold higher than the  $K_d$  reported for the SNX9 homodimer [33]. This further supports our experimental finding of SNX33-SNX9mod dimers.

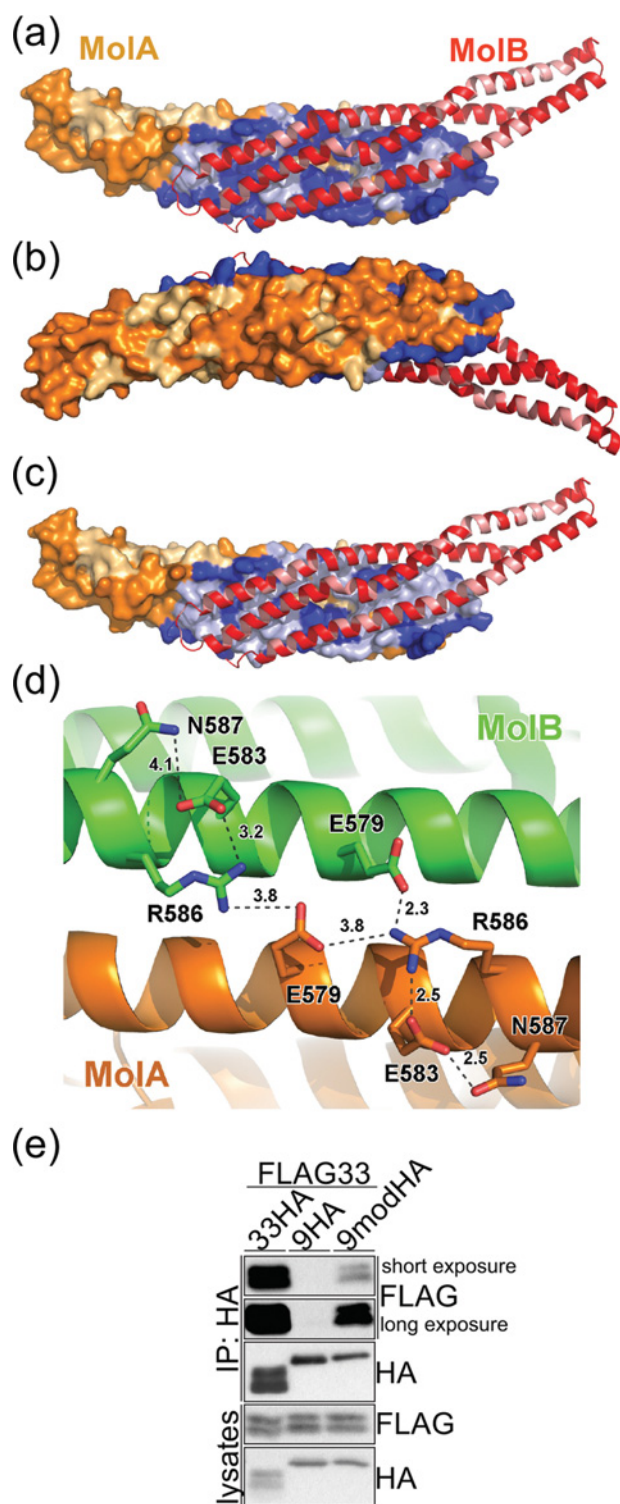
## DISCUSSION

The present study shows that SNX33 forms homodimers but not heterodimers with its closest homologues SNX9 and SNX18. Using mutational analysis as well as molecular modelling we

**Table 1 Stabilization and conservation of the SNX9–SNX33 dimer interface**

Amino acid (SNX9)	Partial interface contact area >2%	Number of hydrogen bonds	Conservation (+) or amino acid in SNX33	Mutated in 9mod	Comment
Phe <sup>405</sup>	+		+	–	
Ala <sup>408</sup>			Lysine	–	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Met <sup>409</sup>			+	–	
Gly <sup>412</sup>			Serine	–	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Val <sup>413</sup>			+	–	
Glu <sup>415</sup>			Glutamine	–	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Leu <sup>416</sup>	+		+	–	
Val <sup>419</sup>	+		+	–	
Gly <sup>420</sup>			Alanine	–	Alanine residue spatially well accommodated
Glu <sup>422</sup>		1	+	–	Salt bridge to Lys <sup>437</sup>
His <sup>423</sup>	+	1	Leucine	Yes	Not compatible with heterodimer
Arg <sup>426</sup>	+	1	Lysine	Yes	Salt bridge to Glu <sup>434</sup> is still possible
Pro <sup>430</sup>			Glycine	–	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Leu <sup>431</sup>			Phenylalanine	Yes	Not compatible with heterodimer, no space for Phe <sup>431</sup>
Glu <sup>434</sup>	+	2	+	–	Salt bridge to Arg <sup>426</sup>
Tyr <sup>435</sup>		2	Phenylalanine	Yes	Strong hydrogen bond to Tyr <sup>578</sup> is lost
Lys <sup>437</sup>		1	+	–	Salt bridge to Glu <sup>422</sup>
Ile <sup>438</sup>	+		Leucine	–	Leucine residue spatially well accommodated
Lys <sup>440</sup>			Serine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Ala <sup>441</sup>	+		+	–	
Leu <sup>442</sup>			Phenylalanine	Yes	Not compatible with heterodimer
Ser <sup>444</sup>			Alanine	–	Alanine residue spatially well accommodated
Leu <sup>445</sup>	+		Isoleucine	Yes	Not compatible with heterodimer
Val <sup>448</sup>	+		Serine	Yes	Not compatible with heterodimers, hydrophobic contact lost
Phe <sup>449</sup>	+		+	–	
Ser <sup>451</sup>			Glutamine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Ser <sup>452</sup>			Methionine	Yes	Not compatible with heterodimer - no space for Met <sup>452</sup>
Tyr <sup>454</sup>	+	1	Proline	Yes	Not compatible with heterodimers - proline residue is too small
Glu <sup>455</sup>			Phenylalanine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Gln <sup>456</sup>			Cysteine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Glu <sup>457</sup>		1	Serine	Yes	Salt bridge to Arg <sup>559</sup> is lost
Leu <sup>460</sup>	+		+	–	
Ile <sup>464</sup>			+	–	
Ala <sup>467</sup>			Threonine	Yes	Not compatible with heterodimer - no space for Thr <sup>467</sup>
Tyr <sup>471</sup>		1	+	–	
Leu <sup>486</sup>			+	–	
Leu <sup>489</sup>			Methionine	Yes	Not compatible with heterodimer - no space for Met <sup>489</sup>
Asn <sup>553</sup>		1	+	–	
His <sup>556</sup>			+	–	
Ser <sup>557</sup>			+	–	
Arg <sup>559</sup>		1	+	–	Salt bridge to Glu <sup>547</sup>
Ile <sup>560</sup>	+		Glutamine	Yes	Not compatible with heterodimer - opposite charge
Tyr <sup>561</sup>			Leucine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Tyr <sup>563</sup>			Phenylalanine	–	Phenylalanine residue spatially well accommodated
Asn <sup>564</sup>	+	1	Lysine	Yes	Not compatible with heterodimer - no space for Lys <sup>564</sup>
Ile <sup>567</sup>	+		Methionine	Yes	Not compatible with heterodimer - no space for Met <sup>567</sup>
Arg <sup>568</sup>	+	1	Glutamine	Yes	Strong hydrogen bond to Pro <sup>593</sup> is lost
Tyr <sup>570</sup>			+	–	
Leu <sup>571</sup>	+		+	–	
Glu <sup>572</sup>			Arginine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Gln <sup>574</sup>		1	+	–	
Val <sup>575</sup>			Isoleucine	–	Isoleucine residue spatially well accommodated
Tyr <sup>578</sup>	+	2	+	–	
Glu <sup>579</sup>		2	Glutamine	Yes	Salt bridge to Arg <sup>568</sup> is lost
Ile <sup>581</sup>			Valine	–	Valine spatially well accommodated
Ala <sup>582</sup>			Glycine	–	Glycine spatially well accommodated
Glu <sup>583</sup>			+	–	*
Leu <sup>585</sup>	+		+	–	
Arg <sup>586</sup>		2	Glutamate	Yes	Salt bridge to Glu <sup>579</sup> is lost
Ala <sup>588</sup>			Threonine	Yes	Not compatible with heterodimer - no space for Thr <sup>588</sup>
Leu <sup>589</sup>	+		+	–	
Phe <sup>592</sup>	+	1	Tyrosine	–	Tyrosine residue spatially well accommodated
Pro <sup>593</sup>		1	Aspartate	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Val <sup>594</sup>			Asparagine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Met <sup>595</sup>	+		Leucine	–	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer

\*Glu<sup>583</sup> is not part of the interface but it forms the Glu<sup>579</sup>–Arg<sup>586</sup>–Glu<sup>583</sup> hydrogen-bonding network.



**Figure 4** Molecular analysis and modelling of the SNX9-, SNX33- and SNX9mod-SNX33 BAR domain dimers

Conservation of amino acid residues within the BAR-domain dimer of SNX9 (a), SNX33 (b) and the mutant SNX9mod (c) carrying 19 SNX33-like mutations. The atomic co-ordinates were always taken from the PDB entry 2RA1 [20]. Molecule B (MoIB) is shown as a cartoon (red) in front of the solid surface representation of molecule A (MoIA, yellow and blue). The surface patch of molecule A that is buried upon dimer formation is shown in blue. Panel (b) is rotated with respect to (a) by 180° around a horizontal axis. In (a) and (b), light colours indicate residues that are conserved between SNX9 and SNX33, whereas dark colours indicate exchanges across this comparison. (c) The comparison between the mutated SNX9-variant SNX9mod

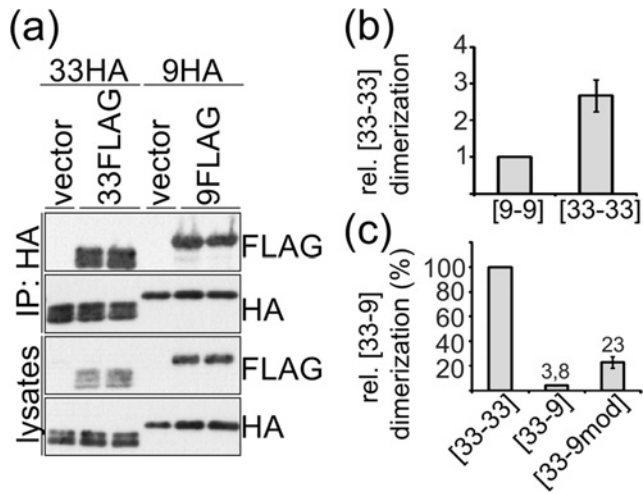
present a molecular mechanism by which the BAR domain allows homodimerization and prevents heterodimerization of SNX33. We expect that similar modelling approaches should predict the potential of other BAR domains for heterodimerization.

Dimerization of BAR domains generates the crescent-shaped structure, which is required for the membrane-binding and -tubulating activity of BAR domains [4]. BAR domain-containing proteins form homodimers [34], which we also found for SNX33, in agreement with a previous study [15]. Mutational analysis revealed that the BAR domain, but not the SH3 domain, is required for SNX33 homodimerization. This is in line with the BAR domain being the dimerization domain in other proteins [4,20,34]. A similar result was also reported for the SNX33 homologue SNX9, in which a truncation of the 13 C-terminal amino acids of the BAR domain resulted in loss of homodimer formation [22].

Although some BAR domains are able to form heterodimers with the BAR domain of other proteins, we find that SNX33 does not form heterodimers with its homologues SNX9 and SNX18 or with the more distant homologue SNX1. This lack of heterodimer formation is in agreement with a previous study, in which endogenous SNX9 or SNX33 were immunoprecipitated from HeLa cells, but failed to co-precipitate the other protein [12]. However, that study and our own data are in contrast with another study reporting heterodimer formation between SNX33 and SNX9 in HEK-293 cells [15]. In the present study, both SNX33 and SNX9 were transiently overexpressed. We also observed co-immunoprecipitation between SNX33 and SNX9 when both proteins were strongly overexpressed. However, the use of lower plasmid concentrations for the transfections as well as the generation of stable cell lines, expressing the target protein at lower levels, abolished the co-immunoprecipitation between both proteins. Thus we conclude that under physiological conditions there is no heterodimer formation between SNX33 and SNX9. This conclusion is further supported by mechanistic studies, including mutational analysis and molecular modelling. Swapping of the BAR domains of SNX9 and SNX33 revealed that the SNX33 BAR domain only forms dimers with the SNX33 BAR domain, regardless of whether the remaining part of the protein is of SNX9 or SNX33 origin. The molecular basis for this exclusive homodimer formation of the SNX33 BAR domain was revealed upon modelling of the SNX33 BAR domain structure in analogy to the SNX9 BAR domain structure, which was determined by X-ray crystallography [20]. In the SNX9 structure, we analysed the amino acids which form the dimer interaction interface. However, in the SNX33 sequence, several amino acids at the interface are not conserved and are exchanged to amino acids which are not compatible with an energetically favourable

and SNX33, exhibiting a significantly larger surface area that is amenable to productive interactions (light blue/light red). (d) Close-up of the SNX9 dimer, showing the amino acid residues contributing to the strong, bifurcated Glu<sup>579</sup>-Arg<sup>586</sup>-Glu<sup>583</sup> charged hydrogen-bonding network with all atoms in stick representation. Oxygens and nitrogens are shown in red and blue respectively, whereas the carbons and the cartoon representation of the helices are shown in orange and green for molecules A and B (MoIA and MoIB) respectively. Hydrogen bonding distances are given in Å. Glu<sup>583</sup> does not directly participate in the dimer interface but is essential for this hydrogen-bond network. This Figure was rotated about a horizontal axis by ~90° with respect to (a), thus looking from the bottom at (a). (e) HEK-293 cells stably expressing FLAG-SNX33 (FLAG33) were transiently transfected with HA-tagged constructs encoding SNX33 (33HA), SNX9 (9HA) or SNX9 with a modified BAR domain (9modHA). Co-immunoprecipitation was analysed as described in Figure 1(c). FLAG-SNX33 co-immunoprecipitated with SNX33 and to a lower degree with 9modHA, but not with SNX9. IP, immunoprecipitation.





**Figure 5** Estimation of SNX33–SNX33 and SNX33–SNX9 dissociation constants

(a) HEK-293 cells were cotransfected with FLAG- and HA-tagged SNX33 or SNX9 (33HA, 33FLAG, 9HA, 9FLAG respectively). As a control, empty vector was co-transfected with the HA-tagged SNX9/33. Co-immunoprecipitation was analysed as in Figure 1(b). IP, immunoprecipitation. (b) The relative amount of FLAG–SNX33 that co-immunoprecipitated with SNX33–HA was calculated (enrichment of FLAG-tagged constructs in HA immunoprecipitation divided by the immunoprecipitation efficiency = [(HA immunoprecipitation and Blot FLAG: loading control FLAG):(HA immunoprecipitation and Blot HA: loading control HA)]) and compared with the relative amount of SNX9–FLAG precipitated by SNX9–HA. (c) The relative amount of FLAG–SNX33 that co-immunoprecipitated with HA-tagged SNX9/SNX9mod was calculated (as in Figure 5b) and compared with the relative amount of SNX33–FLAG precipitated by SNX33–HA (compare with Figure 4e). Panels (b) and (c) show the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

interaction with the BAR domain of SNX9. Indeed, mutation of several of these amino acids in the SNX9 sequence to the corresponding amino acids of SNX33 allowed the mutant SNX9 protein to heterodimerize with wild-type SNX33. This clearly shows that the wild-type BAR domains of SNX33 and SNX9 are incompatible for heterodimer formation, indicating that both proteins may have distinct cellular functions, for example by acting at different cellular membranes. This possibility is in agreement with the lack of cellular co-localization of both proteins [12]. However, SNX9 and SNX33 may act at their respective membranes by similar molecular mechanisms. SNX9 couples actin dynamics to membrane remodelling during the endocytic process [8,9]. Likewise, SNX33 has been implicated in endocytosis and actin remodelling and binds to proteins, such as dynamin, WASP and ADAM15, which are also binding partners of SNX9 [10–12,14–17,35].

At present, only a few BAR domain-containing proteins have been shown to form heterodimers through their BAR domains, such as the close homologues SNX1 and SNX2 and amphiphysin 1 and 2 [23,24]. But even for the two more distantly related BAR domains of SNX4 and amphiphysin 2, heterodimerization has been reported [25]. For many other BAR domain-containing proteins, it is not yet known whether they are able to form heterodimers, either with close homologues or with more distant homologues. On the basis of our modelling of the potential interaction between the BAR domains of SNX9 and SNX33, we expect that a similar modelling of the potential dimer interface should allow us to predict whether a heterodimerization between other BAR domains is possible or not. If the relevant amino acids at the dimer interface are not conserved between two distinct BAR domains, it is likely that they are not able to heterodimerize. In contrast, if the essential amino acids are conserved, a

heterodimerization should be possible. This assumption was further validated by analysing the interaction among the other SNX9 family members. *In silico* analysis predicted that there is no heterodimerization between SNX18 and either SNX9 or SNX33. This is in agreement with our results in the present study and a previous study analysing the endogenous proteins [12]. In contrast, another recent study reported a co-immunoprecipitation between SNX9 and SNX18 [36]. However, that study used a transient transfection assay, such that the interaction may be due to the strong overexpression, as discussed above. *In silico* analysis also provided the correct prediction for the experimentally shown interaction between the two BAR domain-containing proteins amphiphysin 1 and 2 [24], which are unrelated to the SNX9 family. In this case, the amino acids at the dimer interface are either conserved or show conservative mutations, providing a molecular explanation for the heterodimerization between two distinct BAR domain-containing proteins.

The different examples show that the *in silico* analysis provides a valuable approach for the prediction of BAR domain dimerization. One limitation is that the structure of one of the two BAR domains should be known. Although distinct BAR domains may have a similar overall fold [34], the presence of non-conserved amino acids may subtly alter the structure, such that different amino acids constitute the dimer interface in different BAR domains. Amino acid conservation may not be the only factor determining successful interaction between two distinct BAR domains. Additional factors may be the length of the BAR domain monomers, the curvature of the crescent-shaped dimer structure, as well as kinks in the individual helices of the BAR domain monomers [34]. Although the extent and functional consequence of heterodimer formation between BAR domain-containing proteins remains to be determined, heterodimerization could be a means to increase the functional versatility of the corresponding proteins, as the heterodimers may have different functions or subcellular localizations than the homodimers. Additionally, heterodimerization may allow the formation of large molecular complexes consisting of the distinct binding partners of the two different BAR domain-containing proteins.

## AUTHOR CONTRIBUTION

Stefan Lichtenthaler planned and guided the study, designed the experiments, analysed the data and wrote the paper; Bastian Dislich designed the experiments, performed the experiments and analysed the data; and Manual Than designed the experiments, performed the structural modelling, analysed the data and wrote the paper.

## FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft [SFB596 project B12 (to S.F.L.)], the Bundesministerium für Bildung und Forschung [project KNDD (to S.F.L.)] and the Molecular Medicine Program of the Medical School of the University of Munich (to B.D. and S.F.L.).

## REFERENCES

- Ren, G., Vajihala, P., Lee, J. S., Winsor, B. and Munn, A. L. (2006) The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 37–120
- Frost, A., Unger, V. M. and De Camilli, P. (2009) The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**, 191–196
- Suetsugu, S., Toyooka, K. and Senju, Y. (2010) Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 340–349
- 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

- 5 Seet, L. F. and Hong, W. (2006) The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 878–896
- 6 Teasdale, R. D., Loci, D., Houghton, F., Karlsson, L. and Gleeson, P. A. (2001) A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochem. J.* **358**, 7–16
- 7 Carlton, J., Bujny, M., Rutherford, A. and Cullen, P. (2005) Sorting nexins—unifying trends and new perspectives. *Traffic* **6**, 75–82
- 8 Lundmark, R. and Carlsson, S. R. (2009) SNX9 - a prelude to vesicle release. *J. Cell Sci.* **122**, 5–11
- 9 Yarar, D., Waterman-Storer, C. M. and Schmid, S. L. (2007) SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev. Cell* **13**, 43–56
- 10 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
- 11 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
- 12 Haberg, K., Lundmark, R. and Carlsson, S. R. (2008) SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking. *J. Cell Sci.* **121**, 1495–1505
- 13 Heiseke, A., Schobel, S., Lichtenthaler, S. F., Vorberg, I., Groschup, M. H., Kretzschmar, H., Schatzl, H. M. and Nunziante, M. (2008) The novel sorting nexin SNX33 interferes with cellular PrP formation by modulation of PrP shedding. *Traffic* **9**, 1116–1129
- 14 Schobel, S., Neumann, S., Hertweck, M., Dislich, B., Kuhn, P. H., Kremmer, E., Seed, B., Baumeister, R., Haass, C. and Lichtenthaler, S. F. (2008) A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 14257–14268
- 15 Zhang, J., Zhang, X., Guo, Y., Xu, L. and Pei, D. (2009) Sorting nexin 33 induces mammalian cell micronucleated phenotype and actin polymerization by interacting with Wiskott–Aldrich syndrome protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 21659–21669
- 16 Karkkainen, S., Hiiapakka, M., Wang, J. H., Kleino, I., Vaha-Jaakkola, M., Renkema, G. H., Liss, M., Wagner, R. and Saksela, K. (2006) Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO Rep.* **7**, 186–191
- 17 Kleino, I., Ortiz, R. M., Yritys, M., Huovila, A. P. and Saksela, K. (2009) Alternative splicing of ADAM15 regulates its interactions with cellular SH3 proteins. *J. Cell. Biochem.* **108**, 877–885
- 18 Kristensen, O., Guenat, S., Dar, I., Allaman-Pillet, N., Abderrahmani, A., Ferdaoussi, M., Roduit, R., Maurer, F., Beckmann, J. S., Kastrop, J. S. et al. (2006) A unique set of SH3–SH3 interactions controls IB1 homodimerization. *EMBO J.* **25**, 785–797
- 19 Levinson, N. M., Visperas, P. R. and Kuriyan, J. (2009) The tyrosine kinase Csk dimerizes through its SH3 domain. *PLoS ONE* **4**, e7683
- 20 Pylypenko, O., Lundmark, R., Rasmuson, E., Carlsson, S. R. and Rak, A. (2007) The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9. *EMBO J.* **26**, 4788–4800
- 21 Ramjaun, A. R., Philie, J., de Heuvel, E. and McPherson, P. S. (1999) The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J. Biol. Chem.* **274**, 19785–19791
- 22 Childress, C., Lin, Q. and Yang, W. (2006) Dimerization is required for SH3PX1 tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor signalling and interaction with ACK2. *Biochem. J.* **394**, 693–698
- 23 Haft, C. R., de la Luz Sierra, M., Barr, V. A., Haft, D. H. and Taylor, S. I. (1998) Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7278–7287
- 24 Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P. and McMahon, H. T. (1997) Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2003–2015
- 25 Leprince, C., Le Scolan, E., Meunier, B., Fraiser, V., Brandon, N., De Gunzburg, J. and Camonis, J. (2003) Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J. Cell Sci.* **116**, 1937–1948
- 26 Kuhn, P. H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C. and Lichtenthaler, S. F. (2007) Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **282**, 11982–11995
- 27 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
- 28 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
- 29 Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S. and Lichtenthaler, S. F. (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **29**, 3020–3032
- 30 Reynolds, C., Damerell, D. and Jones, S. (2009) ProtorP: a protein–protein interaction analysis server. *Bioinformatics* **25**, 413–414
- 31 Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programmes für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Ph. D. Thesis, Technical University Munich, Germany
- 32 Pylypenko, O., Ignatev, A., Lundmark, R., Rasmuson, E., Carlsson, S. R. and Rak, A. (2008) A combinatorial approach to crystallization of PX-BAR unit of the human sorting nexin 9. *J. Struct. Biol.* **162**, 356–360
- 33 Wang, Q., Kaan, H. Y., Hooda, R. N., Goh, S. L. and Sondermann, H. (2008) Structure and plasticity of endophilin and sorting nexin 9. *Structure* **16**, 1574–1587
- 34 Masuda, M. and Mochizuki, N. (2010) Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 391–398
- 35 Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A. and 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
- 36 Park, J., Kim, Y., Lee, S., Park, J. J., Park, Z. Y., Sun, W., Kim, H. and Chang, S. (2010) SNX18 shares a redundant role with SNX9 and modulates endocytic trafficking at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **123**, 1742–1750

Received 13 May 2010/8 October 2010; accepted 22 October 2010

Published as BJ Immediate Publication 22 October 2010, doi:10.1042/BJ20100709



## SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

# Specific amino acids in the BAR domain allow homodimerization and prevent heterodimerization of sorting nexin 33

Bastian DISLICH\*†, Manuel E. THAN‡ and Stefan F. LICHTENTHALER\*†<sup>1</sup>

\*DZNE - German Center for Neurodegenerative Diseases, Munich, 80336 Munich, Germany, †Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany, and ‡Protein Crystallography Group, Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute (FLI), 07745 Jena, Germany

See the pages that follow for Supplementary Tables S1–S3.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email stefan.lichtenthaler@med.uni-muenchen.de).

**Table S1 Stabilization and conservation of the SNX9/SNX18 dimer interface**

*In silico* analysis for the formation of potential SNX18–SNX9 heterodimers. The interface shows a conservation of 31.2% (20 out of 64 interface residues) that compares well with the overall conservation between SNX18 and SNX9 BAR domains of 35.8% (73 out of 204 residues), arguing against any evolutionary pressure for a preferential conservation of interface residues, as already observed for the SNX9–SNX33 pair. A deeper structural analysis shows for the SNX18–SNX9 pair a large number of amino acid exchanges that are not compatible with the formation of heterodimers and many of the interactions required for the formation of SNX9 homodimers would be disrupted in a hypothetical SNX18–SNX9 heterodimer.

Amino acid (SNX9)	Partial interface contact area >2%	Number of hydrogen bonds	Conservation (+) or amino acid in SNX18	Comment
Phe <sup>405</sup>	+		+	
Ala <sup>408</sup>			Lysine	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Met <sup>409</sup>			+	
Gly <sup>412</sup>			Serine	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Val <sup>413</sup>			Alanine	Alanine residue spatially well accommodated
Glu <sup>415</sup>			Glutamine	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Lys <sup>416</sup>	+		+	
Val <sup>419</sup>	+		Threonine	Threonine residue spatially well accommodated
Gly <sup>420</sup>			Alanine	Alanine residue spatially well accommodated
Glu <sup>422</sup>		1	+	Salt bridge to Lys <sup>437</sup>
His <sup>423</sup>	+	1	Phenylalanine	Phenylalanine residue spatially well accommodated, but loss of hydrogen bond
Arg <sup>426</sup>	+	1	Lysine	Salt bridge to Glu <sup>434</sup> is still possible
Pro <sup>430</sup>			Glycine	Surface/edge of interface - no major energetic contribution
Lys <sup>431</sup>			Phenylalanine	Not compatible with heterodimer, no space for Phe <sup>431</sup>
Glu <sup>434</sup>	+	2	+	Salt bridge to Arg <sup>426</sup>
Tyr <sup>435</sup>		2	+	Strong hydrogen bond to Tyr <sup>578</sup>
Lys <sup>437</sup>		1	+	Salt bridge to Glu <sup>422</sup>
Ile <sup>438</sup>	+		Valine	Valine residue spatially well accommodated, loss in van der Waals contact
Lys <sup>440</sup>			Glutamine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Ala <sup>441</sup>	+		Serine	Serine residue possibly accommodated
Lys <sup>442</sup>			Phenylalanine	Not compatible with heterodimer
Ser <sup>444</sup>			Glycine	Glycine residue spatially well accommodated
Leu <sup>445</sup>	+		+	
Val <sup>448</sup>	+		Alanine	Not compatible with heterodimers, hydrophobic contact lost
Phe <sup>449</sup>	+		+	
Ser <sup>451</sup>			Leucine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Ser <sup>452</sup>			Aspartate	Asp <sup>452</sup> might be accommodated, but rearrangement is required
Tyr <sup>454</sup>	+	1	Glutamine	Not compatible with heterodimers - glutamine residue makes wrong contacts
Gln <sup>455</sup>			Alanine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Gly <sup>456</sup>			Phenylalanine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Glu <sup>457</sup>		1	Serine	Salt bridge to Arg <sup>559</sup> is lost
Leu <sup>460</sup>	+		+	
Ile <sup>464</sup>			+	
Ala <sup>467</sup>			Threonine	Not compatible with heterodimer - no space for Thr <sup>467</sup>
Tyr <sup>471</sup>		1	+	
Leu <sup>486</sup>			+	
Leu <sup>489</sup>			Valine	Valine residue spatially well accommodated
Asn <sup>553</sup>		1	Histidine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
His <sup>556</sup>			+	
Ser <sup>557</sup>			Glutamine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Arg <sup>559</sup>		1	+	Salt bridge to Glu <sup>547</sup>
Ile <sup>560</sup>	+		Valine	Valine residue spatially well accommodated
Tyr <sup>561</sup>			Arginine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Tyr <sup>563</sup>			Phenylalanine	Phenylalanine spatially well accommodated
Asn <sup>564</sup>	+	1	Lysine	Not compatible with heterodimer - no space for Lys <sup>564</sup>
Ile <sup>567</sup>	+		Methionine	Not compatible with heterodimer - no space for Met <sup>567</sup>
Arg <sup>568</sup>	+	1	Glutamine	Strong hydrogen bond to Pro <sup>593</sup> lost
Tyr <sup>570</sup>			Phenylalanine	Phenylalanine residue spatially well accommodated
Lys <sup>571</sup>	+		+	
Glu <sup>572</sup>			Glutamine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Gln <sup>574</sup>		1	+	
Val <sup>575</sup>	+		Isoleucine	Isoleucine residue spatially well accommodated
Tyr <sup>578</sup>	+	2	Phenylalanine	Phenylalanine residue spatially well accommodated, but loss of hydrogen bond
Glu <sup>579</sup>		2	Glutamine	Salt bridge to Arg <sup>568</sup> is lost
Ile <sup>581</sup>			Valine	Valine residue spatially well accommodated
Ala <sup>582</sup>			Threonine	Threonine residue spatially well accommodated
Glu <sup>583</sup>			Glutamine	*
Leu <sup>585</sup>	+		+	
Arg <sup>586</sup>		2	Glutamate	Salt bridge to Glu <sup>579</sup> lost
Ala <sup>588</sup>			+	
Leu <sup>589</sup>	+		+	
Phe <sup>592</sup>	+	1	Tyrosine	Tyrosine residue spatially well accommodated
Pro <sup>593</sup>		1	Aspartate	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Val <sup>594</sup>			Serine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer
Met <sup>595</sup>	+		Valine	Surface/edge of interface - no major contribution to dimer

\*Glu<sup>583</sup> is not part of the interface but it forms the Glu<sup>579</sup>–Arg<sup>586</sup>–Glu<sup>583</sup> hydrogen-bonding network.

**Table S2 Potential conservation across the SNX18–SNX33 dimer interface**

The structure of the BAR domain is available for SNX9, but not for SNX18 or SNX33. Thus the *in silico* analysis for a potential heterodimerization relies on the assumption that those amino acid positions which form the dimer interface in SNX9 are the same amino acid positions (in the sequence alignment) that form the dimer interface in SNX18 and SNX33. Although there is no experimental evidence for this, the assumption may be valid, because all three proteins show a relatively high degree of sequence identity of 28.9%, which should result in a similar overall fold of their BAR domains. However, it cannot be excluded that minor rearrangements exist, such as a turn by several degrees and/or a shift by one to two amino acid residues within the long BAR domain helices, which must completely be ignored by our analysis. In addition to this uncertainty in designating the dimer interface residues, only their chemical properties can be compared. For any analysis of structural effects, experimental three-dimensional information would be required. Based on these limitations, we analysed amino acid conservation across a hypothetical SNX18–SNX33 heterodimer interface. The BAR domains show a higher degree of conservation (54.9%, 112 out of 204 amino acids are identical) than the corresponding SNX9 heterodimer models. The degree of conservation is not significantly increased when only the interface residues are considered (60.9%, 39 out of 64 amino acids are identical). This argues against an evolutionary pressure for a preferential conservation of interface residues. The comparison of the chemical and structural properties of the homology-based interface residues shows a significant number of amino acid exchanges that are not compatible with the formation of an SNX18–SNX33 heterodimer. The number of such exchanges is smaller than observed for the hypothetical SNX9–SNX18 and SNX9–SNX33 heterodimers, but should still be significant to prevent the formation of heterodimers, consistent with our co-immunoprecipitation data (Figure 3a of the main text).

Amino acid (SNX9)	Partial interface contact area >2 % in SNX9	Amino acid in SNX18	Amino acid in SNX33	Comment: comparison of amino acids between SNX18–SNX33. The corresponding amino acid in SNX9 is also indicated in the left-hand column
Phe <sup>405</sup>	+	Phenylalanine	Phenylalanine	Conserved
Ala <sup>408</sup>		Lysine	Lysine	Conserved
Met <sup>409</sup>		Phenylalanine	Methionine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Gly <sup>412</sup>		Serine	Serine	Conserved
Val <sup>413</sup>		Alanine	Valine	Similar amino acid
Glu <sup>415</sup>		Glutamine	Glutamine	Conserved
Leu <sup>416</sup>	+	Leucine	Leucine	Conserved
Val <sup>419</sup>	+	Threonine	Valine	Similar shape but exchanges polar for hydrophobic
Gly <sup>420</sup>		Alanine	Alanine	Conserved
Glu <sup>422</sup>		Glutamate	Glutamate	Conserved
His <sup>423</sup>	+	Phenylalanine	Leucine	Unclear, depends on structural details
Arg <sup>426</sup>	+	Lysine	Lysine	Conserved
Pro <sup>430</sup>		Glycine	Glycine	Conserved
Leu <sup>431</sup>		Phenylalanine	Phenylalanine	Conserved
Glu <sup>434</sup>	+	Glutamate	Glutamate	Conserved
Tyr <sup>435</sup>		Tyrosine	Phenylalanine	Similar amino acid, but potential loss of hydrogen bond
Lys <sup>437</sup>		Lysine	Lysine	Conserved
Ile <sup>438</sup>	+	Valine	Leucine	Potential loss in van der Waals contact
Lys <sup>440</sup>		Glutamine	Serine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Ala <sup>441</sup>	+	Serine	Alanine	Similar shape but exchanges polar for hydrophobic
Leu <sup>442</sup>		Phenylalanine	Phenylalanine	Conserved
Ser <sup>444</sup>		Glycine	Alanine	Similar size, but not identical
Leu <sup>445</sup>	+	Leucine	Isoleucine	Similar size and character, but not identical
Val <sup>448</sup>	+	Alanine	Serine	Similar shape but exchange polar / hydrophobic
Phe <sup>449</sup>	+	Phenylalanine	Phenylalanine	Conserved
Ser <sup>451</sup>		Leucine	Glutamine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Ser <sup>452</sup>		Aspartate	Methionine	Not compatible, different size and polarity
Tyr <sup>454</sup>	+	Glutamine	Proline	Not compatible, different shape, size and polarity
Gln <sup>455</sup>		Alanine	Phenylalanine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Gly <sup>456</sup>		Phenylalanine	Cysteine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Glu <sup>457</sup>		Serine	Serine	Conserved
Leu <sup>460</sup>	+	Leucine	Leucine	Conserved
Ile <sup>464</sup>		Isoleucine	Isoleucine	Conserved
Ala <sup>467</sup>		Threonine	Threonine	Conserved
Tyr <sup>471</sup>		Tyrosine	Tyrosine	Conserved
Leu <sup>486</sup>		Leucine	Leucine	Conserved
Leu <sup>489</sup>		Valine	Methionine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Asn <sup>553</sup>		Histidine	Asparagine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
His <sup>556</sup>		Histidine	Histidine	Conserved
Ser <sup>557</sup>		Glutamine	Serine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Arg <sup>559</sup>		Arginine	Arginine	Conserved
Ile <sup>560</sup>	+	Valine	Glutamate	Not compatible, different size and charge
Tyr <sup>561</sup>		Arginine	Leucine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Tyr <sup>563</sup>		Phenylalanine	Phenylalanine	Conserved
Asn <sup>564</sup>	+	Lysine	Lysine	Conserved
Ile <sup>567</sup>	+	Methionine	Methionine	Conserved
Arg <sup>568</sup>	+	Glutamine	Glutamine	Conserved
Tyr <sup>570</sup>		Phenylalanine	Tyrosine	Similar amino acid, but potential loss of hydrogen bond
Leu <sup>571</sup>	+	Leucine	Leucine	Conserved
Glu <sup>572</sup>		Glutamine	Arginine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Gln <sup>574</sup>		Glutamine	Glutamine	Conserved
Val <sup>575</sup>	+	Isoleucine	Isoleucine	Conserved
Tyr <sup>578</sup>	+	Phenylalanine	Tyrosine	Similar amino acid, but potential loss of hydrogen bond
Glu <sup>579</sup>		Glutamine	Glutamine	Conserved
Ile <sup>581</sup>		Valine	Valine	Conserved
Ala <sup>582</sup>		Threonine	Glycine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Leu <sup>585</sup>	+	Leucine	Leucine	Conserved
Arg <sup>586</sup>		Glutamate	Glutamate	Conserved
Ala <sup>588</sup>		Alanine	Threonine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Leu <sup>589</sup>	+	Leucine	Leucine	Conserved
Phe <sup>592</sup>	+	Tyrosine	Tyrosine	Conserved
Pro <sup>593</sup>		Aspartate	Aspartate	Conserved
Val <sup>594</sup>		Serine	Asparagine	Not compatible, but no major partial interface in SNX9
Met <sup>595</sup>	+	Valine	Leucine	Not compatible, different shape and size

**Table S3 Conservation of amino acids across the *Drosophila* and rat amphiphysin dimer interface**

*In silico* analysis of the amino acid conservation across the predicted BAR interface among the two rat amphiphysin proteins, for which the existence of heterodimers has been shown [1]. As for the SNX18–SNX33 analysis above, no experimental structural data are available for either rat amphiphysin 1 or 2, only for *Drosophila* amphiphysin. On the basis of the overall 35–40% sequence identity between the *Drosophila* and rat proteins, an overall similar structure can be assumed as discussed above. The resulting analysis reveals that 135 out of 206 (65.5%) amino acid residues are conserved between the BAR domains of the two rat proteins. Of the 57 amino acids within the predicted interface area, 34 (59.6%) are absolutely conserved. In contrast with the SNX18–SNX33 comparison, nearly all amino acid exchanges between the two proteins are compatible with a constructive formation of amphiphysin 1 and 2 heterodimers. Correspondingly, the experimental finding of amphiphysin 1 and 2 heterodimers [1] can well be understood from the structural data. dma, *Drosophila melanogaster* amphiphysin, PDB code 1URU [2].

Amino acid (dma)	Partial interface contact area >2% in dma	Number of hydrogen bonds in dma	Amino acid in rat amphiphysin 1	Amino acid in rat amphiphysin 2	Comment: amphiphysin 1
Arg <sup>48</sup>			+	Lysine	Lysine/arginine exchange structurally well tolerated
Ser <sup>52</sup>	+	1	Glutamate	Glutamate	Conserved
Ala <sup>53</sup>			Glycine	Glycine	Conserved
Arg <sup>55</sup>	+	1	+	+	Conserved
Leu <sup>56</sup>	+		+	+	Conserved
Glu <sup>59</sup>	+	1	+	Aspartate	Aspartate/glutamate exchange structurally well tolerated
Phe <sup>60</sup>			Leucine	Leucine	Conserved
Asn <sup>62</sup>			Glycine	Threonine	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Tyr <sup>63</sup>	+		+	+	Conserved
Cys <sup>66</sup>	+	1	Alanine	Serine	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Val <sup>67</sup>			Isoleucine	+	Isoleucine/valine exchange structurally well tolerated
Ala <sup>69</sup>			Glycine	+	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Ala <sup>70</sup>			Methionine	Methionine	Conserved
Ala <sup>73</sup>	+	1	+	+	Conserved
Ser <sup>74</sup>			+	+	Conserved
Thr <sup>76</sup>		3	Lysine	Lysine	Conserved
Leu <sup>77</sup>	+		+	+	Conserved
Met <sup>78</sup>			Threonine	Serine	Structurally tolerated, possibly some loss in hydrophobic interaction
Asp <sup>79</sup>			Glutamate	Glutamate	Conserved
Ser <sup>80</sup>	+		+	Cysteine	Cysteine/serine exchange structurally well tolerated
Val <sup>81</sup>	+		Leucine	Leucine	Conserved
Glu <sup>83</sup>	+	2	+	+	Conserved
Ile <sup>84</sup>	+		Valine	Valine	Conserved
Tyr <sup>85</sup>			+	+	Conserved
Glu <sup>86</sup>			+	+	Conserved
Gln <sup>88</sup>			Aspartate	Glutamate	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Trp <sup>89</sup>	+		+	+	Conserved
Leu <sup>95</sup>			Valine	Alanine	Structurally tolerated, possibly some loss in hydrophobic interaction
Trp <sup>106</sup>			+	+	Conserved
Tyr <sup>124</sup>			+	+	Conserved
Tyr <sup>197</sup>			Tryptophan	Tryptophan	Conserved
Arg <sup>200</sup>	+		+	+	Conserved
Ile <sup>201</sup>	+		Valine	Valine	Conserved
Leu <sup>202</sup>			Glycine	Glycine	Conserved
Leu <sup>204</sup>	+		Tyrosine	Tyrosine	Conserved
Val <sup>205</sup>	+		+	+	Conserved
Leu <sup>208</sup>	+		Phenylalanine	Phenylalanine	Conserved
Glu <sup>209</sup>			Lysine	+	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Leu <sup>211</sup>			Valine	Isoleucine	Structurally tolerated, possibly some loss in hydrophobic interaction
Phe <sup>212</sup>	+		Serine	Alanine	Structurally tolerated, possibly some loss in hydrophobic interaction
Ala <sup>213</sup>			Serine	Glycine	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Glu <sup>215</sup>			+	+	Conserved
Gln <sup>216</sup>	+		Alanine	Glutamate	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Phe <sup>218</sup>		+	+	+	Conserved
His <sup>219</sup>	+	2	+	+	Conserved
Asn <sup>220</sup>			Lysine	Lysine	Conserved
Thr <sup>222</sup>			Isoleucine	Methionine	Exchange not conservative, but structurally well tolerated
Ala <sup>223</sup>	+		+	Serine	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Tyr <sup>226</sup>	+		Cysteine	Asparagine	Exchange not conservative, but structurally well tolerated
Ser <sup>227</sup>			Histidine	Glutamine	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Leu <sup>229</sup>			+	+	Conserved
Glu <sup>230</sup>	+		Tyrosine	Asparagine	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Val <sup>233</sup>	+		Methionine	Leucine	Exchange not conservative, but structurally well tolerated
Asp <sup>234</sup>			Threonine	Valine	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Leu <sup>236</sup>			+	+	Conserved
Ala <sup>237</sup>			Glycine	Glutamate	Surface/edge of interface, no major energetic contribution
Ser <sup>240</sup>			Histidine	Histidine	Conserved

## REFERENCES

- 1 Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P. and McMahon, H. T. (1997) Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2003–2015
- 2 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

---

Received 13 May 2010/8 October 2010; accepted 22 October 2010

Published as BJ Immediate Publication 22 October 2010, doi:10.1042/BJ20100709

# A Novel Sorting Nexin Modulates Endocytic Trafficking and $\alpha$ -Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein\*

Received for publication, February 25, 2008. Published, JBC Papers in Press, March 19, 2008, DOI 10.1074/jbc.M801531200

Susanne Schöbel<sup>‡1</sup>, Stephanie Neumann<sup>‡1</sup>, Maren Hertweck<sup>§</sup>, Bastian Dislich<sup>‡</sup>, Peer-Hendrik Kuhn<sup>‡</sup>, Elisabeth Kremmer<sup>¶</sup>, Brian Seed<sup>||</sup>, Ralf Baumeister<sup>§\*\*\*</sup>, Christian Haass<sup>‡</sup>, and Stefan F. Lichtenthaler<sup>‡2</sup>

From the <sup>‡</sup>Center for Integrated Protein Science and the Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig Maximilians University, Schillerstrasse 44, 80336 Munich, Germany, <sup>§</sup>Center for Biochemistry and Molecular Cell Research (ZBMZ, Faculty of Medicine), Bioinformatics and Molecular Genetics (Faculty of Biology), Institute of Biology 3, and <sup>\*\*\*</sup>Center for Systems Biology (ZBSA), University of Freiburg, Schaenzlestrasse 1, 79104 Freiburg, Germany, <sup>¶</sup>Helmholtz Center Munich, Institute of Molecular Immunology, Marchioninistrasse 25, 81377 Munich, Germany, and the Department of Molecular Biology, <sup>||</sup>Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02114

Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein (APP) by the two proteases  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase is a key regulatory event in the generation of the Alzheimer disease amyloid  $\beta$  peptide (A $\beta$ ).  $\beta$ -Secretase catalyzes the first step in A $\beta$  generation, whereas  $\alpha$ -secretase cleaves within the A $\beta$  domain, prevents A $\beta$  generation, and generates a secreted form of APP with neuroprotective properties. At present, little is known about the cellular mechanisms that control APP  $\alpha$ -secretase cleavage and A $\beta$  generation. To explore the contributory pathways, we carried out an expression cloning screen. We identified a novel member of the sorting nexin (SNX) family of endosomal trafficking proteins, called SNX33, as a new activator of APP  $\alpha$ -secretase cleavage. SNX33 is a homolog of SNX9 and was found to be a ubiquitously expressed phosphoprotein. Exogenous expression of SNX33 in cultured cells increased APP  $\alpha$ -secretase cleavage 4-fold but surprisingly had little effect on  $\beta$ -secretase cleavage. This effect was similar to the expression of the dominant negative dynamin-1 mutant K44A. SNX33 bound the endocytic GTPase dynamin and reduced the rate of APP endocytosis in a dynamin-dependent manner. This led to an increase of APP at the plasma membrane, where  $\alpha$ -secretase cleavage mostly occurs. In summary, our study identifies SNX33 as a new endocytic protein, which modulates APP endocytosis and APP  $\alpha$ -secretase cleavage, and demonstrates that the rate of APP endocytosis is a major control factor for APP  $\alpha$ -secretase cleavage.

Processing of the type I membrane protein amyloid precursor protein (APP)<sup>3</sup> by two different proteases, called  $\alpha$ - and

$\beta$ -secretase, is also referred to as shedding and is a central regulatory event in the generation of the amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ), which has a key role in Alzheimer disease (AD) pathogenesis (1). Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleave APP within its ectodomain close to its transmembrane domain (Fig. 1A). The  $\beta$ -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 (2). After the initial cleavage of APP by BACE1, the remaining C-terminal APP fragment is cleaved by  $\gamma$ -secretase within its transmembrane domain at the C terminus of the A $\beta$  domain, leading to the secretion of the A $\beta$  peptide (3). In contrast to  $\beta$ -secretase,  $\alpha$ -secretase cleaves within the A $\beta$  sequence, and thereby precludes A $\beta$  peptide generation. The  $\alpha$ -secretase is a member of the ADAM family of proteases and may be ADAM10, ADAM17 (TACE), or ADAM9 (4).  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase are assumed to compete for the ectodomain cleavage of APP (5) but have opposite effects on A $\beta$  generation. Additionally,  $\alpha$ - but not  $\beta$ -secretase cleavage generates a secreted form of APP (APPs $\alpha$ ), which has neurotrophic and neuroprotective properties (6–8). Thus, shifting APP shedding away from  $\beta$ - toward  $\alpha$ -secretase cleavage could be therapeutically beneficial for AD. In order to do so, it is essential to understand the cellular pathways that control to what extent APP shedding occurs by  $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase. However, to date little is known about such cellular pathways (9). For example, activation of certain kinases, such as mitogen-activated protein kinase and protein kinase C, increases APP  $\alpha$ -cleavage, but it remains unclear how these kinases finally mediate the increase in APP shedding. An additional mechanism controlling APP  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleavage may be the intracellular localization and in particular the endocytic trafficking of APP, which occurs in a clathrin- and dynamin-dependent manner. The  $\alpha$ -secretase cleaves mostly at the cell surface, whereas  $\beta$ -secretase cleavage takes place after endocytosis of wild-type APP into endosomes. In fact, APP lacking its cytoplasmic internalization motif accumulates at the plasma membrane and undergoes increased  $\alpha$ -secretase but a strongly reduced  $\beta$ -secretase cleavage (10, 11). Likewise, expression of the dynamin K44A mutant,

\* This work was supported by a fellowship from the Boehringer Ingelheim Foundation (to S. N.); Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB596 Project B12 (to S. F. L.), Project A9 (to C. H.), and Project Z2 (to E. K.); the European Commission for NeuroNE (to C. H.); 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.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-89-218075453; Fax: 49-89-218075415; E-mail: Stefan.Lichtenthaler@med.uni-muenchen.de.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: APP, amyloid precursor protein; BAR, Bin/aminophophysin/Rvs; A $\beta$ , amyloid  $\beta$  peptide; AD, Alzheimer disease; SNX, sorting nexin; PX, Phox homology; HA, hemagglutinin; GST, glutathione S-trans-

ferase; SH3, Src homology 3; GFP, green fluorescent protein; PBS, phosphate-buffered saline; AP, alkaline phosphatase; APPs $\alpha$  and APPs $\beta$ ,  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase-cleaved APP, respectively.



## SNX33 Stimulates APP $\alpha$ -Secretase Cleavage

which interferes with dynamin-dependent endocytosis in a dominant-negative manner, inhibits APP internalization from the plasma membrane and alters APP shedding. However, conflicting results have been reported as to whether this mainly affects the  $\alpha$ - or the  $\beta$ -secretase cleavage or both of them (12, 13). Moreover, expression of Rab5, a key regulator of endocytosis, increases APP internalization from the plasma membrane and enhances APP cleavage by  $\beta$ -secretase, leading to increased A $\beta$  levels (14). Interestingly, endosomal abnormalities, which are similar to Rab5-overexpressing cells and which are consistent with increased APP endocytosis and cleavage by  $\beta$ -secretase, are among the earliest neuropathological changes observed in AD brain (15), indicating that altered APP endocytosis might contribute to AD pathology. However, the detailed molecular mechanisms controlling APP endocytosis and, thus, the availability of APP for  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase are not yet well understood.

Endocytosis in general is a highly coordinated process with a key role in cellular homeostasis (16, 17) and affects distinct properties of cell surface membrane proteins, such as their biological function, signaling, and degradation. A number of different proteins are involved in the orchestration of the endocytic process (17, 18). Among them are the large GTPase dynamin, which is involved in the scission of the endocytic vesicles from the plasma membrane, and the small GTPase Rab5 that is required for the transport of the vesicles and their fusion with the endosomes. However, not all mechanisms controlling endocytosis are understood, and new proteins with a function in endocytic protein trafficking continue to be identified. One such example is sorting nexin 9 (SNX9), a member of the heterogeneous family of SNXs (19, 20). SNXs are cytosolic and membrane-associated proteins characterized by the presence of an SNX-type Phox homology (PX) domain, which is a subgroup of the phosphoinositide-binding PX domain superfamily (21). Additionally, SNXs contain a variable number of additional protein-protein and protein-lipid interaction domains (20). At present, few SNXs have been functionally studied, but they are generally assumed to be involved in endosomal trafficking. For example, SNX1 is part of the retromer complex and is involved in the retrieval of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor from sorting endosomes (20). SNX9 is involved in endocytosis and binds different endocytic proteins, among them dynamin (22, 23). Whether SNXs contribute to APP endocytosis or processing has not yet been established.

To explore systematically the cellular pathways controlling APP shedding, we employed sib selection expression cloning and identified proteins activating APP shedding by  $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase. With this approach, we identified a novel member of the SNX family, SNX33, as a new modulator of APP endocytosis and  $\alpha$ -secretase cleavage. We find that SNX33 is a novel dynamin-binding protein that inhibits dynamin-dependent endocytosis. Expression of SNX33 reduces the rate of APP endocytosis and increases APP levels at the cell surface, where APP undergoes increased cleavage by  $\alpha$ -secretase.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents and Antibodies**—The following antibodies were used: anti-HA HA.11 (Covance), anti-HA 12CA5, anti-HA

3F10 (Roche Applied Science), horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse and anti-rabbit (Promega), antibody 6E10 (against A $\beta$ -(1–17), Senetek Inc.), 6687 (against APP C terminus) (24), 192wt (specific for the C terminus of APPs $\beta$ , provided by Dale Schenk), W02 (against amino acids 5–8 of A $\beta$ , provided by Konrad Beyreuther) (25), anti-dynamin-1/2 (Cell Signaling), anti-dynamin (Hudy1) (Upstate Biotechnology), and anti-Hsp70 (StressGen). Polyclonal SNX33-antiserum 67 was generated against a synthetic peptide (H<sub>2</sub>N-FRPKPPLERQD-SLASC-CONH<sub>2</sub>) within the low complexity domain of SNX33, and control antiserum 92 was generated against an unrelated protein (Eurogentec Seraing, Belgium). Rat monoclonal antibodies 2A1 (IgG1, binding to the SH3 domain of SNX33) and 6C6 (IgG1, binding to the SH3 domain of SNX9) were generated by immunization with GST-SNX33 and GST-SNX9. Control rat antibody 7H8 (IgG1) was against mouse C1q.

**Plasmid Construction**—cDNAs encoded human proteins. BACE1 (two clones differing in the length of the 3'-untranslated region (26)), SNX33, and dynamin-1  $\Delta$ NT were obtained in the peak8 vector from a human brain cDNA library (Edgebio). SNX33 sequence was deposited to GenBank<sup>TM</sup> (accession number EF653821 (nucleotide), ABV26009 (protein)). Its 5'-untranslated region is 166 bases longer than NM\_153271 and has a 3'-untranslated region of 1413 bp. Plasmids pCEP4/APP695 (27) and peak12/ADAM10 (28) were described. cDNAs of GFP, SNX9 (from ATCC), SNX33 (without untranslated regions or with C-terminal fusions to GFP and HA tag or lacking the SH3 domain), dynamin-1 (C-terminal fusions to HA tag or GFP), protein kinase C $\alpha$  (C-terminal HA tag), and the SH3 domain of SNX33 were generated by PCR and cloned into vector peak12. GST fusions of SNX33 or SNX33-SH3 domain were in pGEX5.1 vector. pSuperHygro was designed to contain a hygromycin resistance cassette in the original multiple cloning site. pSuperHygroSNX33RNAi1 and -2 have the short hairpin RNA sequence 5'-gcacatgatgcagaactac-3' and 5'-ggccgagcctctatgact-3'. Peak8/MEKK2 (encoding constitutively active MEKK2) was described (29). pCB1/dynamin-1 and Dyn-1K44A were obtained from Marc Caron. The identities of all constructs obtained by PCR were confirmed by DNA sequencing. Peak12/MMP-GFP was described (28), and peak12/MMP-SNX33-IRES-GFP was generated by cloning the SNX33 cDNA into peak12/MMP-IL-1R2-IRES-GFP (30).

**Cell Culture, Expression Cloning, Western Blot, APP, and Transferrin Uptake Assays**—Human embryonic kidney 293-EBNA (HEK293) and COS cells were cultured as described (30). Clonal HEK293 cells expressing AP-APP and Bcl-X<sub>L</sub>/CrmA (clone Sabc70) were generated as described (28, 31). HEK293 cells stably expressing peak12/AP-L-selectin and peak12/AP-TNFR2 were described (28, 29). Polyclonal HEK293 cells stably expressing pSuper plasmids were selected with 100  $\mu$ g/ml hygromycin. Polyclonal COS cells stably expressing APP695 were selected in 3.0  $\mu$ g/ $\mu$ l hygromycin. Transfections were done using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). One day after the transfection, medium was changed. After additional overnight incubation, cell lysates (in 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40) and media were collected and analyzed. Cells stably expressing pSuper vectors (SNX33 knockdown) were prepared in the same

way. For the indicated experiments, phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, phosphatase inhibitor (1:100; Sigma)) were added to cell lysates. The expression cloning screen was carried out as described (31). To detect secreted and cellular APP or other cellular proteins, protein concentration in the cell lysate was measured, and corresponding aliquots of lysate or medium were separated by SDS-PAGE. Measurement of alkaline phosphatase (AP) activity, APP and transferrin uptake assays, and image acquisition were performed as described (31, 32).

**Preparation of Brain Homogenate, Cytosol, and Membrane Fraction from HEK293 Cells**—Mouse brain was homogenated in brain lysis buffer (5 mM Tris, pH 7.4, 250 mM sucrose, 5 mM EGTA, protease inhibitors), centrifuged at 7,000 rpm. Supernatant was centrifuged at 100,000  $\times$  g for 60 min (4 °C). Pellet was resuspended in brain lysis buffer containing 1% Triton X-100 and centrifuged at 100,000  $\times$  g (30 min, 4 °C). Cytosol and membrane fractions of HEK293 cells were prepared as described (22) under slightly modified conditions. Briefly, HEK293 cells were seeded in 10-cm dishes. After 72 h, cells were scraped using PBS plus 25 mM EDTA, washed once with PBS, centrifuged at 350  $\times$  g, and washed twice with KSHM buffer (100 mM KCH<sub>3</sub>COO, 20 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 85 mM sucrose, 50 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, phosphatase inhibitor (1:100; Sigma)). Cells were centrifuged at 850  $\times$  g, resuspended in KSHM buffer, quick frozen in liquid nitrogen, and thawed in a 37 °C water bath twice (the volume of KSHM buffer used was equivalent to the volume of centrifuged cells). Cells were centrifuged; supernatant of opened cells was collected and subjected to ultracentrifugation for 30 min at 4 °C and 100,000  $\times$  g. Aliquots of the resulting supernatant (cytosol) were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Pellet was resolved in lysis buffer, incubated on ice for 20 min, and centrifuged for 5 min at 4 °C and 13,000 rpm. This supernatant (membrane fraction) was stored at -20 °C. Before immunoprecipitation, cytosol and membrane fraction were ultracentrifuged at 4 °C for 30 min and 100,000  $\times$  g. Additionally, 1% Nonidet P-40 was added to the cytosolic fraction to reduce nonspecific binding in the immunoprecipitation.

**Immunoprecipitations and Dephosphorylation**—For SNX33/dynamin co-immunoprecipitation, phosphatase inhibitors (described above) were added to the cell lysates. Lysates were incubated with 5  $\mu$ g of antibody (anti-HA (12CA5) or anti-dynamin-1 (Hudy1)) for 4 h (4 °C) using protein-G Dynabeads (Dyna). After washing with STEN-NaCl (STEN buffer plus 0.35 M NaCl) and twice with STEN (0.05 M Tris/HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, and 0.2% Nonidet P-40), bound proteins were resolved by SDS-PAGE. For anti-HA immunoprecipitations (HA.11, for the dephosphorylation experiment) lysates were incubated with antibody (300:1) and treated or not with shrimp alkaline phosphatase (Roche Applied Science) overnight at 37 °C in the presence of protease inhibitors. For SNX33 immunoprecipitation, antibody 67 (polyclonal) was used at a 1:100 dilution or antibody 2A1 (monoclonal) was used at a 1:10 dilution with protein-A- and protein-G-Sepharose, respectively.

**Cell Surface Biotinylation**—48 h after transfection, HEK293 cells (in poly-L-lysine-coated 24-well dishes) were washed on

ice three times with ice-cold PBS and incubated for 30 min on ice with PBS containing 0.5 mg/ml EZ-link<sup>TM</sup>-Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce). Cells were washed three times with ice-cold 20 mM glycine plus PBS. The last wash was left for 15 min on cells (on ice). After three additional washes with ice-cold PBS, cell lysates were prepared. To detect biotinylated APP, protein concentration in the cell lysate was measured, and corresponding aliquots of lysate were used for immunoprecipitation overnight at 4 °C using Streptavidin-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences).

**Northern Blot Analysis**—Multiple-tissue Northern blot analysis was performed according to the supplier's protocol (Clontech, BD Biosciences). Briefly, a [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Biosciences)-labeled SNX33 or actin probe (Random Primer DNA Labeling System; Invitrogen) was added to a human multiple-tissue Northern blot (BD Biosciences). Hybridization was performed overnight at 65 °C. Excess probe was removed by washing with 2 $\times$  SSC, 0.1% SDS at room temperature, followed by washing with 0.1 $\times$  SSC, 0.1% SDS at 65 °C. The blot was exposed to Super RX film (Fuji).

**Purification of GST Fusion Proteins and GST Pull-down**—GST proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 cells and purified according to the manufacturer's protocol (Amersham Biosciences). GST-SNX33 was eluted using 8 M urea. For *in vitro* binding studies, HEK293 lysates were incubated with 30  $\mu$ l of GST or GST-SH3 fusion protein coupled to GSH-Sepharose beads. Equal amounts of GST and GST-SH3 fusion protein were used (estimated by Coomassie Blue staining). Samples were incubated at 4 °C for 2 h and washed five times with 1 ml of STEN buffer. Co-precipitated dynamin was detected using dynamin-1/2 antibody.

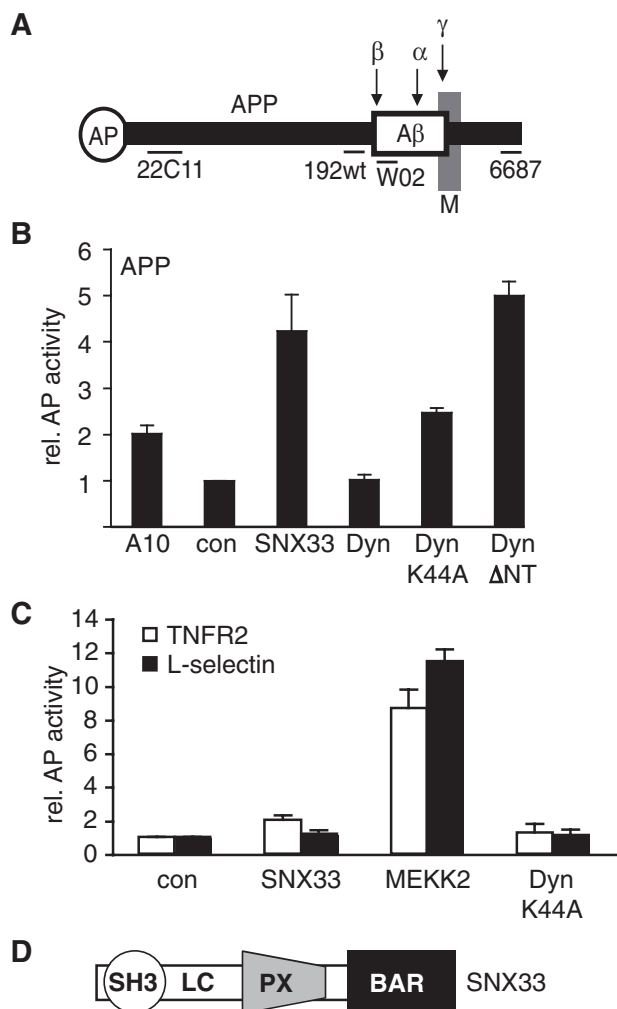
**Retroviral Transduction**—For the transduction of HeLa cells and H4 neuroglioma cells, retroviral supernatants (replication-deficient Moloney murine leukemia virus) were generated as described (30), using peak12/MMP-GFP or peak12/MMP-SNX33-IRES-GFP.

**Trichloroacetic Acid Precipitation**—One confluent 10-cm dish was lysed in 800  $\mu$ l of solubilization buffer. 88  $\mu$ l of 50% trichloroacetic acid solution were added. After a 10-min incubation on ice, precipitate was pelleted in a microcentrifuge and washed twice with ice-cold acetone. Pellet was dried in heat block (50 °C), resuspended in 2.3 $\times$  sample buffer containing 6 M urea, and heated for 10 min at 95 °C. Trichloroacetic acid precipitate was resolved on 10% acrylamide gels containing 2.8 M urea and subject to immunoblot analysis.

**Caenorhabditis elegans Strains**—The following strains were used: N2 Bristol (wild type), CX51 *dyn-1(ky51)*, BR3380 *Ex[lst-4::gfp]* line 1, BR3381 *Ex[lst-4::gfp]* line 2, ZH301 *Ex[dyn-1a/b::gfp]*, BR4825 *Ex[dyn-1a/b::gfp; lst-4::gfp]*.

***lst-4::gfp* Expression**—A *lst-4::gfp* translational fusion was constructed by cloning a 2.4-kb upstream regulatory sequence and complete cDNA of *lst-4* (Y37A1B.2c) into pPD95.75 (A. Fire; Carnegie Institute of Washington, Baltimore, MD). 20 ng/ $\mu$ l was injected into N2 together with *rol-6* (pRF4; 80 ng/ $\mu$ l) as coinjection marker (33). The injection yielded two independent transgenic lines (BR3380 and BR3381) that were used for further functional analysis. To generate BR4825 for rescue

## SNX33 Stimulates APP $\alpha$ -Secretase Cleavage



**FIGURE 1. SNX33 expression stimulates APP shedding.** *A*, schematic drawing of APP. The horizontal bars show the localization of the epitopes recognized by the indicated antibodies. The arrows point to the proteolytic  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -secretase cleavage sites within the APP ectodomain or transmembrane domain. Sequential cleavage of APP by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase generates the A $\beta$  peptide (white box). AP, alkaline phosphatase; M, membrane. *B*, AP reporter assay for the ectodomain shedding of APP. Human embryonic kidney 293 cells stably expressing AP-tagged APP were transiently transfected with the indicated constructs. AP activity in the conditioned medium was measured relative to control-transfected cells. Shown are mean and S.D. of three independent experiments. A10, ADAM10; Con, control; Dyn, dynamin-1. *C*, 293 cells stably expressing the AP-L-Selectin or AP-TNFR2 fusion protein were transiently transfected with the indicated constructs. Alkaline phosphatase activity was measured in the conditioned medium of the cells. Shown are the mean and S.D. of three independent experiments, each one carried out in duplicate. *D*, domain structure of SNX33. LC, low complexity.

experiments, *Ex[lst-4::gfp]* (BR3380) was crossed into *Ex[dyn-1a/b::gfp]* (ZH301).

## RESULTS

**Identification of SNX33 in an Expression Cloning Screen for Activators of APP Shedding**—To identify new modulators of APP shedding by  $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase, an expression cloning screen was performed. To this aim, cDNAs of an unamplified human adult brain cDNA library were transfected into a reporter cell line, which allows rapid detection of APP shedding in a high throughput format. The reporter cell line consists of human embryonic kidney 293 (HEK293) cells, which stably express a fusion protein of AP and full-length APP (AP-APP)

(Fig. 1A) (31). Upon cleavage of APP by  $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase, the secreted fusion protein can be detected in the conditioned medium by measuring the AP activity (28, 31). To protect the cells against possible cell death induced by proapoptotic genes represented in the cDNA pools, the HEK293 cells were additionally transfected with a plasmid encoding the cDNAs of two antiapoptotic proteins, Bcl-X<sub>L</sub> and CrmA. Three cDNAs were obtained, which increased AP-APP secretion at least 4-fold compared with control-transfected cells. They had a stronger effect on APP shedding than the well characterized  $\alpha$ -secretase ADAM10, which was used as a positive control and increased shedding 2-fold (Fig. 1B). First, the known APP  $\beta$ -secretase BACE1 (34) was identified, which validates the screening approach, since it shows that cDNAs can be obtained that are physiologically relevant for APP shedding. Second, a partial cDNA of the endocytic GTPase dynamin-1 was identified, encoding a truncated dynamin-1 lacking the N-terminal 209 amino acids, including the GTPase domain (Dyn $\Delta$ NT). This protein is expected to act as a dominant negative dynamin mutant (35). Dyn $\Delta$ NT increased AP-APP shedding 5-fold and had an even stronger effect than the well characterized dynamin-1 K44A mutant (Fig. 1B), which was previously shown to inhibit APP endocytosis and increase APP shedding (12, 13). As a control, expression of wild-type dynamin, which does not inhibit endocytosis, did not affect APP shedding (Fig. 1B). A third cDNA encodes a protein, which is identical to an as yet uncharacterized protein annotated as SNX33 or SH3PX3 (36). SNX33 increased APP shedding 4-fold (Fig. 1B). It did not affect the shedding of the corresponding AP fusion protein of the cell adhesion protein L-selectin (Fig. 1C) but increased the shedding of TNFR2 (tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2) by 2-fold. L-selectin and TNFR2 undergo an  $\alpha$ -secretase-like shedding similar to APP (28, 37, 38). As a control, to show that the shedding of L-selectin and TNFR2 can be enhanced in this assay, we used the kinase MEKK2, which strongly activated the shedding of both proteins (Fig. 1C). The novel protein SNX33 comprises 574 amino acids and has an N-terminal SH3 domain followed by a low complexity region (LC), a central phosphoinositide-binding PX domain, and a C-terminal BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) domain (Fig. 1D). SNX33 has two distant homologs, SNX9 (35.9% identity) and SNX18 (42.6% identity), which share the same domain structure (sequence alignment shown in Fig. 2). Although SNX18 has not yet been studied, SNX9 is involved in multiple modes of endocytosis and binds different endocytic proteins, including dynamin (22, 23, 39–42).

**Expression Pattern and Phosphorylation of SNX33**—Multiple-tissue Northern blot analysis revealed ubiquitous expression of SNX33, with a strong expression in heart and pancreas (data not shown). Endogenous SNX33 protein was detected in mouse brain homogenate (Fig. 3A) and HEK293 cells (Fig. 3B) as well as neuroblastoma SH-SY5Y cells, HeLa cells, neuroglioma H4 cells, and hepatoma HepG2 cells (data not shown) and has an apparent molecular mass of 70–75 kDa (Fig. 3B), which is slightly above its calculated molecular mass of 65 kDa. When cell lysis was carried out in the presence of phosphatase inhibitors, SNX33 was detected as a doublet band (Fig. 3B). These bands could be converted to a single band by treatment with alkaline phosphatase (Fig. 3C), revealing that SNX33 is a phos-



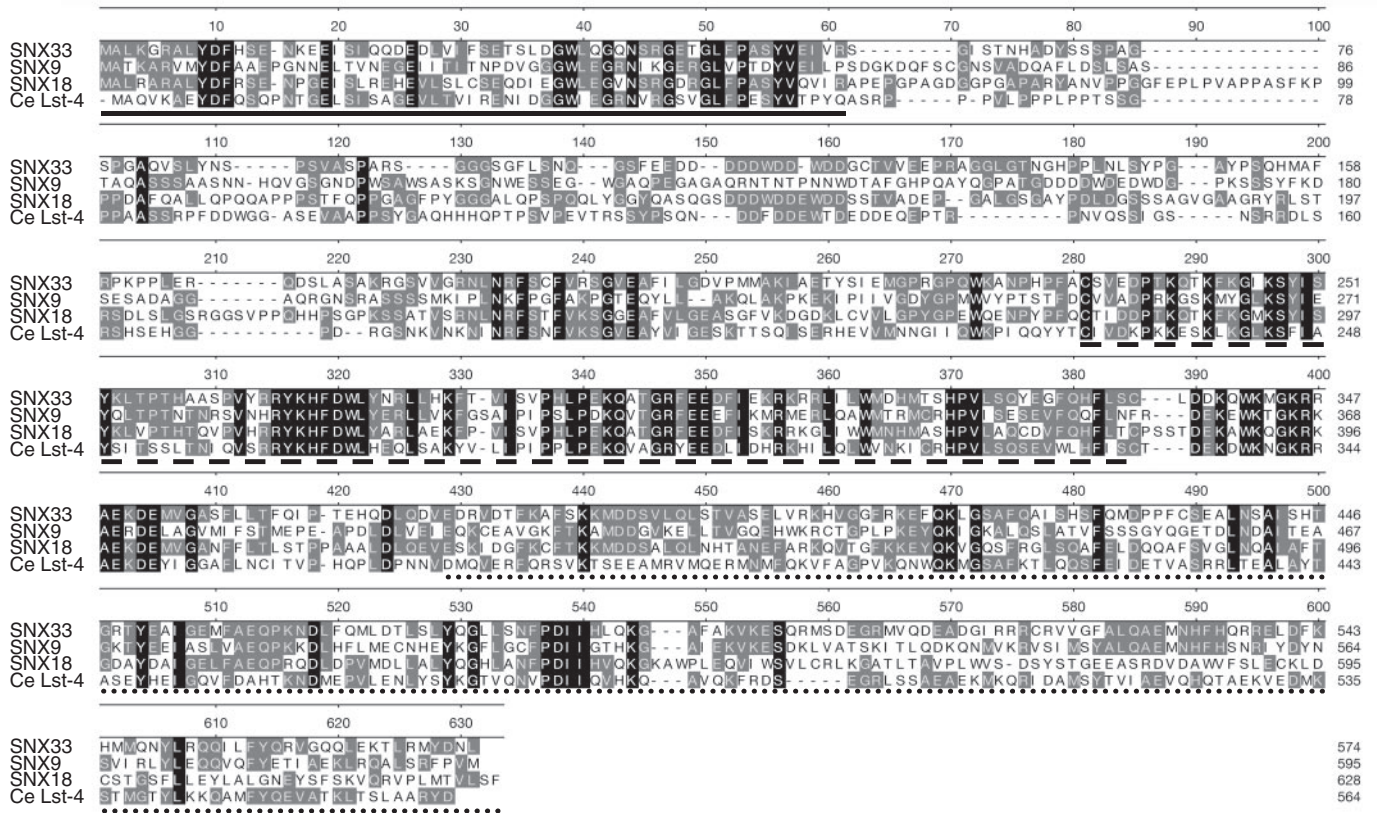


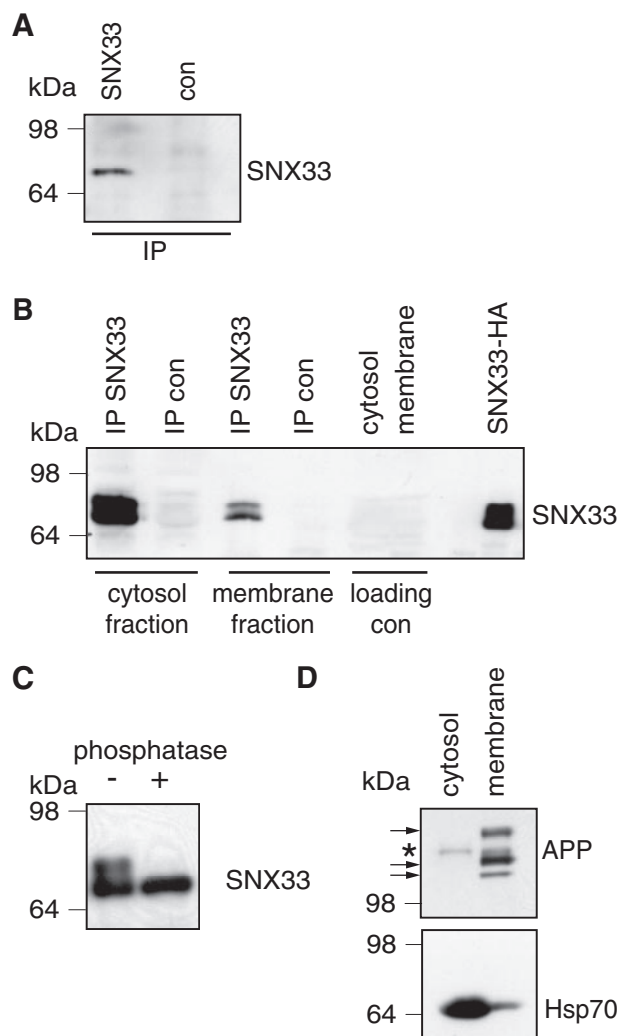
FIGURE 2. **Sequence alignment of SNX33 and its homologs.** Alignment of the protein sequences of human SNX33 (574 amino acids) and its human homologs SNX9 (595 amino acids) and SNX18 (628 amino acids) and of the single *C. elegans* ortholog LST-4 (564 amino acids; splice form Y37A1B.2d). SH3 (continuous line), PX (dashed line), and BAR (dotted line) domains are underlined. SNX33 shares 35.9% identity (49.6% similarity) with SNX9 and 42.6% identity (54.6% similarity) with SNX18. *C. elegans* LST-4 is slightly more homologous to human SNX33 (52.5% similarity) than to SNX9 (48.2% similarity) and SNX18 (48.6% similarity), as determined with the EMBL EMBOSS-Align software tool.

phoprotein. Fractionation of HEK293 or SH-SY5Y cells into membrane fraction and cytosol revealed that SNX33 is found in both fractions (Fig. 3, B and D; shown for HEK293 cells). The partial membrane association of SNX33 is in agreement with the presence of a PX and a BAR domain that are also found in other membrane-associated proteins (43).

**SNX33 Activates  $\alpha$ -Secretase Cleavage of APP**—Next we determined whether SNX33 stimulated APP shedding by increasing  $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase cleavage. SNX33 was transiently transfected into HEK293 cells and retrovirally transduced into HeLa cells and H4 neuroglioma cells expressing endogenous APP. Secreted APP was detected in the conditioned medium using cleavage site-specific antibodies. Antibody W02 detects  $\alpha$ -secretase-cleaved APP (APPs $\alpha$ ) and revealed a strong increase in APP  $\alpha$ -cleavage upon SNX33 transfection into all three cell lines (Fig. 4A). For the HEK293 cells, the increase was 3-fold (Fig. 4B), which agrees well with the 4-fold increase in APP shedding observed in the AP-APP reporter cell line (Fig. 1B). Antibody 192wt specifically detects  $\beta$ -secretase cleaved APPs (APPs $\beta$ ). APPs $\beta$  was slightly increased in HEK293 cells (Fig. 4A; quantification in Fig. 4B) but was not significantly increased in HeLa or H4 cells (not shown). The amount of A $\beta$  derived from the endogenous APP was below the detection limit. Expression of SNX33 did not alter the total amount of APP in the cell lysate. Expression of Dyn K44A in HEK293 cells had the same effect as SNX33. It increased APPs $\alpha$  and did not

have a major effect on APPs $\beta$  (Fig. 4C). A C-terminal HA epitope tag or a fusion to GFP did not alter the effect of SNX33 on APP  $\alpha$ -cleavage (Fig. 4D). The SNX33 homolog SNX9 had a similar effect on APP shedding as SNX33 (Fig. 4D), suggesting that both proteins are functional homologs, at least with regard to APP shedding. Taken together, SNX33 strongly increases APP  $\alpha$ -cleavage but only has a minor effect on APP  $\beta$ -cleavage. The increase in APP  $\alpha$ -shedding required the presence of the SH3 domain of SNX33, because a SNX33 deletion mutant lacking the SH3 domain had largely lost the ability to stimulate APP  $\alpha$ -secretase cleavage (data not shown). To test whether the SH3 domain alone would be sufficient to increase the  $\alpha$ -secretase cleavage, we expressed the SH3 domain or full-length SNX33, both fused to GFP. As expected, full-length SNX33-GFP increased  $\alpha$ -secretase cleavage compared with GFP or mock-transfected cells (Fig. 4E). However, SH3-GFP had largely lost the ability to stimulate  $\alpha$ -secretase cleavage. Taken together, these experiments reveal that the SH3 domain of SNX33 is necessary but not sufficient for the effect on APP shedding. Because the SNX33 homolog SNX9 dimerizes through its C-terminal BAR domain (44), it is possible that SNX33 requires its BAR domain and must be able to dimerize for full activation of APP  $\alpha$ -secretase cleavage. Likewise, SNX9 requires both its SH3 domain and more C-terminal domains to efficiently stimulate the GTPase activity of dynamin (23).

## SNX33 Stimulates APP $\alpha$ -Secretase Cleavage



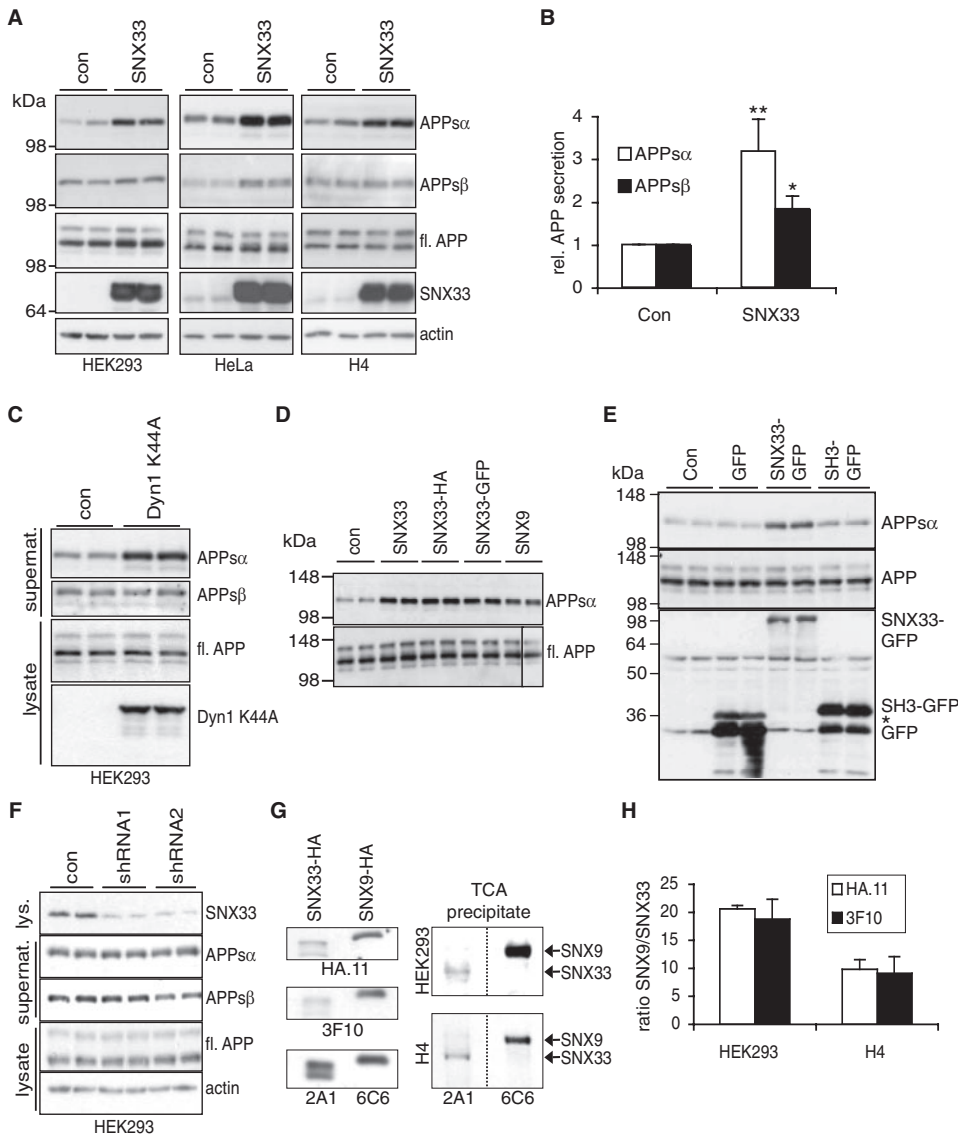
**FIGURE 3. Expression of SNX33.** *A* and *B*, endogenous SNX33 was immunoprecipitated from mouse brain (*A*) or from cytosol and membrane fraction of HEK293 cells (*B*). SNX33 was only detected when immunoprecipitation (IP) was carried out with SNX33-specific (67 in *A*, 2A1 in *B*) but not with a control antiserum (*con*) against an unrelated protein. For immunoblot detection, SNX33 antibody 2A1 was used. Without immunoprecipitation, SNX33 is not detected in directly loaded cytosol and membrane fraction (loading control) (*B*). As a control, cell lysate of SNX33-HA-transfected HEK293 cells (SNX33-HA) was loaded in the *right lane* of *B*. *C*, dephosphorylation of transfected SNX33 immunoprecipitated from HEK293 cells converts the upper protein band to the lower one, indicating that SNX33 is partly phosphorylated. *D*, to test for specificity of cell fractionation, cytosolic and membrane fractions in *B* were reprobed for APP (membrane protein found only in membrane fraction) with antibody 22C11 and Hsp70 (soluble protein, found predominantly in the cytosol fraction). \*, nonspecific background band. The *arrows* indicate mature and immature forms of the two endogenous APP isoforms APP695 and APP751, which differ in their length.

Next, we analyzed how a knockdown of SNX33 affects APP shedding. HEK293 cells with a stable knockdown of SNX33 were generated, using two independent short hairpin RNA sequences. Compared with control cells, no difference in APP shedding was observed in the SNX33 knockdown cells (Fig. 4*F*). This is probably due to the fact that in the absence of SNX33, the homologous SNX9 (and probably also SNX18) is still present. SNX9 was found to be expressed at 10–20 times higher protein levels than SNX33, as determined in HEK293 and neuroglioma H4 cells, respectively (Fig. 4, *G* and *H*).

**SNX33 Expression Reduces Endocytosis of APP and the Uptake of Transferrin**—The mutant DynK44A, which inhibits APP endocytosis (12, 13, 32, 45), had a similar stimulatory effect on APP shedding (Fig. 1*B*) and on APP  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleavage (Fig. 4*C*) as SNX33. Based on this finding, we speculated that SNX33 expression may also inhibit APP endocytosis, leading to increased APP levels at the cell surface, where the  $\alpha$ -secretase cleavage is assumed to take place (46). To test this hypothesis, we used a validated immunofluorescence-based anti-APP antibody uptake assay (32). COS cells were transiently co-transfected with APP and either GFP, as a control, or GFP-tagged SNX33 (SNX33-GFP; Fig. 5*A*). In this assay, APP showed a typical cell surface staining at 0 min (patchy cell surface staining and partly bright rim of the cell; Fig. 5*A*). At later time points, numerous cells showed APP-containing vesicles, which we have previously shown to be EEA1-positive, identifying them as endosomes (32). Transfected cells were identified by their green fluorescence (GFP or SNX33-GFP) and scored as either showing endocytosis (endocytic APP-positive vesicles; Fig. 5*A*) or not showing endocytosis (patchy cell surface APP staining and no endocytic vesicles; Fig. 5*A*). Because not all cells start endocytosis at the same time, around 100 cells at every time point were analyzed and scored. Representative pictures for 0, 7, and 20 min are shown in Fig. 5*A* (quantitative analysis in Fig. 5*B*). At time point 0 min, none of the SNX33- or control-transfected cells showed endocytosis (Fig. 5*B*), as seen by the typical cell surface staining of APP (Fig. 5*A*). At 7 min, nearly 60% of the control cells had endocytosed APP, whereas this was the case for only about 30% of the SNX33-transfected cells, indicating that SNX33 expression lowered the rate of APP endocytosis. At 20 min and at 35 min, APP endocytosis increased in the control and the SNX33-transfected cells. At 35 min, essentially all control cells displayed APP endocytosis, whereas only 50% of the SNX33-transfected cells showed endocytosis at this time point (Fig. 5*B*). This reveals that SNX33 expression does not completely inhibit APP endocytosis but strongly slows down the rate of APP endocytosis. In this transient transfection experiment, some cells expressed only APP and not the GFP-tagged SNX33 (Fig. 5*A*, 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 SNX33-expressing cells still showed cell surface APP staining (at 7 min, *arrows*) or only started to show APP endocytosis (at 20 min, *arrows*).

Consistent with the reduction of APP endocytosis, SNX33 increased APP cell surface levels 2-fold compared with control-transfected cells, as determined by cell surface biotinylation of HEK293 cells (Fig. 5, *C* and *D*). The same effect was observed for expression of the SNX33 homolog SNX9 (not shown). Together, these results indicate that SNX33 increases APP  $\alpha$ -cleavage by reducing APP endocytosis and increasing the availability of APP at the cell surface. Exogenous expression of SNX33 also inhibited the uptake of fluorescently labeled transferrin (Fig. 6*A*; quantification in Fig. 6*B*), which is a measure for the rate of transferrin receptor endocytosis. Both strongly and weakly SNX-GFP-expressing cells showed cell surface staining of transferrin, whereas neighboring cells in the same picture (not expressing SNX33-GFP) or control cells (GFP; not shown)





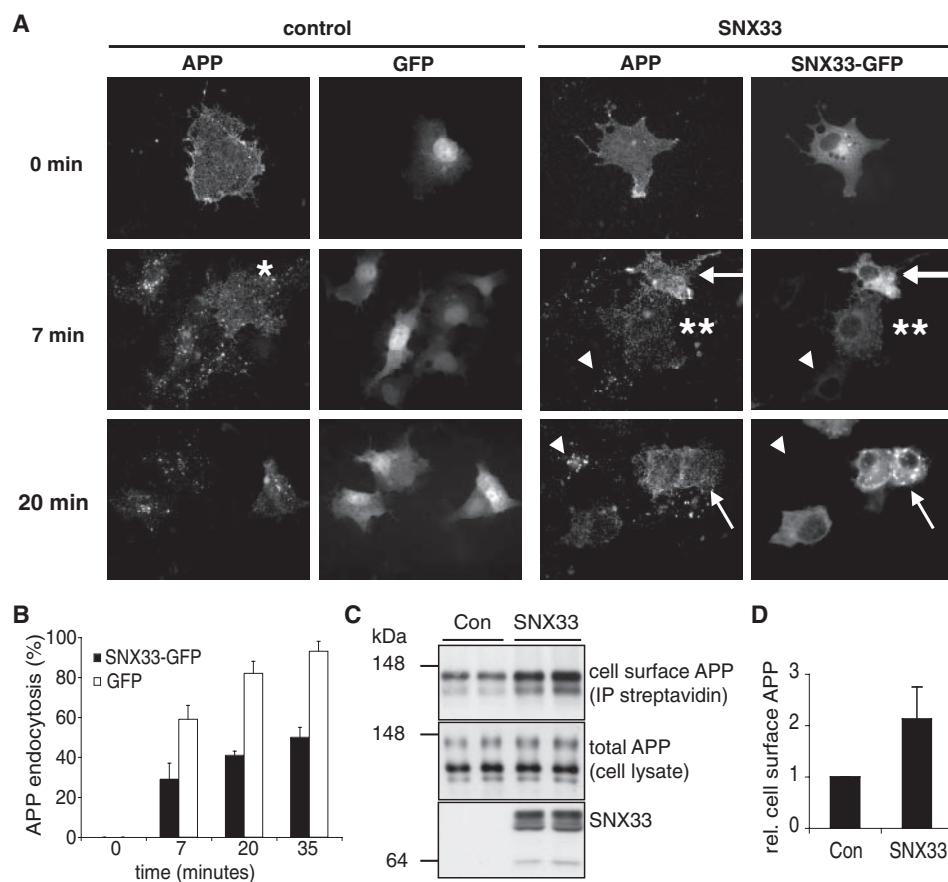
**FIGURE 4. SNX33 increases  $\alpha$ -secretase cleavage of APP.** *A*, HEK293, HeLa, and H4 cells were transiently transfected or transduced with SNX33-HA or with a control vector in duplicates. Aliquots of the conditioned medium and of the cell lysates were analyzed by immunoblot analysis. Soluble APP in the conditioned medium was detected using antibody W02 (detecting APP $\alpha$ ) and antibody 192wt (detecting the  $\beta$ -cleaved APP APPs $\beta$ ) (see Fig. 1A for epitopes). The total amount of APP in the cell lysate was detected using antibody 6687, and expression of the transfected construct was shown using HA antibody. Shown are representative blots of at least three independent experiments. *B*, quantification of the results from HEK293 cells in *A*. Shown are mean and S.D. from four independent experiments, each one carried out in duplicate. Values are relative to the secretion of APP $\alpha$  and APPs $\beta$  in control cells. *C*, experiment as in *A*. Dynamin-1 K44A-HA (Dyn1 K44A) was transfected into HEK293 cells. *D*, C-terminal HA or GFP tags do not alter the stimulatory effect of SNX33 on APP shedding. SNX9 has a similar effect on APP shedding as SNX33. Experiments were carried out as in *A*. APP $\alpha$  and fl. APP were detected with W02 antibody. *E*, the indicated constructs were transfected into HEK293 cells and analyzed as in *A*. The band labeled with an asterisk (lower panel, GFP lanes) is likely to represent a dimer of a GFP degradation product and is only seen upon long exposure. *F*, HEK293 cells stably transfected with pSuper vector or pSuper vector carrying short hairpin RNAs against SNX33 were analyzed as in *A* for APP shedding. *G*, determination of the protein expression level of SNX9 relative to SNX33 in HEK293 and neuroglioma H4 cells. Antibodies used for blotting are shown below the panels. Left panels, comparison of the sensitivities of the antibodies. C-terminally HA-tagged SNX33 and SNX9 were transiently expressed in HEK293 cells. Identical aliquots of cell lysate were analyzed with two different anti-HA tag antibodies (HA.11 and 3F10) or with antibodies specific for SNX33 (2A1) and SNX9 (6C6). Band intensities of 2A1 and 6C6 were normalized for band intensities of the HA-antibodies; antibody 2A1 gives a 2-fold higher band intensity than 6C6 (2.0-fold when normalized to HA.11 and 1.8-fold when normalized to 3F10). Right, trichloroacetic acid (TCA) precipitation and detection of endogenous SNX33 and SNX9 from HEK293 and H4 cells. Samples were resolved on a 10% urea gel and immunoblotted with antibody 2A1 (SNX33) or 6C6 (SNX9). Dotted vertical lines indicate that samples were run on the same gel but detected with the indicated different primary antibodies. *H*, quantification of results from *G*. Band intensities of 2A1 and 6C6 signals of trichloroacetic acid precipitations were quantified and corrected for the fact that 2A1 gives a 2-fold stronger signal than 6C6 (see *F*; normalized to the two different HA-antibodies). Ratios of corrected 6C6/2A1 were determined. Shown is the amount of endogenous SNX9 compared with endogenous SNX33 protein levels (10–20 times more SNX9 than SNX33). Shown are mean and S.D. of three independent experiments.

clearly accumulated transferrin in intracellular vesicles (Fig. 6A). Together, these experiments show that SNX33 can influence the endosomal trafficking of cell surface proteins. Additionally, the experiments reveal that SNX33 expression results in a more general inhibition of endocytosis and mimics a dynamin loss-of-function phenotype similar to the DynK44A mutant.

**SNX33 Binds to Dynamin**—SNX33 may bind and inhibit endogenous proteins involved in endocytosis, thereby causing the reduction of APP endocytosis and the dynamin loss-of-function phenotype. Such a binding partner of SNX33 could be dynamin itself, which is supported by three findings. First, SNX33 co-immunoprecipitated with dynamin-1 but not with the unrelated protein, protein kinase  $\alpha$  (as a control for specificity), from transfected HEK293 cells (Fig. 7A). This interaction required the SNX33 SH3 domain, because a SNX33 SH3 deletion mutant showed no interaction with dynamin (Fig. 7A). This is consistent with the fact that additional proteins containing a SH3 domain also bind to dynamin (47). Second, a fusion protein consisting of GST and the SH3 domain of SNX33 interacted with endogenous dynamin-2, as determined in a pull-down experiment using HEK293 cell lysates (Fig. 7B). Third, co-transfection of SNX33 together with wild-type dynamin-1, which does not affect APP endocytosis (Fig. 1B), largely rescued the SNX33 effect on APP shedding (Fig. 7C). Together, these experiments indicate that SNX33 inhibits APP endocytosis by inhibiting dynamin function.

**Transgenic Expression of SNX33 in *C. elegans* Induces a Dynamin Loss-of-function Phenotype**—A dynamin loss-of-function phenotype was also observed *in vivo* using *C. elegans*, which has only one ortholog of SNX33, SNX9, and SNX18 termed *lst-4* (Fig. 2) (48). Transgenic animals were generated,

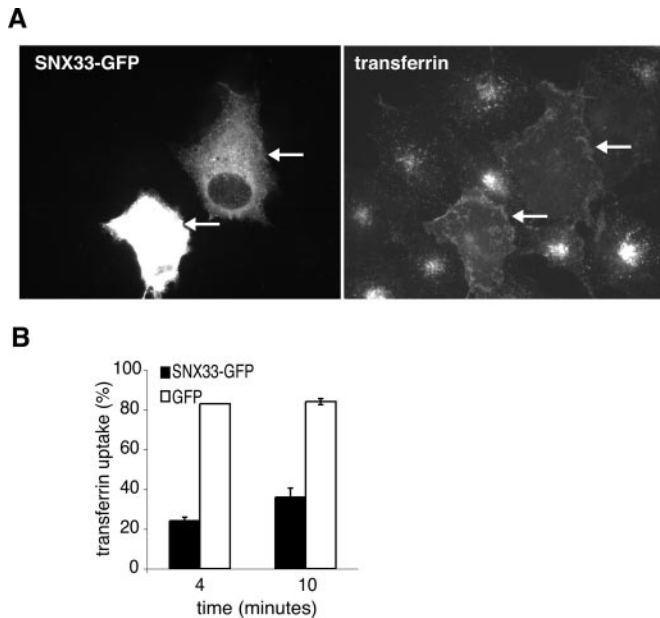
## SNX33 Stimulates APP $\alpha$ -Secretase Cleavage



**FIGURE 5. SNX33 inhibits APP endocytosis.** *A* and *B*, COS cells were transiently co-transfected with APP and either SNX33-GFP or GFP as a control. Cells were incubated on ice (inhibition of endocytosis) with the polyclonal antibody 5313 against the extracellular domain of APP, washed, and returned to 37 °C (allowing endocytosis). After the indicated time points at 37 °C, cells were fixed, permeabilized, and stained with a fluorescently labeled secondary antibody against the primary anti-APP antibody. Cells were analyzed by fluorescence microscopy. *A*, first and third columns, fluorescence of APP or SNX33-GFP. Top row, At time point 0 min, cells showed patchy cell surface staining of APP. Second and third rows (7 and 20 min), SNX33-GFP-expressing cells showed reduced levels of APP endocytosis in comparison with GFP-expressing cells. The GFP tag does not interfere with SNX33 function, as measured by its effect on APP  $\alpha$ -cleavage (see Fig. 3B). The arrows point to cells that express SNX33 and show APP cell surface staining (no endocytosis). The arrowheads point to cells from the same transient transfection that express APP but no detectable SNX33; these cells showed endocytosis similar to the control cells. Note that at 7 min, the cells labeled with single and double asterisks have just started undergoing APP endocytosis (APP-positive vesicles and additionally remaining APP cell surface staining can be seen). Shown are representative pictures of three independent experiments. *B*, around 100 cells expressing GFP or SNX33-GFP were analyzed at every time point and scored as showing or not showing APP endocytosis. Given are the mean and the S.D. of three independent experiments. Cells were counted under blind conditions. *C*, cell surface biotinylation assay. HEK293 cells were transiently transfected with the indicated constructs. Endogenous cell surface APP was biotinylated, immunoprecipitated (IP), and detected by immunoblot using APP antibody 6687. Expression of SNX33 was detected using HA antibody. *D*, quantification of the blot from 5C. Mean and S.D. of three independent experiments are shown, each one carried out in duplicate.

which express GFP-tagged *lst-4* cDNA (*Ex[*lst-4::gfp*]*) under the control of a 2.4-kb *lst-4* upstream regulatory sequence. Remarkably, only few out of 200 injected animals survived and developed like wild-type worms, having normal brood size at 20 °C. This indicates that exogenous *lst-4* expression interfered with viability and development of *C. elegans*, as is expected for a protein inhibiting endocytosis. Nevertheless, two stable transgenic lines (*Ex[*lst-4::gfp*]* lines 1 and 2) could be established, which again showed severely reduced brood size compared with wild-type animals (data not shown). Next, we compared the development of the two surviving transgenic lines with wild-type animals and with animals carrying a temperature-sensitive loss-of-function mutation in the single *C. elegans*

dynamain gene (*dyn-1(ky51)*) (49). Fertilized *C. elegans* eggs develop through four larval stages (L1, L2, L3, and L4) to adulthood. Eggs were laid at 15 °C and then moved to 26 °C, which is the restrictive temperature for the dynamain mutant animals. After 2 days of development, essentially all wild-type worms had developed normally and were found either in adulthood or in L4 larval stage (99.9%; Table 1 and Fig. 8A). In contrast, dynamain mutant animals showed a severe developmental phenotype at this restrictive temperature. Only a few animals (1.4%) developed normally, whereas most animals (76%) arrested at L1 or L2, and only 13.9% reached the L3 larval stage (Table 1), in agreement with a previous report (49). The L1/L2-arrested and L3 larval animals had thin and clear bodies compared with wild-type animals, sometimes accompanied by deformed body regions (Fig. 8B). Furthermore, ~9% of the progeny died during embryogenesis, which is in line with a previous publication (49). The two surviving transgenic *lst-4* lines showed a phenotype resembling the phenotype induced by mutation of the dynamain gene *dyn-1*. In detail, 15.4% of the surviving *Ex[*lst-4::gfp*]* worms (line 1) arrested at L1/L2 and 18.4% reached the L3 larval stage. This distribution was accompanied by phenotypic changes, which were very similar to the changes observed in the surviving dynamain mutant animals, such as deformed bodies appearing lumpy, especially in head and tail regions (Table 1 and Fig. 8C). Larvae with extensively deformed bodies died after 72 h at 26 °C. Transgenic line 2 gave similar results as line 1 (Table 1 and Fig. 8D). Moreover, the transgenic *lst-4* and the *dyn-1(ky51)* mutant animals showed a similar reduction of life span (life span for *Ex[*lst-4::gfp*]* was  $10.7 \pm 0.2$  days ( $n = 100$ ), and life span for *dyn-1(ky51)* was  $9.9 \pm 0.3$  days ( $n = 58$ )) compared with wild-type animals ( $13.6 \pm 0.4$  days ( $n = 50$ )), which is a life span reduction of ~21 and ~27%, respectively. To further elucidate the functional interaction of the two proteins DYN-1 and LST-4, *dyn-1*-overexpressing animals (*Ex[dyn-1a/b::gfp]*; see Ref. 50) were crossed into *Ex[*lst-4::gfp*]* and phenotypically analyzed at 26 °C. Indeed, overexpression of *dyn-1* could rescue the developmental defects of the *Ex[*lst-4::gfp*]* animals almost com-



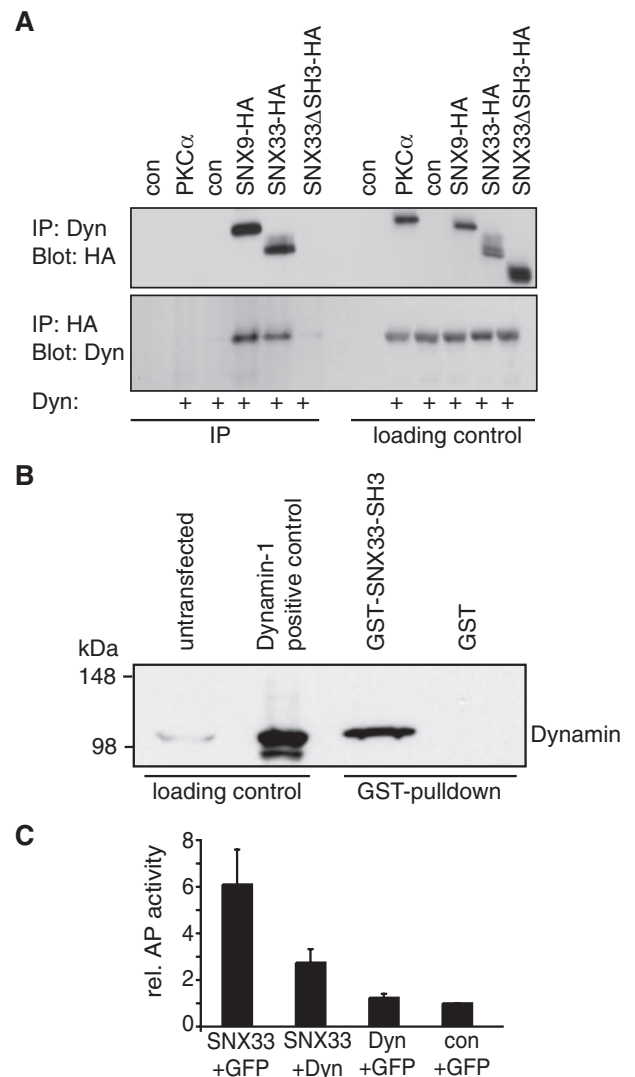
**FIGURE 6. SNX33 inhibits uptake of transferrin.** *A* and *B*, COS cells were transiently transfected with SNX33-GFP or GFP as a control. Cells were incubated with Alexa555-Fluor-coupled transferrin. Cells were returned for 4 or 10 min to 37 °C, fixed, and analyzed by fluorescence microscopy. Shown are SNX33-GFP-transfected cells at the 10 min time point. *Left*, GFP fluorescence; *right*, transferrin. The *arrows* mark cells that express SNX33-GFP and do not show endocytosis at this time point. Nontransfected cells (expressing endogenous transferrin receptor) show transferrin uptake (endocytic vesicles). Around 100 cells expressing SNX33-GFP (black bars) or GFP (white bars) were analyzed for every time point and scored as showing transferrin uptake or not. The *graph* shows the mean of three independent experiments.

pletely (Table 1). Taken together, the low number of surviving transgenic *lst-4* animals as well as the analyses of development and life span show that the *Ex[lst-4::gfp]* phenotype is similar to the phenotype of *dyn-1(ky51)* mutant animals. Moreover, our results show that the phenotype can be rescued by overexpression of wild-type *dyn-1a/b::gfp*. This indicates that overexpression of *lst-4* results in a phenotype very similar to a dynamin loss-of-function phenotype in *C. elegans*, demonstrating the functional interaction between these two proteins.

**DISCUSSION**

Changes in endocytic trafficking can modulate APP shedding by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase and are associated with early neuropathological changes observed in AD brain (15). However, the detailed mechanisms controlling APP endocytosis and the availability of APP to both secretases are only partly understood. Here, we identified the novel SNX33 as a new protein involved in endocytosis and showed that it modulates APP endocytosis and shedding. SNX33 inhibited dynamin function, resulting in decreased APP endocytosis and increased APP cell surface levels, where it underwent enhanced cleavage by  $\alpha$ -secretase, which mainly cleaves at the plasma membrane (46).

The cellular regulation of APP  $\alpha$ -secretase cleavage is of great interest, because  $\alpha$ -secretase cleaves within the A $\beta$  domain and reduces the amount of APP available for  $\beta$ -secretase cleavage and A $\beta$  generation. Additionally,  $\alpha$ -secretase cleavage generates a large soluble APP ectodomain (APPs $\alpha$ ), which has neuroprotective and neurotrophic properties (6–8). Moreover, APPs $\alpha$  seems to mediate the physiological functions



**FIGURE 7. SNX33 co-immunoprecipitates with dynamin.** *A*, HEK293 cells were transiently co-transfected with dynamin-1 and the indicated constructs. SNX33 as well as SNX9 co-immunoprecipitate with dynamin-1, whereas the deletion mutant SNX33- $\Delta$ SH3 does not. An empty control vector (*con*) and the transfection of protein kinase C $\alpha$  were used as a control for specificity. Immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblot using the indicated antibodies. *IP*, immunoprecipitation with the indicated antibody; *loading control*, aliquots of the cell lysates were directly loaded. *B*, a fusion protein of GST and the SNX33 SH3 domain but not GST alone pulls down endogenous dynamin-2 from HEK293 cell lysates. As a control, cell extracts from untransfected (weak band of endogenous dynamin-2) or dynamin-1-transfected HEK293 cells were loaded. *C*, co-expression of wild-type dynamin-1 (*Dyn*) reduces the shedding-enhancing effect of SNX33. Human embryonic kidney cells stably expressing alkaline phosphatase-tagged APP were transiently co-transfected with the indicated constructs. AP activity in the conditioned medium was measured relative to control-transfected cells (with empty control vector (*con*) and GFP). Shown are the mean and S.D. of three independent experiments.

of the APP protein, because APPs $\alpha$  largely rescues the deficits observed in APP knock-out mice (51).

$\alpha$ -Secretase cleavage of APP and secretion of APPs $\alpha$  can be strongly enhanced by different stimuli (9), but the underlying molecular and cellular mechanisms are largely unknown. For the proteins identified in this screen and in a previous one (31), we found that the strongest increase in  $\alpha$ -secretase cleavage was observed for proteins, which reduced the rate of APP endocytosis. This suggests that the rate of APP endocytosis is a cen-



## SNX33 Stimulates APP $\alpha$ -Secretase Cleavage

**TABLE 1**

Comparison of *Ce Ist-4* transgenic and dynamin mutant animals

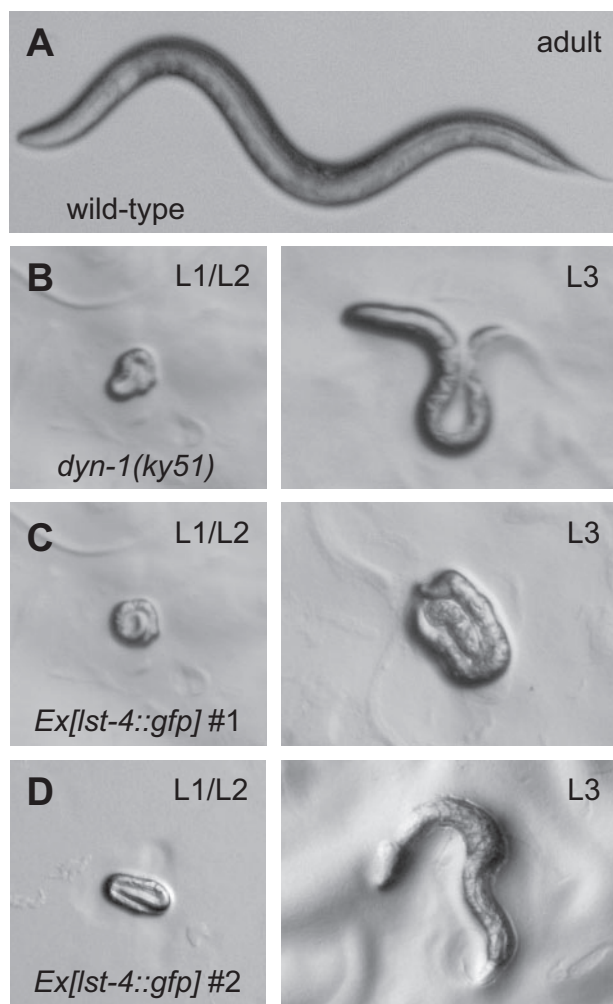
Strain	Phenotype of progeny at 26 °C				
	L4 larvae and adult	L3 larvae	L1/L2 arrest	Dead eggs	No. <sup>a</sup>
Wild type	% 99.9	% 0	% 0	% 0.1	1013
<i>Ex[ist-4::gfp]</i> line1	63.2	18.4	15.4	3.0	749
<i>Ex[ist-4::gfp]</i> line2	71.0	6.6	11.0	11.4	977
<i>dyn-1(ky51)</i>	1.4	13.9	76.0	8.7	840
<i>Ex[dyn-1a/b::gfp]<sup>b</sup></i>	98.6	0.4	0.7	0.3 <sup>c</sup>	790
<i>Ex[dyn-1a/b::gfp; ist-4::gfp]<sup>d</sup></i>	94.6	1.1	1.0	3.3 <sup>c</sup>	807

<sup>a</sup> Total number of animals scored after 48 h.

<sup>b</sup> ZH301 *unc-76(e911); enEx38*; see Ref. 50.

<sup>c</sup> The genotype of the dead eggs is different depending on the presence/absence of the extrachromosomal arrays.

<sup>d</sup> To generate BR4825, *Ex[ist-4::gfp]* line1 was crossed into ZH301.



**FIGURE 8. Phenotypic analysis of dynamin mutant and *Ist-4* transgenic *C. elegans*.** Shown are representative images of the following four different *C. elegans* strains. *A*, wild-type adult animal. *B*, L1/L2 larva (left) and L3 larva (right) of *dyn-1(ky51)* mutant. *C*, L1/L2 larva (left) and L3 larva (right) of transgenic *Ex[ist-4::gfp]* line 1. *D*, L1/L2 larva (left) and L3 larva (right) of transgenic *Ex[ist-4::gfp]* line 2. For phenotypic analysis (see also Table 1), worms were allowed to lay eggs for 2 h at 15 °C before being removed. Eggs were shifted to 26 °C, incubated for 48 h, and analyzed using a Zeiss Imager.Z1. Images were collected with an Olympus Camedia C-5060 microscope. The same magnifications were used for all images.

tral factor determining how much APP is available for  $\alpha$ -secretase cleavage. SNX33 and Dyn $\Delta$ NT (this study), endophilin A3 (31), and the APP homolog APLP1 (32) increased APP  $\alpha$ -secretase cleavage more than 4-fold, whereas expression of the  $\alpha$ -secretase

ADAM10 or of different kinases, such as protein kinase A or a constitutively active form of MEKK2 increased APP shedding 2-fold at most (31). The only other protein identified that strongly increased APP shedding was the  $\beta$ -secretase BACE1 (this study), which increases APP shedding 6-fold (31), but this was due to an increase in  $\beta$ -secretase and not in  $\alpha$ -secretase cleavage. The identified proteins reduced APP endocytosis through different molecular mechanisms but increased APP  $\alpha$ -secretase cleavage to a similar extent. SNX33, endophilin A3, and Dyn $\Delta$ NT reduced general dynamin-dependent endocytosis, including that of APP. In contrast, APLP1 selectively inhibited APP endocytosis by reducing complex formation between APP, FE65, and LRP (32). Formation of this complex is required for the normal rate of APP endocytosis. Two previous studies used the well characterized dominant-negative dynamin-1 K44A mutant and also reported an increase in APP  $\alpha$ -secretase cleavage (12, 13). The only study that did not report an increase in APP  $\alpha$ -secretase cleavage upon dynamin K44A expression did not use wild-type APP but rather the Swedish mutant APP (45), which is known to be mainly cleaved in the secretory pathway and seems to depend to a different extent on endocytosis for its  $\beta$ -secretase cleavage compared with wild-type APP (52). Together, these data show that the rate of APP endocytosis is a major control factor for the amount of APP  $\alpha$ -secretase cleavage. Moreover, our results show that not only dynamin but also other endocytic proteins, such as SNX33, can contribute to the modulation of APP endocytosis and  $\alpha$ -secretase cleavage.

For  $\beta$ -secretase cleavage, the consequences of a reduction of APP endocytosis are less clear than for  $\alpha$ -secretase, and conflicting results have been reported previously (12, 13).  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase are assumed to compete for the shedding of APP, suggesting that an increased shedding by  $\alpha$ -secretase is accompanied by a reduction in  $\beta$ -secretase cleavage, and *vice versa*. Surprisingly, we found that this is not always the case. Looking at endogenous APP in HEK293 cells we found that both SNX33 and Dyn K44A increased  $\alpha$ -secretase but did not affect or even modestly increase  $\beta$ -secretase cleavage. Similar results for SNX33 were obtained in HeLa and H4 cells. Likewise, one of the previous studies, which analyzed shedding of endogenous APP in HeLa cells, found that Dyn K44A increased APP  $\alpha$ -cleavage. APP  $\beta$ -cleavage was also enhanced, although to a lower extent than  $\alpha$ -cleavage (13). Together, these findings reveal that a general inhibition of endocytosis strongly increases APP  $\alpha$ -secretase cleavage and mildly increases APP  $\beta$ -secretase cleavage, at least for endogenous APP.

Endocytosis requires the orchestration of different regulatory proteins in a time- and space-dependent manner and is a highly regulated process (16–18). Although several regulators of endocytic trafficking, such as dynamin and Rab5, are known, not all molecular mechanisms and proteins controlling endocytosis have been identified. Our study reveals that SNX33 is a novel protein involved in endocytic trafficking, thus expanding the number of proteins contributing to this process. SNX33 is a new binding partner of dynamin, which is a key component of endocytosis (16). Dynamin is also involved in synaptic vesicle recycling, and loss-of-function mutations in the ubiquitously expressed dynamin-2 causes specific forms of the Charcot-Marie-Tooth disease type 2 neuropathy (53, 54). SNX33 expression induced a dynamin loss-of-function phenotype in cultured cells, where we observed an inhibition of APP endocytosis and also of transferrin uptake, suggesting a broader role for SNX33 in dynamin-dependent endocytosis. This is further supported by the *in vivo* experiments in *C. elegans*, where the SNX33 ortholog *lst-4* induced a dynamin loss-of-function phenotype. The interaction between SNX33 and dynamin requires the SH3 domain of SNX33, which most likely binds to the proline-rich domain of dynamin. Other SH3 domain-containing proteins also bind to this domain in dynamin, and these proteins are involved in different steps of endocytosis (47). Thus, it seems likely that an increase in SNX33 expression, for example by transgenic expression, partly prevents dynamin from the other protein interactions required for efficient endocytosis, resulting in a dynamin loss-of-function phenotype. Interestingly, a similar situation may occur *in vivo*. In *C. elegans*, expression of the SNX33 ortholog *lst-4* can be strongly increased during development of vulva precursor cells (48). If a similar regulation of expression holds true for human SNX33 or its homologs, this would be expected to alter APP endocytosis and shedding.

SNX9 has the same domain structure as SNX33 but has only 50% similarity in the amino acid sequence. Nevertheless, we found SNX9 to have a similar effect on APP shedding and APP cell surface levels as SNX33. Moreover, SNX9 is also involved in endocytic trafficking. SNX9 binds dynamin (22, 23) and other proteins involved in endocytosis, such as synaptojanin and the actin-remodeling proteins WASP and N-WASP (40–42). SNX9 is involved in transferrin uptake (23) and in membrane localization of dynamin (39) and modulates N-WASP-dependent actin assembly in different forms of endocytosis (42). Additionally, SNX9 transfection blocks synaptic vesicle endocytosis in neurons (55). SNX33 and SNX9 have a third distant homolog, called SNX18, which has not yet been characterized. Potentially, these three SNXs constitute a subgroup of the SNX family with a function in endocytosis.

In summary, our study identifies SNX33 as a new endocytic protein, which modulates APP endocytosis and APP  $\alpha$ -secretase cleavage, and demonstrates that APP endocytosis is a major control factor for APP  $\alpha$ -secretase cleavage.

*Acknowledgments*—We thank Suzanne Pfeffer for helpful comments on the manuscript and Katrin Moschke and Anne Oelmann for excellent technical help.

## REFERENCES

- Selkoe, D. J., and Schenk, D. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545–584
- Citron, M. (2004) *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 92–97
- Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003) *J. Neurosci. Res.* **74**, 342–352
- Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W., and Lee, V. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 2568–2575
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M., and Mattson, M. P. (1996) *J. Neurochem.* **67**, 1882–1896
- Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., and Ungerer, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12683–12688
- Stein, T. D., Anders, N. J., DeCarli, C., Chan, S. L., Mattson, M. P., and Johnson, J. A. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 7707–7717
- Huovila, A. P., Turner, A. J., Pelto-Huikko, M., Karkkainen, I., and Ortiz, R. M. (2005) *Trends Biochem. Sci.* **30**, 413–422
- Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17386–17389
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3021–3024
- Carey, R. M., Balcz, B. A., Lopez-Coviella, I., and Slack, B. E. (2005) *BMC Cell Biol.* **6**, 30
- Chyung, J. H., and Selkoe, D. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 51035–51043
- 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) *J. Biol. Chem.* **278**, 31261–31268
- Nixon, R. A. (2005) *Neurobiol. Aging* **26**, 373–382
- Le Roy, C., and Wrana, J. L. (2005) *Nat. Rev.* **6**, 112–126
- Mayor, S., and Pagano, R. E. (2007) *Nat. Rev.* **8**, 603–612
- Zerial, M., and McBride, H. (2001) *Nat. Rev.* **2**, 107–117
- Worby, C. A., and Dixon, J. E. (2002) *Nat. Rev.* **3**, 919–931
- Carlton, J., Bujny, M., Rutherford, A., and Cullen, P. (2005) *Traffic* **6**, 75–82
- Teasdale, R. D., Loci, D., Houghton, F., Karlsson, L., and Gleeson, P. A. (2001) *Biochem. J.* **358**, 7–16
- Lundmark, R., and Carlsson, S. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46772–46781
- Soulet, F., Yarar, D., Leonard, M., and Schmid, S. L. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 2058–2067
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fechteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zeffass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22908–22914
- Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A. K., Lichtenthaler, S. F., and Haass, C. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 620–625
- Lichtenthaler, S. F., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1997) *Biochemistry* **36**, 15396–15403
- 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
- Lichtenthaler, S. F. (2006) *Neurodegener. Dis.* **3**, 262–269
- Kuhn, P. H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S. F. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 11982–11995
- Schobel, S., Neumann, S., Seed, B., and Lichtenthaler, S. F. (2006) *Int. J. Dev. Neurosci.* **24**, 141–148
- Neumann, S., Schobel, S., Jager, S., Trautwein, A., Haass, C., Pietrzik, C. U., and Lichtenthaler, S. F. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 7583–7594
- Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991) *EMBO J.* **10**, 3959–3970
- 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) *Science* **286**, 735–741
- Herskovits, J. S., Burgess, C. C., Obar, R. A., and Vallee, R. B. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 565–578

## SNX33 Stimulates APP $\alpha$ -Secretase Cleavage

36. Seet, L. F., and Hong, W. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 878–896
37. Smalley, D. M., and Ley, K. (2005) *J. Cell Mol. Med.* **9**, 255–266
38. 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., 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) *Science* **282**, 1281–1284
39. Lundmark, R., and Carlsson, S. R. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42694–42702
40. Badour, K., McGavin, M. K., Zhang, J., Freeman, S., Vieira, C., Filipp, D., Julius, M., Mills, G. B., and Siminovitch, K. A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1593–1598
41. Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Clemens, J. C., Kruger, R. P., Muda, M., and Dixon, J. E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 41782–41789
42. Yarar, D., Waterman-Storer, C. M., and Schmid, S. L. (2007) *Dev. Cell* **13**, 43–56
43. Dawson, J. C., Legg, J. A., and Machesky, L. M. (2006) *Trends Cell Biol.* **16**, 493–498
44. Childress, C., Lin, Q., and Yang, W. (2006) *Biochem. J.* **394**, 693–698
45. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003) *J. Cell Biol.* **160**, 113–123
46. Sisodia, S. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6075–6079
47. Hinshaw, J. E. (2000) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 483–519
48. Yoo, A. S., Bais, C., and Greenwald, I. (2004) *Science* **303**, 663–666
49. Clark, S. G., Shurland, D. L., Meyerowitz, E. M., Bargmann, C. I., and van der Bliek, A. M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10438–10443
50. Yu, X., Odera, S., Chuang, C. H., Lu, N., and Zhou, Z. (2006) *Dev. Cell* **10**, 743–757
51. Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfer, D. P., and Muller, U. C. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 7817–7826
52. Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J. (1995) *Nat. Med.* **1**, 1291–1296
53. Fabrizi, G. M., Ferrarini, M., Cavallaro, T., Cabrini, I., Cerini, R., Bertolasi, L., and Rizzuto, N. (2007) *Neurology* **69**, 291–295
54. Zuchner, S., Noureddine, M., Kennerson, M., Verhoeven, K., Claeys, K., De Jonghe, P., Merory, J., Oliveira, S. A., Speer, M. C., Stenger, J. E., Walizada, G., Zhu, D., Pericak-Vance, M. A., Nicholson, G., Timmerman, V., and Vance, J. M. (2005) *Nat. Genet.* **37**, 289–294
55. Shin, N., Lee, S., Ahn, N., Kim, S. A., Ahn, S. G., Park, Z. Y., and Chang, S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 28939–28950