

The intracellular domain of the Amyloid Precursor Protein (APP) translocates to the nucleus and regulates transcription

Doctoral Thesis

Author(s):

Rotz, Ruth Cécile von

Publication date:

2005

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004941650>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

The intracellular domain of the Amyloid Precursor Protein (APP) translocates to the nucleus and regulates transcription

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of a
Doctor of Sciences

presented by

Ruth Cécile von Rotz
Diploma in Natural Sciences ETH

born 17.09.1975

Citizen of Kerns, Obwalden

accepted on the recommendation of

Prof. Martin Schwab, examiner
Prof. Ulrich Suter, co-examiner
Prof. Roger M. Nitsch, co-examiner
Dr. Uwe Konietzko, co-examiner

Summary

Alzheimer's Disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly. Clinically it is characterized by progressive loss of memory and other cognitive functions. The cognitive decline is associated histopathologically with neuronal cell loss, as well as with the accumulation in the brain parenchyma of abnormal proteins in the forms of extracellular β -amyloid plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFT) which are composed of hyperphosphorylated tau protein. The major proteinaceous constituent of β -amyloid aggregates is the $A\beta$ peptide. A large body of genetic and cell biological evidence strongly argues for a pathogenic role for $A\beta$, even in the formation of the NFT.

$A\beta$ is generated by proteolytic cleavage of the β -amyloid precursor protein (APP).

APP is a single-pass type 1 transmembrane protein. Successive proteolytic processing with ectodomain shedding followed by intramembrane cleavage occurs in two different pathways: The amyloidogenic pathway employs cleavage by β - and γ -secretase and generates the $A\beta$ peptide, whereas the non-amyloidogenic pathway uses the α -secretase site and thereby precludes $A\beta$ formation. Both pathways liberate the APP intracellular domain (AICD) from the membrane by proteolytic processing at the γ -secretase site.

AICD was described only recently, probably because of its rapid degradation after release from the membrane into the cytoplasm, partly mediated by the insulin degrading enzyme (IDE). The analogy of APP processing to Notch receptor signaling as well as the emerging concept of γ -secretase-regulated intramembrane proteolysis, which results in transcriptionally active cytoplasmic fragments, suggests a possible function for AICD in nuclear signaling. When APP and AICD were fused to the yeast Gal4 transcription factor DNA-binding domain, this caused a transactivation that was dependent on two proteins: The adaptor protein Fe65 which interacts with the YENPTY-motif of AICD and Tip60, a nuclear histone acetyl transferase. However, in transient transfection assays, it could not be excluded that transcription from the reporter constructs also occurred in the cytosol.

To characterize the role of the APP adaptor proteins Fe65, Jip1b, X11 α (Mint1) and the chromatin-associated protein Tip60, expression vectors were transfected into Hek293 cells which expressed fluorescently tagged AICD. Interactions of the transfected proteins with AICD were analyzed by confocal microscopy and co-immunoprecipitation. We found that Fe65 bound AICD and transported it to nuclei where they docked onto Tip60. The formed AICD/Fe65/Tip60 (AFT)-complexes were concentrated in spherical nuclear spots. When γ -secretase inhibitors were used, these prevented AFT-complex formation with AICD derived from full-length APP. The adaptor protein Jip1b also transported AICD to nuclei and docked it to Tip60, but the AICD/Jip1b/Tip60 (AJT)-complexes had a different, speckle-like morphology. In contrast to Fe65 and Jip1b, X11 α trapped AICD in the cytoplasm. We were able to confirm the formation of AFT-complexes in spherical nuclear spots and AJT-complexes localized to nuclear speckles in differentiated human neuroblastoma cells. In addition, AFT-complexes were also formed in differentiated adult rat progenitor cells. Together, these data suggest that APP has functions in nuclear signaling.

We compared transcript levels of selected genes in mRNA populations isolated from a clonal Hek293 cell line without AICD expression, to mRNA from Hek293 cells induced for AICD expression, by quantitative real-time PCR. There, we were not only able to identify the APP effector genes *APP*, *BACE* and *Tip60* but we also confirmed the reported effectors *GSK3 β* and *KAI1* as transcriptional targets. In contrast, AICD

expression had no effect on the expression of the Notch-effector gene Hes1. Subsequent Western blotting revealed no alteration in levels of full-length APP but an increased turnover resulting in increased steady state levels of α - and β -stubs. Therefore, AICD has an effect on APP turnover and is involved in feed-back regulation to replenish APP pools. Blocking AICD generation by γ -secretase inhibitors resulted in decreased APP levels while accumulating the substrates for γ -secretase (α -/ β -stubs). Together, they show congruency between rises in AICD levels and APP induction and drops of AICD and APP. For the β -secretase BACE, after initial upregulation of the protein a down-regulation to baseline was found, whereas inhibition of γ -secretase resulted in diminishing BACE protein levels.

Our data clearly showed the nuclear translocation of AICD with resulting changes in gene expression. We performed a transcriptomic screening with Affymetrix GeneChips to compare naïve Hek293 cells and our clonal Hek293 cell line, with and without induced AICD expression. This led to the identification of six differentially regulated genes. Quantitative PCR verified induced transcript levels for phosphorylase kinase 1, transcription elongation factor A, prolactin receptor and a transcript with unknown function located to Chr13ORF18. For these genes *in vitro* and *in vivo* relevance has to be shown, as well as their role in AICD-dependent transcriptional regulation.

Together, our data establish a role for APP in nuclear signaling which is dependent on γ -secretase processing and adaptor proteins binding to AICD. They suggest that therapeutic interventions in AD designed to modulate the cleavage of APP may affect AICD-dependent signaling.

Zusammenfassung

Die Alzheimer'sche Krankheit ist die häufigste Form der senilen Demenz. Klinisch gesehen ist sie durch einen fortschreitenden Verlust der Gedächtnis- und anderer kognitiven Funktionen gekennzeichnet. Der kognitive Verfall ist aus histopathologischer Sicht mit neuronalem Zellverlust sowie einer Ablagerung von abnormal gefalteten Proteinen im Gehirn verbunden. Diese liegen einerseits als extra-zelluläre amyloide Ablagerungen (β -Amyloid Plaques) und intraneuronale neurofibrilläre Bündel (neurofibrillary tangles) vor, die im Wesentlichen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen. Das β -Amyloid Peptid ($A\beta$) ist der Hauptbestandteil der amyloiden Ablagerungen. Daten aus genetischen und zellbiologischen Untersuchungen unterstreichen die pathogene Wirkungsweise des $A\beta$ -Peptides und deuten auf eine massgebliche Rolle bei der Bildung neurofibrillärer Bündel hin.

Das $A\beta$ -Peptid wird durch die konstitutive Spaltung des β -Amyloid Vorläuferproteins APP gebildet (APP). APP ist ein Typ 1 Transmembran-Protein und wird sequenziell proteolytisch gespalten, wobei der Schnitt in der Membran erst nach dem Kürzen der Ektodomäne erfolgen kann. Dies kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: Einerseits kann das β -Amyloid durch enzymatisches Schneiden an der β - und γ -Schnittstelle gebildet werden, was zu Amyloidablagerungen führt (amyloidogener Abbauweg). Andererseits wird durch proteolytisches Spalten an der α - und γ -Schnittstelle die Bildung des β -Amyloids verhindert (nicht-amyloidogener Abbauweg). Bei beiden Wegen wird ein kurzes zytoplasmatisches Fragment, die APP intrazelluläre C-terminale Domäne (AICD) freigesetzt.

Erst lange nach der initialen Beschreibung von APP wurde auch das AICD entdeckt. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass letzteres teilweise durch das Insulin degradierende Enzym sehr schnell nach seiner Freisetzung von der Membran abgebaut wird. Aufgrund der Ähnlichkeit der proteolytischen Prozessierung zwischen APP und dem Notch-Rezeptor einerseits und andererseits weil das intrazelluläre Notch-Fragment nach seiner Freisetzung von der Membran in den Zellkern transloziert, um dort die Transkription von Effektor-genen zu regulieren, wurde auch für AICD eine Signalfunktion vermutet. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die von der γ -Sekretase abhängige regulierte intramembranäre Proteolyse ein immer wichtiger werdendes Konzept darstellt, das aktive zytoplasmatische Protein-Domänen von der Membran freisetzt, welche ihrerseits die Transkription regulieren können. APP und AICD, fusioniert an die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors Gal4, zeigten transaktivierende Aktivität in transienten Transfektionsversuchen. Diese Aktivität hing von der Bindung des Fe65 Adapter Proteins an die YENPTY-Sequenz in AICD ab sowie von der Interaktion von Fe65 mit Tip60, einer nukleären Histon-acetyltransferase. Dabei muss aber bedacht werden, dass bei derartigen transienten Versuchen eine transaktivierende Aktivität auch im Zytoplasma erfolgen kann.

Um die spezifischen Rollen der APP-Adapterproteine Fe65, Jip1b, X11 α (Mint1) und des mit Chromatin-assoziierten Proteins Tip60 aufzuklären, wurden sie in unsere Hek293 Zelllinie, welche induzierbar AICD exprimiert, transfiziert. Protein-Wechselwirkungen und ihre Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation von AICD wurden mittels konfokaler Mikroskopie und Immunopräzipitationen analysiert. Fe65 interagiert mit AICD und transportierte es in den Zellkern, wo es mit Tip60 Komplexe bildete. Diese nukleären Komplexe, bestehend aus AICD, Fe65 und Tip60 (AFT), hatten eine klar definierte runde Morphologie („nukleäre Spots“). Die

Formation dieser Komplexe mit AICD abgeleitet von APP konnte durch γ -Sekretase Inhibitoren geblockt werden. AICD wurde auch von Jip1b in den Zellkern transportiert wo es an Tip60 andockte. Die Komplexe aus AICD, Jip1b und Tip60 (AJT) zeigten aber im Gegensatz zu den klar definierten AFT Komplexen im Kern eine klecksartige Struktur („nukleäre Speckles“). Im Gegensatz zu Fe65 hielt das Adapter Protein X11 α das AICD im Zytoplasma zurück und blockierte eine Kernlokalisierung. Die nukleären AFT und AJT Komplexe mit ihren jeweiligen Morphologien konnten auch in ausdifferenzierten humanen Neuroblastomazellen gezeigt werden. Weiter bestätigte sich die Lokalisation der AFT Komplexe in nukleären Spots auch in ausdifferenzierten hippokampalen Vorläuferzellen aus adulten Ratten. All diese Daten legten die Vermutung nahe, dass APP eine nukleäre Signalfunktion haben kann.

Quantitative Echt-Zeit PCR (qRT-PCR) mit RNA aus unserer klonalen Zelllinie führte zur Identifikation der AICD Effektorgene *APP*, *BACE* und *Tip60* in Abhängigkeit der AICD Expression. Zusätzlich konnten auch die schon bekannten Gene *GSK3 β* und *KAI1* bestätigt werden. Es wurde aber auch gezeigt, dass AICD keinen Einfluss auf die Expression von *HES1* hat, einem Effektor Gen der intrazellulären Notch-Domäne. Mittels Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass durch AICD die Proteinmenge an unprozessiertem APP nicht verändert wurde, jedoch die der Prozessierungsprodukte, gebildet durch die α - und β -Sekretase (α - und β -stubs), stark anstieg. Demnach ist AICD zusätzlich zu seinem Einfluss auf die Prozessierung von APP auch in einer Feedback Regulation involviert, welche die Menge an unprozessiertem APP-Protein konstant hält. In einem komplementären Western Blot Experiment verringerte sich die Menge an APP bei gleichzeitigem Anstieg der α - und β -stubs nach Behandlung der Zellen mit γ -Sekretase Inhibitoren. Insgesamt zeigen diese Daten, dass einerseits eine Kongruenz zwischen der Erhöhung von AICD und dem Anstieg in der APP Protein Menge besteht, und andererseits die Blockierung der AICD-Bildung mit einem Abfall an APP Protein einhergeht. Den Effekt von AICD auf die β -Sekretase BACE, gekoppelt mit einem Anstieg der β -stubs, liess auf eine erhöhte Aktivität von BACE in Abhängigkeit von AICD schliessen.

Aufgrund unserer Daten, welche eine Signalfunktion des AICD Peptides untermauerten, wurde eine Transkriptom Analyse mit Affymetrix GeneChips durchgeführt. Dabei verglichen wir naive Hek293 Zellen mit unserer klonalen Linie (entweder mit oder ohne Induktion der AICD Expression) und fanden 6 Gene, die in Abhängigkeit der AICD Expression induziert wurden. Nach Durchführung von quantitativen RT-PCR-Analysen konnten wir Phosphorylase Kinase 1, den Transkriptions-Elongationsfaktor A, den Prolaktin Rezeptor und ein Protein auf Chr13ORF18 mit unbekannter Funktion verifizieren. Für diese regulierten Gene muss als nächstes eine *in vitro* und *in vivo* Relevanz bestätigt sowie ihre Rolle in der AICD-vermittelten Regulation gezeigt werden.

Zusammengefasst etablieren unsere Daten eine nukleäre Signalfunktion für APP in Abhängigkeit von seiner γ -Sekretase Prozessierung, sowie der Proteine die an seine zytoplasmatische Domäne binden. Zudem weisen unsere Daten darauf hin, dass die AICD Signalfunktion durch Medikamente, welche in der Alzheimer Therapie Anwendung finden um die APP Prozessierung zu modulieren, beeinflusst werden kann.