

Molekulare und funktionelle Analyse der *Drosophila*-Mutante *löchrig* – Neurodegeneration durch Deregulation des Cholesterinstoffwechsels

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) AN DER BIOLOGISCHEN FAKULTÄT DER
BAYRISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von

Jakob-Andreas Tschäpe
aus Wernigerode

im Mai 2002

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	3
B.	MATERIAL UND METHODEN.....	14
I.	MATERIAL	14
1.	<i>Organismen.....</i>	<i>14</i>
2.	<i>Vektoren.....</i>	<i>15</i>
3.	<i>Yeast two hybrid-Systeme.....</i>	<i>16</i>
4.	<i>Phagenbibliotheken.....</i>	<i>16</i>
5.	<i>Oligonukleotide.....</i>	<i>16</i>
6.	<i>Primäre Antikörper.....</i>	<i>17</i>
7.	<i>cDNA Klone.....</i>	<i>17</i>
8.	<i>Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>17</i>
9.	<i>Standardlösungen und Aufzuchtmedien.....</i>	<i>19</i>
10.	<i>Statinpräparat.....</i>	<i>19</i>
II.	METHODEN.....	19
1.	<i>Keimbahntransformation bei Drosophila.....</i>	<i>19</i>
2.	<i>Histologie.....</i>	<i>19</i>
3.	<i>DNA-Präparationen.....</i>	<i>20</i>
4.	<i>Konzentrationsbestimmung der DNA.....</i>	<i>20</i>
5.	<i>Restriktionsanalyse der DNA.....</i>	<i>21</i>
6.	<i>Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA.....</i>	<i>21</i>
7.	<i>Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen.....</i>	<i>21</i>
8.	<i>Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....</i>	<i>21</i>
9.	<i>Ligation von DNA.....</i>	<i>21</i>
10.	<i>Reverse Transkription.....</i>	<i>22</i>
11.	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR).....</i>	<i>22</i>
12.	<i>Sequenzierungen.....</i>	<i>22</i>
13.	<i>Plasmid-Rescues.....</i>	<i>23</i>
14.	<i>Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen.....</i>	<i>23</i>
15.	<i>Screen einer Phagen-Genbibliothek.....</i>	<i>25</i>
16.	<i>Kompetente Zellen und Transformation.....</i>	<i>25</i>
17.	<i>Proteinexpression in E. coli.....</i>	<i>25</i>
18.	<i>Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Westernblot.....</i>	<i>26</i>
19.	<i>Medikamentbehandlungen an Drosophila.....</i>	<i>26</i>
20.	<i>Bildverarbeitung.....</i>	<i>26</i>
21.	<i>Sequenzverarbeitung.....</i>	<i>26</i>
22.	<i>Sequenzvergleiche erhaltener Sequenzen mit Gen-Datenbanken.....</i>	<i>26</i>
C.	ERGEBNISSE	28
I.	ANALYSE DER STRUKTUR DES LOE GENLOCUS UND DER AMPK-UNTEREINHEITEN	28
1.	<i>Genomische Klonierung und Sequenzierung der transkribierten Bereiche des loe Genlocus.....</i>	<i>28</i>
2.	<i>Northern Blot Hybridisierung.....</i>	<i>29</i>
3.	<i>Klonierung der Transkriptvarianten loeII, loeIV – loeIX.....</i>	<i>30</i>
4.	<i>Klonierung der kompletten cDNA von loeI 'in silico'.....</i>	<i>32</i>
5.	<i>Die unterschiedlichen Genprodukte der Transkriptvarianten I – VII.....</i>	<i>33</i>
6.	<i>Die α- und β-Untereinheiten des AMPK-Komplexes in Drosophila.....</i>	<i>39</i>
II.	DIE VARIANTE LOE I IST FÜR DIE MUTATION UND DEN PHÄNOTYP VERANTWORTLICH.....	44
1.	<i>Northern-Blot-Experimente.....</i>	<i>44</i>
2.	<i>Rescue der Mutation und des Phänotypes und Überexpression von loeI.....</i>	<i>46</i>
III.	DIE EXPRESSION VON LOE I AUF PROTEINEBENE IN DROSOPHILA	49
1.	<i>Generierung und Charakterisierung der polyklonalen Antikörper.....</i>	<i>49</i>
2.	<i>Westernblotanalyse von Gehirnhomogenisaten.....</i>	<i>57</i>
3.	<i>Lokalisierung der LOE-I Distribution an Kryostatschnitten.....</i>	<i>59</i>
IV.	ERZEUGUNG WEITERER LETALER ALLELE VON LOE	61
1.	<i>Charakterisierung der isolierten Deletions- und Inversionsrekombinanten.....</i>	<i>61</i>
V.	CHARAKTERISIERUNG DER FUNKTION DES LOE I-N-TERMINUS	64

1.	<i>Yeast-two-hybrid-Screens</i>	64
VI.	LOE I UND DER CHOLESTERIN-STOFFWECHSEL	67
1.	<i>Die HMG-CoA-Reduktase hat Einfluss auf die loe-Mutation</i>	67
2.	<i>Statine reduzieren den loe-Phänotyp</i>	68
3.	<i>Die Lipidzusammensetzung ist in loe alteriert</i>	69
VII.	DIE MUTANTEN APPL UND LOE INTERAGIEREN MITEINANDER	71
1.	<i>Phänotyp der Doppelmutante</i>	71
2.	<i>Appl-Prozessierung ist durch loeI beeinflusst</i>	72
D.	DISKUSSION	79
I.	DAS LOE GEN UND DER AMPK-KOMPLEX	79
II.	EXPRESSIONSSTUDIEN IN VIVO	89
III.	PROTEINLOKALISATION UND –DETEKTION	91
IV.	LETALE REKOMBINANTEN	92
V.	INTERAKTIONEN DES LOE I-N-TERMINUS	93
VI.	LOE I UND DER CHOLESTERINSTOFFWECHSEL	95
VII.	APPL – LOE-INTERAKTION	96
VIII.	LOE I, APPL UND SEKRETASEN	97
E.	ZUSAMMENFASSUNG	101
F.	ANHANG	105
G.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
H.	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	110
I.	BIBLIOGRAPHIE	112
	DANKSAGUNG	119

A. Einleitung

Altern und Tod sind Teile des Lebens. Zwei Phänomene, denen der Mensch aber oft fassungslos gegenübersteht. Die Frage, warum der Mensch altert und stirbt, birgt zwei Seiten in sich: die nach dem Sinn und die nach der Ursache.

Am Beginn der wissenschaftlichen Erforschung von Altern und Tod stand die Frage nach den generellen Mechanismen des Zelltodes, den man als Ursache der Seneszens in mehrzelligen Lebewesen erkannt hatte. Viele Alterskrankheiten sind bestimmt von der Rückbildung von Strukturen oder vielmehr ihrer nachlassenden Erneuerung. Wie man heute weiß, entspricht dieser Beobachtung das Wechselspiel von Proliferation und Degeneration. Durch die Entwicklung hin zur Untersuchung immer feinerer Einheiten des Lebens näherte man sich dem Phänomen Zelltod auf histologischer und dann auch auf molekularer Ebene.

Man beobachtete, daß Zellen auf unterschiedliche Art zu Grunde gehen, wobei sich zwei grundlegend verschiedene Prozesse trennen lassen (Wyllie, 1981 #69):

Apoptose, der geregelte, aktiv von der Zelle herbeigeführte Zelltod, bei dem folgende morphologischen und biochemischen Erscheinungen für diese Zellen typisch sind: Kondensation des Chromatins und des Zytoplasmas (während die Organellen ihre Integrität weitgehend behalten), Abbau der Kernmembran und DNase-vermittelte Degradation der chromosomalen DNA in Nucleosomgroße Fragmente. In der Folge kommt es zur Ausbildung von membranösen Strukturen (sog. 'blebs'), die von Makrophagen eliminiert werden ((Ellis, 1991 #70); (Steller, 1995 #71)). Im Verlaufe apoptotischer Vorgänge kommt es nicht zu Entzündungsreaktionen des Organismus. Apoptotische Prozesse sind fester Bestandteil der Entwicklung, der Homöostase und der Tumorsuppression aller Tiere.

Nekrose, im Gegensatz dazu, wird als pathologischer Zelltod betrachtet und folgt in der Regel auf Zelldefekte unterschiedlicher Art. Typisch für Zellen in nekrotischen Prozessen sind extreme Einfaltungen der Zellmembran, die Organellen und/oder ihre Membranen werden zerstört und kondensieren zu Partikeln - 'whorls' (Hall, 1997 #72). Die chromosomale DNA aggregiert (wird jedoch nicht degradiert), die Zellkernmembran invaginiert, die Zellen bekommen Vakuolen zunehmender Größe, schwellen und lysieren meist.

Nekrotische Prozesse sind immer Ausdruck weitreichender Defekte in der Zellphysiologie und der Zellstruktur.

Organismen zeigen in der Regel inflammatorische Reaktionen bei vielfach vorkommendem nekrotischen Zelltod.

Zelltod im Nervensystem

Apoptotische Vorgänge spielen u. a. in der Entwicklung des Nervensystems eine bedeutende Rolle. Während der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* sterben beispielsweise rund zwanzig Prozent der potentiellen Nervenzellen (Sulston, 1977 #73). Bei holometabolen Insekten (z. B. *Drosophila*) kommt Apoptose bei neuronalen Zellen in verstärktem Maße während und noch kurz nach der Metamorphose vor (Steller, 1994 #76). Das Steroidhormon Ecdyson z. B. ist einer der Faktoren, die diesen Zelltod (je nach Entwicklungsstadium positiv oder negativ) beeinflussen (Kimura, 1990 #75). Aus Vertebraten ist bekannt, daß bis zu 50 Prozent der ausdifferenzierten Neuronen kurz nach Kontakt mit ihrem Zielgebiet apoptotisch sterben (Oppenheim, 1991 #74). Das Überleben der Nervenzellen hängt von einer ausreichenden Versorgung mit spezifischen neurotrophen Faktoren (z. B. Nerve Growth Factor NGF, Neurotrophin-3 NT-3 u.a.) ab, die von den jeweiligen Zielzellen in limitierter Menge sezerniert werden. Nur ein Teil der Neuronen erhält die zur Unterdrückung des 'Selbstmordprogramms' nötige Menge an Neurotrophen und überlebt. Neuronen, die während definierter Abschnitte ihrer Entwicklung mit Neurotrophen unterversorgt sind, sterben dagegen ab. Auf diese Weise wird die Neuronenzahl automatisch den Erfordernissen am jeweiligen Zielort angepaßt. Andererseits gewährleistet der anfängliche Überschuß an Kontakten die vollständige Innervierung aller Zielzellen (Raff, 1992 #78Raff, 1993 #77). Apoptotischer Zelltod im Nervensystem beschränkt sich nicht ausschließlich auf Neuronen, Gliazellen sind ebenfalls während der Gehirnentwicklung davon betroffen. Ähnlich den neurotrophen Faktoren der Neuronen werden auch hier diffusible Faktoren postuliert, deren kontrollierte Ausschüttung die zahlenmäßige Anpassung der Glia-Zellzahl an die Anzahl der neuronalen Zellen steuert (Kretzschmar, 2002 #92). Auf molekularer Ebene konnte ausgehend von ersten Untersuchungen bei *C. elegans* über Experimente bei der Maus bis zu *Drosophila* gezeigt werden, daß die apoptotischen Kaskaden über die verschiedenen Tierstämme hinweg konserviert sind.

Nekrotische Prozesse im Nervensystem sind seit längerem bekannt. Ausgehend von Untersuchungen von Patienten, die den Verlust motorischer Fähigkeiten und Demenz zeigen, von Defekten wie beispielsweise der Alzheimerschen Krankheit (*Alzheimer's disease* – AD) oder dem Creutzfeld-Jacob-Syndrom (CJD). Auf histologischer Ebene zeigen diese beiden Defekte Gemeinsamkeiten mit noch anderen neurodegenerativen Krankheiten: BSE (bei Rindern) oder 'scrapie' (bei Schafen und Ziegen). Man beobachtete in histologischen Untersuchungen sog. amyloide Plaques, benannt nach der Anfärbbarkeit durch Kongorot - sonst üblich für Polysaccharide. Wie man zeigen konnte, bestehen

solche Ansammlungen aus Polysacchariden und einem großen Anteil an fibrillärem Protein (Nikaido, 1970 #101). Das Krankheitsbild wurde vorerst unter 'Amyloidosen' (beim Menschen) zusammengefaßt. Es zeigte sich allerdings, daß diese Plaque-Bildungen mehr Ausdruck der Reaktion der Zellen auf Störungen im Proteinstoffwechsel sind als die Ursache für die neuronalen Defekte selbst.

Im Fall von AD wurde der Hauptproteinanteil dieser Plaques als β -Amyloid-Peptid, ein proteolytisches Spaltprodukt von APP (*Amyloid Precursor Protein*) identifiziert. APP ist ubiquitär im Gehirn exprimiert und hat Einfluß auf neuronale Erregbarkeit, synaptische Plastizität, Neuritenwachstum, vesikulären Transport und das Überleben von Neuronen an sich (Selkoe, 2001 #50). Die APP-Proteinfamilie in Vertebraten enthält drei Mitglieder: APP selbst und die Proteine APLP-1 und APLP-2 (*APP-like proteins*). Sie gehören zur Familie der Klasse-1-Transmembranproteine. Das APP-Gen besteht aus 19 Exons, wobei die Exons 7, 8 und 15 alternativ gespleißt werden, was zu unterschiedlichen Proteinlängen (z.B. APP695 und APP770) und zu unterschiedlicher Motiv-Komposition führt (De Strooper, 2000 #51).

Intensive Forschung der letzten Jahre hat enorm zum Verständnis der Pathologie von AD und den Ursachen der erblichen Alzheimerschen Krankheit (*familiar AD* – FAD) beigetragen.

Die Großzahl der Mutationen in FAD sind Punktmutationen in dem APP-Protein selbst und in den prozessierenden Proteinasen, den Sekretasen. Das APP-Protein wird durch zwei proteolytische Spaltungen prozessiert: durch eine α - oder β -Sekretase außerhalb der Zellmembran und danach durch eine γ -Sekretase in der Transmembrandomäne des APP. Die Prozessierung durch die γ -Sekretase erfolgt immer erst nach der Prozessierung durch eine der anderen zwei Sekretasen. Die Produkte der α - und der β -Prozessierung unterscheiden sich deutlich (Abb. 1). Welche der beiden Prozessierungen bevorzugt abläuft, entscheidet möglicherweise die Membranzusammensetzung. Die β - und die γ -Sekretase finden sich gemeinsam in sog. *membrane rafts*, spezialisierten Membranbereichen, die Proteine an bestimmten Orten der Zellmembran konzentrieren. Die Prozessierung von APP kann durch eine Veränderung des Cholesterin-Gehaltes der *membrane rafts* entweder in Richtung der α - oder der β -Prozessierung verschoben werden (Wolozin, 2000 #10).

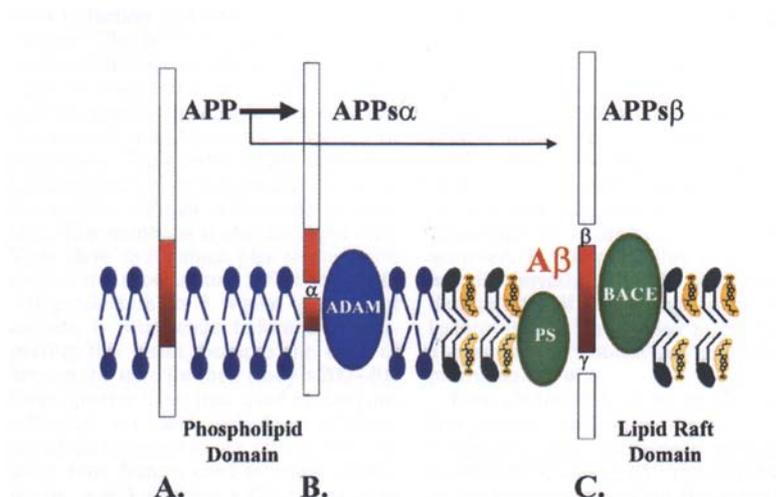


Abb. 1: Modell der α - und β -Prozessierung von APP in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung

aus: Wolozin et al, 2000. ADAM – α -Sekretase, BACE – β -Sekretase, PS – Presenilin

Die Prozessierung von APP kann entweder in Richtung der α - oder der β -Prozessierung verschoben werden, durch eine Veränderung des Cholesterin-Gehaltes der *membrane rafts* (Wolozin, 2000 #10).

Die Produkte der β -Prozessierung sind ein N-terminales Fragment APPs β (ohne bekannte Funktion) und die Peptide A β 42 und A β 40 (erzeugt durch die Schnittstellen γ 42 und γ 40 von Presenilin in APP (Selkoe, 2001 #50)). Das menschliche Gehirn produziert normalerweise pro Tag eine Menge von 1-3ng A β -Peptid, wobei A β 42 und A β 40 im Verhältnis 1:10 produziert werden (J. Haas, persönliche Mitteilung). Die Produktion dieser A β -Peptide ist in AD dramatisch erhöht. Die Aggregation von A β 42 führt zur Formierung sog. diffuser Plaques, in die durch zunehmende Aggregation auch A β 40 und andere Proteine eingebunden werden, z. B. TAU (Tomidokoro, 2001 #79). Diese Aggregationen stellen die zuerst histologisch festgestellten amyloiden oder senilen Plaques und die sog. *neurofibrillary tangles* dar. Der Verlauf der weiteren Pathogenese ist nur durch Indizien gestützt: Es wird diskutiert, dass eine autoinflammatorische Reaktion, hervorgerufen durch A β und vermittelt durch Microglia, im Gehirn ausgelöst wird, die ihrerseits wieder die Produktion von APP steigert (und damit dessen Prozessierung und die A β -Produktion (Gahtan, 1999 #82)). Durch die zunehmende Missfunktion von Neuronen und die damit verbundenen Änderungen in ionischer und metabolischer Homöostase, wird im Verlauf der Pathogenese auch eine enorme Zunahme des oxidativen Stresses in den betroffenen Neuronen diskutiert (Aksenov, 2001 #83).

Die entscheidende Rolle der Prozessierung von APP für die Ausbildung der senilen Plaques ist gut verstanden, doch ist seine Rolle in der zellulären Funktion von APP noch nicht völlig klar. Das Vorkommen von amyloiden Plaques korreliert nicht mit dem Verlust mentaler Fähigkeiten: So sind Patienten mit stark entwickelter Demenz und wenig Plaquebildung ebenso wie Patienten mit starker Plaquebildung und kaum merkbaren kognitiven und mentalen Defiziten beschrieben (Bennett,

1993 #80). Die Einschränkungen mentaler Fähigkeiten scheint mit dem Verlust zellulärer Funktionen in Nervenzellen zusammenzuhängen. Um diese Funktionsverluste charakterisieren zu können, müssen die Funktionen von APP auf zellulärer und molekularer Ebene aufgeklärt werden.

Es sind bereits eine Reihe von Interaktionen und möglichen Funktionen der einzelnen Domänen von APP beschrieben.

Abgesehen von dem unprozessierten APP selbst lassen sich ausgehend von den Produkten der Prozessierung sAPP α (*soluble* APP α - durch α -Prozessierung entstanden) und AICD (*APP intracellular domain*, durch die γ -Sekretase erzeugt) unterscheiden.

Relativ gut belegt ist eine Funktion des unprozessierten APP-Proteins im Vesikeltransport. In Vertebraten konnte *in vitro* gezeigt werden, dass APP ein Rezeptor für Kinesin-I ist, ein Motorprotein im anterograden axonalen Vesikeltransport. Dabei geschieht die Interaktion über die leichte Kette des Kinesins, KLC – *kinesin light chain* (Kamal, 2000 #89). Diese Bedeutung konnte *in vivo* in *Drosophila* für APPL belegt werden (Gunawardena, 2001 #54). Es scheint, dass APP der Rezeptor für Kinesin-I in einem bestimmten Subtyp von Vesikeln ist, die sowohl BACE (die β -Sekretase in Vertebraten) als auch Presenilin-1 (die γ -Sekretase) enthalten (Kamal, 2001 #55). Diese Funktion kann durch TAU blockiert werden, was eine mögliche Verbindung beider Proteine im Hinblick auf die Pathogenese von AD zeigt (Stamer, 2002 #90).

Für das N-terminale Prozessierungsprodukt sAPP α ist eine neuroprotektive Funktion beschrieben, die Apoptose in Neuronen reprimiert und ihre synaptische Plastizität fördert (Furukawa, 1996 #61). So ist für sAPP α eine Funktion ähnlich der von Wachstumsfaktoren (nicht nur für Neuronen) diskutiert (Schmitz, 2002 #86). Eine dafür notwendige Endocytose wird durch fibulin-1 vermittelt, welches jedoch keinen Rezeptor für sAPP α darstellt, sondern vielmehr dessen Bindung an den eigentlichen Rezeptor vermittelt (Ohsawa, 2001 #87), ein Kandidat eines sAPP α -Rezeptors ist das LRP (*lipoprotein receptor-like protein*) (Knauer, 1996 #88).

Die Überexpression eines AICD (C γ 59 – die C-terminalen Prozessierungsprodukte unterscheiden sich ebenfalls in Größe, je nach APP-Spleißform) in Zellkultur führt in Koexpression mit PAT-1 zu einer Repression der Retinolsäure-abhängigen Genexpression (Gao, 2001 #91). Es konnte gezeigt werden, dass die dafür notwendige Translokation des AICD in den Nucleus nicht nur von PAT-1, sondern auch von Adaptorproteinen wie Fe65, X11 α und mDAB-1 unterstützt wird (Zambrano, 2001 #93), die AICD dabei stabilisieren und in andere Komplexe einbinden (Kimberly, 2001 #94). Ein transkriptionell aktiver Komplex ist mit Fe65 diskutiert, da Fe65 mit dem Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 und Tip60 (eine Histonacyltransferase) interagiert (Leissring, 2002 #95), genregulative Aktivität in einem künstlichen Expressionssystem wurde für einen Komplex aus AICD, Fe65 und Tip60 nachgewiesen (Cao, 2001 #96).

***Drosophila* und humane Neuropathien**

Neben den Modellsystemen Maus und Vertebraten-Zellkultur, behält *Drosophila* weiterhin seine Bedeutung als Organismus zur Untersuchung von zellulären Mechanismen (nicht nur) *in vivo*.

Zur Untersuchung von humanen Krankheiten mit und in *Drosophila* kann man sich der Problematik auf zwei Wegen nähern:

Man versucht, das humane Krankheitsbild in *Drosophila* durch Expression manipulierter Gene zu 'modellieren' oder Mutanten zu isolieren und zu identifizieren, die Phänotypen ähnlich den Symptomen humaner Krankheiten haben.

An der Überexpression von humanen Genen, die eine Bedeutung für diverse Neuropathien haben, wird vielfältig gearbeitet: So hat z.B. die Expression eines Prion-Proteins in adulten *Drosophila* keinen histologischen oder molekularen Effekt (Raeber, 1995 #97), wohingegen die Expression von Proteinen mit verlängerten poly-Glutamin-Motiven (typisch für Krankheiten wie *Chorea Huntington* oder die Machado-Joseph-Krankheit) Schäden in den Geweben hervorruft, in denen sie exprimiert wurden (Bonini, 1999 #98). Dabei sind einige Merkmale der hervorgerufenen Schädigungen in *Drosophila* konserviert: spät einsetzen des Phänotypes, progressive Degeneration der betroffenen Zellen und die Formierung abnormer Proteinaggregate (Bonini, 1999 #98). Auch lassen sich lange vor dem Auftreten dieser Phänotypen Defekte in neuronalen Leistungen nachweisen (D.Kretzschmar, persönliche Mitteilung, Daten unveröffentlicht). Auch durch die Expression von α -Synuclein, dessen Aggregation ein Teil der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit ist, konnten in *Drosophila* sowohl Aggregation als auch zelluläre Defekte ähnlich denen in humanen Krankheiten erreicht werden (Feany, 2000 #99).

Auf der anderen Seite wurden durch klassische genetische Methoden Mutanten mit morphologisch unterscheidbaren Arten von Neurodegeneration erzeugt. Fortini et al gruppieren diese Mutanten in drei Gruppen:

A. Innervierungs-abhängige Neurodegeneration

Beispiele sind hier u.a. die Mutanten *sine oculis*, *glass* oder *eyeless*.

B. Phototransduktions- abhängige Neurodegeneration

Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise *ninaE*, *ninaA* und *ninaC* oder *norpA* und *rdgA-C*.

C. morphologisch distinkte neurodegenerative Prozesse

Dazu zählen Mutanten mit strukturellen Defekten wie z.B. *swiss cheese*, *drop-dead*, *spongecake* (Fortini, 2000 #100) oder *löchrig* (Tschaepe, 1998 #12).

Die Abbildung aus dem Review von Fortini et al verdeutlicht auf schöne Weise die morphologischen Merkmale dieser drei Gruppen.

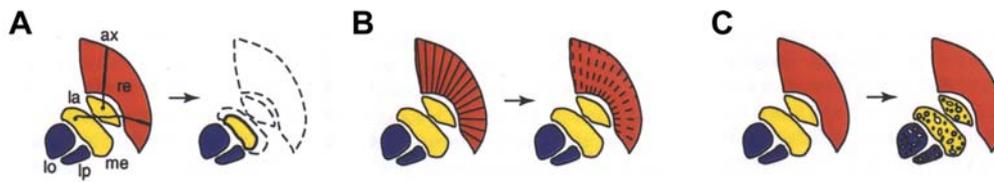


Abb. 2: Neurodegenerationstypen in *Drosophila*-Mutanten

A. Innervierungs-abhängige Neurodegeneration

B. Phototransduktions- abhängige Neurodegeneration

C. morphologisch distinkte neurodegenerative Prozesse
veraendert nach Fortini et al, 2000 (Fortini, 2000 #100).

Die gut etablierten genetischen und molekularen Methoden und die umfassenden Informationen über Genom und Gene machen *Drosophila* nach wie vor zu einem wertvollen Werkzeug in der Forschung.

Die *loe*-Mutante in *Drosophila*

Die Mutante *löchrig* (*loe*) wurde 1995 aus einem Screen auf neurodegenerative Erscheinungen im adulten Gehirn von *Drosophila* Linien im Labor von Doris Kretzschmar isoliert. Diese Linien stammten aus einer P-Element-Mutagenese auf dem dritten Chromosom, durchgeführt von Deak et al.

Die *loe* Fliegen zeigen altersabhängig in histologischen Schnitten Vakuolisierung ('Löcher', daher der Name) im Gewebe des gesamten Gehirns. Im adulten Tier ist diese Degeneration im zentralen Bereich jedoch stärker ausgeprägt als im optischen System. Die Löcher treten bereits bei frisch geschlüpften Adulten und sogar schon im späten Puppenstadium auf. In Larven sind von der Degeneration nur die Teile des Nervensystems betroffen, die schon in den Larvalstadien aktiv sind: So zeigen Thorakalganglion und der innere, larval aktive Teil der Hemisphären im L3-Stadium Vakuolisierung, die sich zum optischen System entwickelnden, äußeren Hemisphären jedoch nicht. Im Embryo sind keine Effekte dieser Art zu beobachten. So scheint erst mit dem Auftreten neuronaler Aktivität der Defekt in *loe* zur Ausprägung zu kommen.

Die *loe*-Fliegen zeigen außerdem eine stark verkürzte Lebensspanne. Bei Präparationen der Thorakalsegmente fiel ein stark vergrößerter Kropf auf.

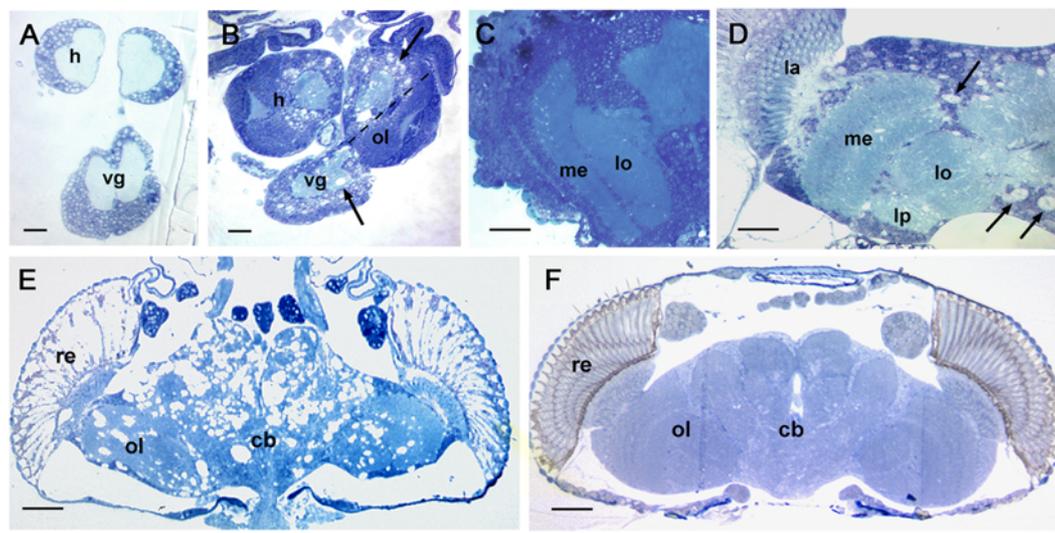


Abb. 3: Semidünnschnitte durch das Gehirn von *loe*-Fliegen in verschiedenen Entwicklungsstadien.

A. Im Gehirn des L(arve)1-Stadiums lassen sich keine Anzeichen für Degeneration finden, während im L3-Stadium (B) schon Löcher auftreten. Die sterbenden Zellen beschränken sich auf die zentralen Teile der larvalen Hemisphären und auf das Thorakalganglion. Das sich neu entwickelnde visuelle System ist noch intakt.

C. Im pupalen Gehirn lässt sich keine Neurodegeneration nachweisen. Die Vakuolisierung beginnt allerdings bereits kurz vor dem Schlüpfen (D), im adulten Gehirn zeigt sich nach 10d massive Neurodegeneration (E) verglichen mit dem Wildty (F). (Bild: D.Kretzschmar)

Aufgrund von Semidünnschnitten durch das adulte Gehirn von *loe*-Fliegen sowie Kryostat- und Parafinschnitttechnik und anschließender Färbung mit Antikörpern gegen Neuronen und Gliazellen konnten die degenerierten Zellen als Neuronen identifiziert werden. Färbungen gegen apoptotische Zellen durch enzymatische Detektion freier 3'-Enden von DNA nach Fragmentation des Chromatins (TUNEL-Färbungen) konnten zeigen, daß es sich bei den degenerativen Erscheinungen in *loe* nicht um Apoptose handelt.

Aufnahmen degenerierter Zellen im EM belegen, daß es sich dabei um Neuronen handelt (Abb. 4). Es lassen sich allerdings keine Schrumpfung des Zellkerns oder vermehrtes Abschnüren von Vesikeln an der Zellmembran beobachten, wie es für Apoptose typisch wäre. Vielmehr schwellen die Zellen (während der Zellkern intakt bleibt) und lysieren - ein nekrotischer Vorgang also, wie die Ergebnisse der TUNEL-Färbungen nahelegten.

In EM-Aufnahmen von adulten Gehirnen der *loe*-Mutante fallen große elektronendichte Bereiche auf, in denen sich keine Zellen mehr befinden oder die von erkennbaren Cytoplasma-Resten und Organellen umgeben jedoch distikt getrennt sind (Abb. 4C+D). Mit Osmium-Tetroxid lassen sich lipophile Stoffe mit C-C-Doppelbindungen, wie z.B. Sterole (z.B. Cholesterin) oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren, fixieren.

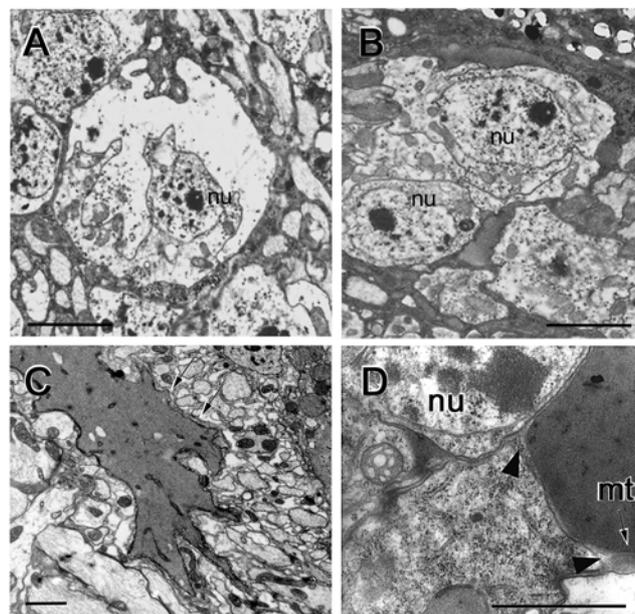


Abb. 4: EM Aufnahmen aus dem adulten Gehirn von *loe*-Fliegen

A. Lamina-Monopolarzelle in *loe*, geschwollen und kurz vor der Zell-Lyse

B. Lamina-Monopolarzellen im WT

C, D. Vergrößerungen aus Bereichen des Zentralhirns. Deutlich fallen die elektronendichten Bereiche auf, in denen sich keine Zellen mehr befinden (C) oder die von erkennbaren Cytoplasma-Resten umgeben, davon jedoch distikt getrennt sind. (nu - Nucleus, mt - Mitochondrium)

Molekulare und genetische Untersuchungen:

Durch Southern Blot Hybridisierungen konnte für *loe* gezeigt werden, daß tatsächlich nur ein P-Element in das Genom inseriert ist. Die Lokalisation des P-Elementes bei *loe* wurde durch *in situ* Hybridisierungen in dem Bereich 93B-C (3. Chromosom) bestimmt und wurde zusätzlich durch Einkreuzen von Defizienzen überprüft: In für *loe* heterozygoten Linien deckte die Defizienz e-R1 (93B5-D2, #3340) den *loe*-Phänotyp auf, die Defizienz e-N19 (93B10-94, #2425) dagegen nicht. Somit liegt die Insertion zwischen 93B5 und B10.

Versuche, den Phänotyp durch *jump-outs* (Wiederfreisetzen des P-Elements durch Einkreuzen entsprechender Linien, die Transposase exprimieren) zu revertieren, ergab folgende Ergebnisse: Von 100 untersuchten Linien, waren 95% dem Phänotyp nach wildtypisch. Wie durch Southern-blot Analysen ermittelt wurde, trugen davon 98% der Individuen noch Reste des P-Elementes, eine Linie enthielt keine P-Element Sequenzen mehr und bei einer wurde neben dem P-Element sogar ein kurzer genomischer Bereich deletiert (Hammerschmid, 1999 #14). Diese Ergebnisse weisen auf eine Lokalisation des P-Elements im nicht-kodierenden Bereich hin.

Zwei relativ nah inserierte EP-P-Element verursachen interessanterweise keinen *loe*-Phänotyp.

Durch Plasmid-Rescues in 5'- und 3'-Richtung vom P-Element konnte ein Bereich von insgesamt 19,8kb auf genomischer Ebene abgedeckt werden.

Durch Subklonierung, anschließender Sequenzierung der Plasmid Rescues und Vergleich mit Datenbanken konnten im 5'-Bereich dieser Region drei Exons eines 2,183 kb großen Transkriptes aus dem *BERKLEY DROSOPHILA GENOME PROJECT* (BDGP) lokalisiert werden.

Das Transkript stellt eine Spleißform eines Gens dar, zu dem eine weitere Variante (II) in cDNA-Banken des BDGP mit einer Länge von 2,704 kb gefunden wurde.

Die möglichen Produkte der beiden Spleißvarianten unterscheiden sich im N-terminalen Bereich, teilen jedoch den überwiegenden Teil des ORF.

Der beiden Transkripten gemeinsame Anteil des ORF zeigt starke Homologien zu der γ -Untereinheit im 5-AMP-aktivierten Proteinkinase (SNF-4) Komplex aus *Drosophila*. Diese Proteinkinase greift in Vertebraten bei ATP-Mangel regulierend u.a. in den Fettsäure und Cholesterinstoffwechsel ein. Die P-Element-Insertion könnte in *loe* für Störungen im neuronalen Membranverkehr und damit für die neurodegenerativen Erscheinungen verantwortlich sein.

Aufgrund der Orientierung des Transkriptes I ist die Lokalisierung der restlichen Exons in 3'-Richtung von der P-Element-Insertion zu vermuten. Die alternativen Spleißformen und die Insertion des P-Elementes in einem Intron der Variante I deuten darauf hin, daß mit dieser Variante eine

Neuronen-spezifische regulatorische Untereinheit der AMPK in *Drosophila* gefunden wurde (Tschaepe, 1998 #12).

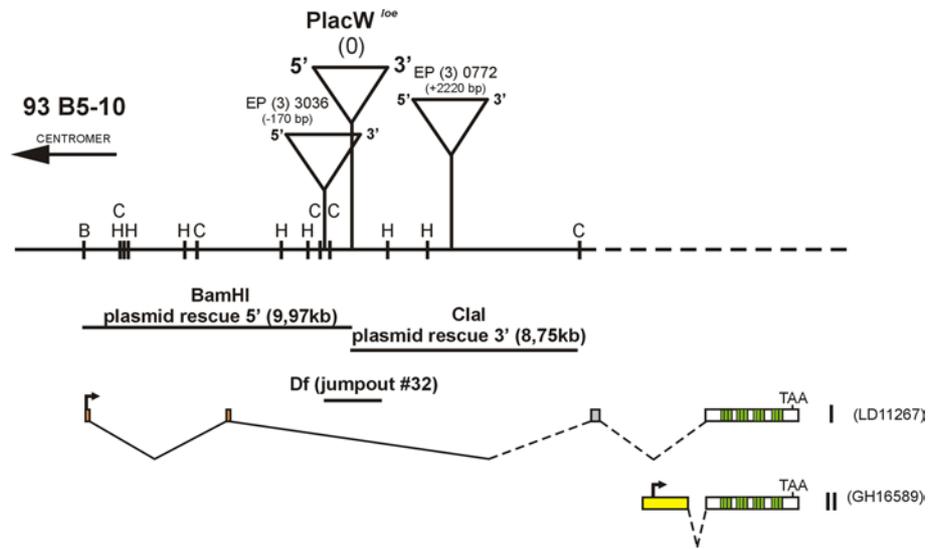


Abb. 5: Zusammenfassung der molekularen Analyse des *loe* Genlocus (Tschaepe, 1998 #12)

Eingetragen sind das P-Element der *loe* Mutante und die beiden gefundenen Transkriptvarianten. Die beiden eingezeichneten EP-P-Elemente verursachen **keinen** *loe* Phänotyp.

B. Material und Methoden

I. Material

1. Organismen

a) Fliegenstämme

Es wurden folgende Fliegenstämme verwendet:

Stamm	Erklärung	Herkunft	Literatur
WT CS	Wildtyp Canton Spezial	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
W ⁷¹¹⁸	<i>white</i> -Mutante, Hintergrundstamm der P-Elementinsertion und Keimbahntransformationen	Stammsammlung	
<i>loe</i>	P-Element-Mutante	P-Element Mutagenese von Deak et al / Screen auf neurodegenerative Erscheinungen (Kretzschmar, D., Regensburg)	Deak et al, 1997
<i>w; p{AppI-Gal4}</i>	neuronale Gal-4 Expression	L. Torroja	
<i>w; p{elav-Gal4}</i>	neuronale Gal-4 Expression	Stammsammlung	
<i>w; p{loco-Gal4}</i>	gliale Gal-4 Expression	C. Klämbt	
<i>w; p{MIB-Gal4}/TM3Sb</i>	gliale Gal-4 Expression	Nambu	
<i>w; p{actin-Gal4}/CyO</i>	Gal-4 Expression unter Kontrolle des Actin-Promotors	BSC	
<i>w; p{GMR-Gal4}/CyO</i>	retinale Gal-4 Expression	M Freeman	
<i>w; p{GMR-Gal4}</i>	retinale Gal-4 Expression	F. Pignoni	
<i>w; p{UAS-loeI}4</i>	pUAS-loeI, Insertion X-Chromosom	vorliegende Arbeit	
<i>w; p{UAS-loeI}28</i>	pUAS-loeI, Insertion II.Chromosom	vorliegende Arbeit	
<i>w; p{UAS-loeI^m}</i>	pUAS-loeI ^m , Insertion X-Chromosom	vorliegende Arbeit	
<i>w; p{UAS-loeI-CBS}</i>	pUAS-loeI-CBS, Insertion X-Chromosom	vorliegende Arbeit	
<i>w; p{UAS-loeI}2</i>	pUAS-loeI, Insertion III.Chromosom	vorliegende Arbeit	
<i>w; p{UAS-loeII}11</i>	pUAS-loeII, Insertion X-Chromosom	vorliegende Arbeit	
<i>w; p{UAS-AMPKα}</i>	pUAS-aplha-AMPK δ regulat., Insertion X-Chromosom	vorliegende Arbeit	
<i>p{w+δ2-3}Sb/TM3Ser</i>	Transposasequelle	Stammsammlung	
<i>FM7c/w; TM3Sb/D3</i>	<i>white</i> -Stamm, balanciert auf I. und II. Chromosom	Stammsammlung	
<i>w; CyO/Sco; TM3Sb/D3</i>	<i>white</i> -Stamm, balanciert auf II. und III. Chromosom	Stammsammlung	
R9	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort
R10	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort
R14	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort
R17	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort

Stamm	Erklärung	Herkunft	Literatur
R37	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort
R39	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort
R41	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort
R51	HEI-Rekombinante	Diplomarbeit C.Hammerschmied	s. dort

Tab. 1: Fliegenstämme

BSC – Bloomington Stock Center

Alle Stämme wurden zur Aufzucht auf *Drosophila*-Medium (Maismehl, Agar, Sojamehl, Melasse, Malzextrakt, Hefe und 3g/l Nipagin als Fungizid) bei 25 °C, bzw. 18 °C und 65% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten.

b) Bakterienstämme

Plasmide wurden mit *E.coli* XL1-blue transformiert und amplifiziert (Genotyp: siehe Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Proteinexpression wurden M15[pREP4] und SG13009[pREP4] (Genotypen s. www.qiagen.com), sowie die Protease-defizienten Stämme ER2508, ER2508[pREP4], CAG626, CAG597, CAG748 und CAG629 (Genotypen s. ww.neb.com) verwendet.

In Verbindung mit den λ Phagen-Bank Screens wurden NM538 für λ GEM12, Y1090 für λ gt11 (Genotypen siehe Sambrook *et al.*, 1989) und XL1 blue MRA-P2™ für Statogene Lambda FII™fix Library verwendet (Genotyp: siehe Anleitung).

2. Vektoren

Für Klonierungen wurde das Plasmid pBluescript SK (+/-) (pSK) der Firma Stratagene verwendet.

Bei genomischen Plasmid-Rescues fand der im *loe*-Stamm inserierte P-Element-Vektor P-lacW Verwendung (Bier, E. et al, Genes & Dev., 1989)

Zur Keimbahntransformation von *Drosophila* kamen die Vektoren pUAST (erhalten von S. Schneuwly) und pINDY-5 (erhalten von L. Seraude) zur Verwendung.

Für die Expression von Fusionsproteinen wurden die Vektoren der pQE-Serie (QIAGEN) verwendet.

Für die *Yeast-two hybrid*-Screens wurden die in den Systemen enthaltenen Vektoren pAS2-1 und pAct (*Matchmaker*-System, s.u.) sowie pSoS und pMyr (CytoTrap-System, s.u.) verwendet.

3. Yeast two hybrid-Systeme

Es wurden die Systeme Matchmaker-2 (Clontech, #K1604-1) und CytoTrap (Statagene, #832700-12) verwendet. Die gewählten cDNA Banken waren jeweils aus adulter *Drosophila* isoliert.

4. Phagenbibliotheken

Für einen genomischen Genbank-Screen wurde die Lambda FII™fix Library mit genomischen Fragmenten aus *Drosophila melanogaster*/Embryo der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet.

5. Oligonukleotide

Tab. 2: Oligonukleotide:

Name	Schnittstellen	Sequenz (5' → 3')	Cy5? ¹⁾
Reverse	-	AAC AGC TAT GAC CAT G	+
Universal	-	GTA AAA GGA CGG CCA GT	+
plac.seq	-	GTG CCA CCT GAC GTC TAA CGA AAC C	+
p3-inr.seq	-	ATA GGA CAC TCA GAA TAC TAT TCC	+
5-placW	-	CCT CTC AAC AAG CA ACG TGC ACT G	+
35-placW	-	TAT AGT CCT GCT GGG TTT CGC CAC C	+
FII-T7	-	CGA GCT CTA ATA CGA CTC ACT ATA G	-
FII-T3	-	GGC CGC GAG CTC AAT TAA CCC TCA C	-
pOT5'(T7 primer)	-	AAT ACG ACT CAC TAT AGG	+
pOT3' (PM001 primer):	-	CGT TAG AAC GCG GCT ACA AT	+
pAct seq	-	TACCACTACAATGGATG	+
pSOS5'	-	CCAAGACCAGGTACCATG	-
pSOS3'	-	GCCAGGGTTTTCCCAGT	-
pMyr5'	-	ACTACTAGCAGCTGTAATAC	-
pMyr3'	-	CGTGAATGTAAGCGTGACAT	-
dT ¹⁸	-	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	-
dT ²⁰⁺	KpnI, XbaI	ATGGATCCTCTA- GATTTTTTTTTTTTTTTTTTTN	-
loe5QE	KpnI	ACGGTACCTTATGAACTCCATGAAGG	-
loe INDY3'	XhoI	TACTCGAGTTCACAAAC- CAACGCCATTCT	-
loe5AS	EcoRI	TAGAATTCATGAACTCCAT- GAAGGTGGCC	-
loeI5-1	EcoRI	ATGAATTCGGTAAC- CATGCCAGCTCGAATGC	-
loeI5-2	EcoRI	AAGAATTCAGGTACCAAATGGCCACG	-
loeI5-3	EcoRI	CTTGAATTCTGAAAACGCAGCGG	-
loeI5-4	EcoRI	AAAGAATTCCACCCGTTTCAGGTGAACG	-
loeI5-5	XhoI	ATCTCGAGACGCGTCCAAATGGCCACG	-
loeI5-6	XhoI	ATCTCGA- GACGCGTCCAAATGGCCACGAACTGC	-

Name	Schnittstellen	Sequenz (5'→3')	Cy5? ¹⁾
loeII5	EcoRI	ATGAATTCGFTACCATGCAT- GAATAACAC	-
loeIpQE	KpnI	ATAGGATCCAAATGGCCACGAAACTGCG	-
loeIpAS	EcoRI	ATAGAATTCCAAATGGCCAGAACTGCG	-
loeIIpAS/QE	KpnI	TAATCCCGCTTAAGGAGAACGGCCGAG	-
β mitte	EcoRI	ATGAATTCTCAGTTAACCGGCGATGAGG	-
α-5'	EcoRI	ATGAATTCCAACAAGGAGCTACCTGCCG	-
α-3'	SacI	CGGTGAGCTCATCCTTAGCG	-

1) Modifikation am 5' Ende mit Fluoreszenzfarbstoff Cy-5 Indocarbocyanin zum Einsatz in *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing*TM Reaktionen der Firma Amersham Pharmacia Biotech

6. Primäre Antikörper

Antikörper	Epitop	Herkunft
C17.9C6	NOTCH/intrazelluläre Domäne	Dev.Studies Hybridoma Bank (Iowa City)
	NOTCH/extrazelluläre Domäne	Dev.Studies Hybridoma Bank (Iowa City)
MAB348	APP-N-Terminus	Chemicon (Temacula)
anti-APPL R1	Appl-N-Terminus	R. Reifegerste
anti-PSN R1	Presenilin	R. Reifegerste
anti-GAP	Ras-GAP	J. Botella-Munoz
anti RGS-His	RGS-His	QiaGen (Hilden)

7. cDNA Klone

Die cDNA Klone wurden von Genome Systems (St. Louis, Missouri, USA) inc. und von Research Genetics, Inc. (Huntsville, USA) bezogen.

8. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien:

Reagenzien/Materialien	Bezugsquelle(n)

Reagenzien/Materialien	Bezugsquelle(n)
Megaprime DNA labelling Kit, Thermo Sequenase fluorescent labelled primer sequencing Kit, Hybond-NX Nylonfilter, Cy TM 5 Thermo Sequenase TM Dye Terminator Kit, GeneImages TM AlkPhosDirekt TM DNA detection Kit, CDP-star TM , Restriktionsenzyme, ECL-Kit, HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Expand long PCR System, Expand High Fidelity PCR System, T4 DNA Polymerase	Roche (Mannheim)
Oligonukleotide (Cy5)	Eurogentech (Seraing, Belgien)
Long Ranger Gel Solution	FMC Bio Products (Rockland, ME)
Restriktionsenzyme, T4-Ligase, Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP), Large Fragment DNA Polymerase I (Klenow), Salmon Sperm DNA, DNA/RNA-Längenstandards, Oligonukleotide	Gibco BRL (Eggenstein)
[α - ³² P]-dCTP (111TBq/mmol)	Hartmann Analytics (Braunschweig); [Inst. of Isotopes Co. Ltd., Budapest, Hungary]
Filme	Kodak/Retina
RNase	Merck (Darmstadt)
HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper	Dianova GmbH (Hamburg)
ABI PRISM-Sequenzierkit, Template Suppression Reagent	Applied Biosystems, (Foster City, CA, USA)
QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, Oligotex mRNA Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Taq Plus Long PCR System, pCR-Script TM Cloning Kit <i>CytoTrap</i> [®] yeast two hybrid-System	Stratagene (Heidelberg)
<i>Matchmaker-2</i> yeast two hybrid-System	Clontech (Palo Alto, CA, USA)

Reagenzien/Materialien	Bezugsquelle(n)
Alle weiteren verwendeten Chemikalien, Salze und Lösungsmittel	Amersham, BioRad (Hercules, CA), Biozym (Hess, Oldendorf), Difco (Detroit, MI), Eurobio, Fluka (Neu-Ulm), Merck, Roth, Applichem.
H ₂ O	gereinigt und entionisiert mit dem System Milli-Q Plus, Millipore (zum Einsatz in PCR-Reaktionen aliquotiert und zusätzlich mit ca. 500mJ im UV-Crosslinker bestrahlt)

9. Standardlösungen und Aufzuchtmedien

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Ausubel et al., 1998, hergestellt.

10. Statinpräparat

Mevinacor[®] 10, Wirkstoff Lovastatin, Pharmazeutischer Unternehmer: MSD Sharp&Dome GmbH, D-85530 Haar, Hersteller: FROSST IBERICA, E-28805 Alcala de Henares, PZN-4325489.

II. Methoden

1. Keimbahntransformation bei Drosophila

Keimbahntransformationen wurden nach dem von M.Mühlig-Versen im Regensburger Labor etablierten Verfahren durchgeführt (Muehlig-Versen, 2001 #15)

2. Histologie

a) Kryostat-Schnitte

Kryostat-Schnitte wurden nach den im Regensburger Labor etablierten Verfahren durchgeführt (s. Muehlig-Versen, 2001 #15)

b) Paraffin-Schnitte

Paraffin-Schnitte wurden nach den im Regensburger Labor etablierten Verfahren durchgeführt (s. Muehlig-Versen, 2001 #15)

c) Antikörperfärbungen an Kryostatschnitten

Die Immunhistochemie an Kryostatschnitten wurde nach den im Regensburger Labor etablierten Verfahren durchgeführt (s. Muehlig-Versen, 2001 #15)

3. DNA-Präparationen

a) Plasmid Mini-Präparation

Präparationen von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab ("Miniprep") wurden nach dem Protokoll von Ausubel et al., Unit 1.6.1 (Alkalische Lyse), durchgeführt (Ausubel et al., 1998). Isolierte DNA wurde in 50µl H₂O gelöst. Dabei wurden Ausbeuten von durchschnittlich 5µg Plasmid-DNA pro ml Übernachtskultur erzielt.

Verunreinigungen mit RNA wurden durch Zugabe von RNase entfernt.

Miniprep-DNA, die zur Sequenzierung vorgesehen war, wurde zum Teil zur Erhöhung der Reinheit einer Phenol/CIA-Extraktion mit anschließender Isopropanolfällung (nach Ausubel et al., Unit 2.1.1) unterzogen und in einer geeigneten Menge H₂O gelöst.

Alternativ wurden Präparationen mit dem QiaSpin System (Qiagen) nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

b) Plasmid Groß-Präparation

Präparationen von Plasmid-DNA im größeren Maßstab wurden mit Nucleobond AX 500 Anionenaustauschersäulen (Macherey-Nagel) oder EndoFree Mega Kit (Qiagen) nach Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Ausgehend von 200 bis 250 ml Übernachtskulturen wurden Ausbeuten von 0,1 bis 1,5 mg Plasmid-DNA erzielt.

c) Isolierung genomischer DNA zur PCR Amplifizierung

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach Gloor et al. (1993, DNA-Isolation of single flies). Die DNA von je 8 Fliegen wurde in 100µl H₂O gelöst.

d) Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA wurde mit Abänderungen nach Ashburner (1989b, Protokoll 48) durchgeführt. Die Ausbeute lag bei ca 30 µg pro 100 Fliegen.

e) Phagen-DNA Miniprep

Durchführung nach Ausubel et al., Unit 6.5.1 ff.

4. Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration einer DNA wurde entweder per OD-Messung in einem Photometer bestimmt oder auf einem Agarosegel mit parallel laufenden mengenstandardisierten Markern geschätzt.

5. Restriktionsanalyse der DNA

Analytische Verdauungen wurden standardmäßig in einem Volumen von 20 µl durchgeführt, präparative Verdauungen, mit einem bis mehreren µg DNA, in einem Volumen von 20 oder 30 µl.

Die Reaktionsbedingungen wurden den Katalogen der jeweiligen Hersteller der Enzyme entnommen (GibcoBRL, NEB bzw. Pharmacia).

DNA Präparationen aus λ-Phagen wurden immer vor dem Verdauen oder Auftragen auf ein Gel für 3min auf 65°C erhitzt.

6. Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA

Isolierung von Gesamt-RNA wurde nach der Trizol/Guanidin-Methode vorgegangen (Asubel et al, 1997, unit 4.2). Zur Trennung von Köpfen und Körpern wurden *Drosophila* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, durch Vortexen zwischen Kopf und Thorax durchgebrochen und durch tiefgekühlte Standardsiebe (Ausschlussgrößen 800µm und 500µm) getrennt.

Für kleine RNA-Mengen (z.B. für RT-PCR) wurde der RNeasy RNA-Isolationskit (QiaGen) verwendet.

7. Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren in Agarosegelen

a) Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Herstellung von Agarosegelen und als Elektrophoresepuffer wurde meistens 1x TBE verwendet (Ausnahme: Low Melting Agarose mit 1x TAE). Ansonsten wurde nach Sambrook et al., 1989, vorgegangen.

b) Elektrophoretische Auftrennung von RNA

RNA-Agarose-Gele wurden wie unter Kapitel 4.9 (Asubel et al, 1997) beschrieben, durchgeführt.

8. Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Mit Ethidiumbromid sichtbar gemachte DNA in Agarosegelen wurde ausgeschnitten und mit QIAquick Gel Extraction Kit oder bevorzugt QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

9. Ligation von DNA

Ligationen wurden nach den Empfehlungen der Hersteller (Roche Biochemicals, Pharmacia oder NEB) durchgeführt.

10. Reverse Transkription

Zur Erzeugung von cDNA aus mRNA wurden die Reverse-Transkriptionssysteme von Roche Biochemicals (Titan[®]) und GIBCO BRL (Superscript[®]) verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Angaben der Hersteller gewählt.

11. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wurde dazu verwendet, spezifische Fragmente aus cDNA, Plasmid- oder genomischer DNA zu vervielfältigen.

(Näheres zum Prinzip von PCR-Reaktionen siehe Ausubel *et al.*, 1989).

Für PCR-Reaktionen wurde der RoboCycler Gradient 40 (Stratagene) verwendet.

Um das Auftreten unspezifischer PCR-Produkte zu minimieren, wurden bei Amplifikationen aus genomischer und cDNA 'hot start'-PCRs (D'Aquila *et al.*, 1991) durchgeführt.

Genaue Reaktionsbedingungen (insbesondere 'Annealing'-Temperatur und Dauer der Polymerisation) wurden für jedes Primerpaar neu optimiert. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze wurde nach den Empfehlungen der Hersteller gewählt (s. www.roche.com, www.pharmacia-biotech.com).

Die Oligonukleotide, die als Primer für die PCR benutzt werden, wurden von den Firmen EURO-GENTEC, MWG Biotech und GIBCO BRL bezogen.

12. Sequenzierungen

Alle Sequenzierreaktionen wurde mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit* der Firma Amersham durchgeführt. Die hier verwendete Methode ist eine Modifizierung der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Auf das Entgasen der Gele wurde verzichtet; unmittelbar vor Zugabe von TEMED und 10%APS wurde die Acrylamidlösung durch ein Einmalfilter (0,45µm, Millipore) filtriert, um eine größtmögliche Reinheit des Gels zu erreichen. Alle weiteren Vorgehensweisen wurden nach Angaben des Herstellers (Pharmacia Biotech) durchgeführt.

Weitere Sequenzierungen wurden mit dem *ABI PRISM*-System (Applied Biosystems, Foster City, California) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

13. Plasmid-Rescues

Es werden ca. 15µg genomischer DNA mit 6U je µg DNA eines geeigneten Restriktionsenzym (s. Teil III, Abb. 1) und 1µg Ribonuklease verdaut.

Reaktionsansatz: 10µl DNA-Lösung (= 3µg)

4µl 10xRestriktionspuffer

1µl RNase A (10mg/ml)

23µl dd Wasser

2µl Restriktionsenzym (10U/µl)

Reaktionsvolumen 40µl

Inkubation: bei 37°C für 2h, es folgt Phenolisierung und Präzipitation. Das Pellet wird in 30µl TE-Puffer aufgenommen.

Ligation:

Es werden 10µl des genomischen Verdaus in einem Volumen von 200µl bei 14°C über Nacht religiert:

Ligationsansatz:

10µl verd. genom. DNA

40µl Ligasepuffer (5x)

150µl ddH₂O

1µl T4-DNA-Ligase (1U/µl)

22µl 3 M NaAc zugeben und phenolisieren;

Es folgt nochmalige Phenolisierung und Präzipitation. Die ligierte DNA wird in 20µl ddH₂O gelöst (50ng/µl).

Die Transformation erfolgt durch Elektroporation wie unter 16.b) beschrieben.

14. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

a) Southern Blot

Durchführung nach dem Kapillarblot-Verfahren (Ausubel et al., Unit 2.9.3 - 2.9.5).

Anmerkungen:

Bei Fragmentgrößen <5kb wurde der Depurinierungsschritt (0,25M HCl) weggelassen.

Der Neutralisierungsschritt wurde generell weggelassen.

Verwendete Membran: Biotodyne A Nylonmembran 0,2µm (Pall);

Dauer des DNA Transfers: ca. 15h;

Die transferierte DNA wurde in einem Stratalinker UV Crosslinker der Firma Stratagene bei 90mJ kovalent auf der Membran fixiert.

b) Northern Blot

Durchführung nach dem Kapillarblotverfahren (Ausubel et al, Unit 4.9.1 ff.).

c) Radioaktive Filterhybridisierungen

Northern und Southern Hybridisierungen wurden in Hybaid Hybridisierungsröhren (MWG Biotech) mit 10-25ml Hybridisierungspuffer durchgeführt.

Hybridisierungspuffer ('Church-Puffer'; modifiziert nach Church et al., 1984):

15% deionisiertes Formamid

1mM EDTA

7% SDS

1% BSA

0,2M NaPO₄ (pH 7,2)

Alle Puffer für Northern Blots wurden unter Verwendung DEPC-behandelter Reagenzien hergestellt.

Um die Spezifität der Hybridisierungen zu erhöhen, wurde mindestens eine Stunde in Church-Puffer bei 65°C vorhybridisiert.

d) Sondenpräparation

Für die Herstellung von DNA-Sonden wurden entweder ganze Plasmide radioaktiv markiert, oder zu markierende Fragmente aus Agarosegelen gereinigt, wenn mögliche Hybridisierungen des Vektoranteils vermieden werden mußten.

Sonden wurden durch internen Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Megaprime DNA labelling Kit (Amersham Pharmacia Biotech)) nach Anweisungen des Herstellers radioaktiv markiert. Pro Ansatz wurden ca. 1 MBq (25 µCi) Radioaktivität eingesetzt.

Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde standardmäßig mit der Säure-Präzipitationsmethode bestimmt (nach Ausubel et al., Unit 3.4.7). Sonden wurden nur für Hybridisierungen verwendet, wenn die Aktivität bei über 10^7 cpm und die Einbaurate des $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP bei mindestens 50% lag.

e) Hybridisierungen und Waschbedingungen

Durchführung nach Ausubel et al, Unit 4.9.1 ff. und 2.9.1 ff.

f) Detektion

Die hybridisierten Blots wurden entweder durch Autoradiografie mit Röntgenfilmen oder das Phospho-Imager System (Canberra-Packard, Australien) detektiert.

15. Screen einer Phagen-Genbibliothek

Durchführung nach Ausubel et al, Unit 6.1.1 – 6.4.7

Plaque Lifts wurden nach Sambrook et al., 1989 modifiziert.

Zur Hybridisierung der Lifts s. 14.c) ff, Präparationen von Phagen-DNA

16. Kompetente Zellen und Transformation**a) Kompetente Zellen**

Hitzeschock-kompetente XL1-Blue-Zellen wurden nach Ausubel et al., Unit 1.8.1, elektrokompente Zellen nach Ausubel et al., Unit 1.8.4, hergestellt.

b) Transformation

Hitzeschock-Transformation: s. Ausubel et al., Unit 1.8.2

(Ausnahme: Schnelligation: Mit 200µl des verdünnten Ligationsansatzes ein 200µl-Aliquot heatshock-kompetenter Zellen transformieren, heatshock 45s)

Elektrotransformation (ET): Da Salze die Transformationsrate herabsetzen, wurden Ligationsansätze vor der ET gefällt und in H₂O (1/10 des Zellvolumens) gelöst. Die ET wurde mit dem Gerät Elektroporator 1000 (Stratagene) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

17. Proteinexpression in *E. coli*

Die cDNA-Fragmente, die zur Expression vorgesehen waren, wurden mittels PCR gewonnen (zur Einführung der passenden Restriktionsschnittstellen und zur Einpassung des offenen Leserahmens in die Fusionsstelle) und in verschiedenen pQE-Vektoren des *QiaExpressionist*-Systems von Qiagen kloniert. Die Auswahl der Vektoren geschah nach Verfügbarkeit von Restriktionsschnittstellen und Erfordernissen bei der Proteinexpression. Zur Expression, Analyse und Isolierung der exprimierten Fusionsproteine wurde nach den Standard-Protokollen zur denaturierenden Präparation vorgegangen, die im *QiaExpressionist* (- beiliegende Bedienungsanleitung) empfohlen sind.

18. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Westernblot

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach Laemmli (s. Asubel et al, 10.2.4 ff und 10.2.30 ff). Western-Blots wurden nach dem Tank-Blotting-Verfahren (Asubel et al, Unit 10.8.1 ff) und dem Semi-Dry-Verfahren (Asubel et al, Unit 10.8.4 ff) durchgeführt. Als Membranen dienten Hybond C und P (Amersham-Pharmacia), für Ponceau-Färbungen und Coomassie-Färbungen s. Asubel et al, Unit 10.8.7 f bzw. 10.6.1). Inkubationen und Entwicklung der Western-Blots wurden mit dem ECL-System (Amersham-Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Detektion dienten Röntgen-Filme diverser Hersteller.

Alle primären und sekundären Antikörper wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Verdünnung 1:1000 eingesetzt.

19. Medikamentbehandlungen an *Drosophila*

Die jeweiligen Genotypen wurden ab dem L3-Stadium auf Gläsern gehalten, in denen mit ddH₂O und Glucoselösung (40mg/ml) getränkte Zellstofftücher als Unterlage dienten. Die verschiedenen Konzentrationen des Medikamentes Mevinacor[®] wurden in ddH₂O gelöst zugegeben (d.h. die Tücher bis zur Sättigung getränkt). Die Konzentration wurde durch Übertragen der oralen Maximaldosis beim Menschen auf das *Drosophila*-Lebendgewicht bestimmt und zu Kontrollzwecken auf ein Zehntel verringert und auf das 100- bzw. 1000-fache erhöht. Zur Anwendung kamen: 1ng/ml, 0,1ng/ml, 100ng/ml und 1µg/ml. Kontrollgruppen wurden mit dem gleichen Volumen an ddH₂O (als Lösungsmittel des Medikaments) behandelt.

20. Bildverarbeitung

Alle in der Arbeit gezeigten Bilder und Aufnahmen wurden entweder über verschiedene Eingabegeräte digitalisiert und im Adobe-Photoshop 5.5/6.0 aufbereitet oder mit Corel Draw 9.0 erstellt.

21. Sequenzverarbeitung

Zur Aufarbeitung und Prozessierung wurden neben dem generell zum ALF-Sequenzierer bzw. zum ABI-System gehörenden Analyseprogramm weiterhin EditSeq, MapDraw, MegAlign und SeqMan aus dem DNA- und Protein-Analyseprogramm Lasergene von DNASTAR Inc.(Madison/WI, USA) verwendet.

22. Sequenzvergleiche erhaltener Sequenzen mit Gen-Datenbanken

Alle Sequenzdaten wurden zur Ermittlung möglicher Homologien mit Datenbanken verschiedener Genom-Projekte abgeglichen bzw. im Hinblick auf Motive u.ä. mit Proteindatenbanken verglichen:

1. Berkley *Drosophila* Genome Project (BDGP)/ <http://www.flybase.org>
2. Blast Search on NCBI / <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
3. <http://www.expasy.ch/> (diverse Dienste, z.B.: GeneStreamAlign, PredProt, PHD, Prodom, Transprot u.a.)
4. <http://www.sanger.ac.uk/> (diverse Dienste, z.B.: PFAM, WormPred u.a.)
5. <http://www.embl.org/> (diverse Dienste, z.B.: Trembl u.a.)

C. Ergebnisse

*I. Analyse der Struktur des *loe* Genlocus und der AMPK-Untereinheiten*

Das Gen *loe* kodiert für eine regulatorische γ -Untereinheit des 5-AMP-aktivierten Proteinkinase-Komplexes (AMPK) in *Drosophila*. In den vorangegangenen Arbeiten konnte zwei Transkriptvarianten dieser γ -Untereinheit identifiziert und kloniert werden (Tschaepe, 1998 #12).

*1. Genomische Klonierung und Sequenzierung der transkribierten Bereiche des *loe* Genlocus*

Ausgehend von den Ergebnissen aus der Diplomarbeit (Tschaepe, 1998 #12) wurde der genomische Bereich, in dem die für die CBS-Domänen kodierenden Exons lokalisiert sind, in 3'-Richtung von der untersuchten genomischen Region vermutet. Ein λ -Phagen-Screen mit einem cDNA-Fragment als Sonde (Sonde CBS, s. Abb. 6) sollte zur Klonierung dieses genomischen Bereiches führen.

Die aus diesem Screen erhaltenen genomischen Klone wurden in einem 'Screen-ähnlichen' Verfahren gegen die Sonde Cla-3' (Abb. 6) hybridisiert. Es sollten somit die Klone selektiert werden, die die verbleibende Lücke zwischen dem 3'-Bereich der bekannten Region und dem 3'-Ende der Transkriptionseinheit überbrückten. Dies konnte nicht erreicht werden. Dennoch wurden die Klone durch Southern-Blot-Experimente grob in ihrer Lage zueinander orientiert. (Zur Lage der λ -Klone relativ zu den Transkripten s. Abb. 6.) Klon #1B22 wurde genau kartiert und zur Aufklärung der Intron-/Exon-Struktur im Bereich der CBS-Domänen in pSK um- und subkloniert sowie sequenziert (s. Abb. 7). Durch das parallel zu den Arbeiten voranschreitende genomische Sequenzierprojekt von BDGP/EDGP in *Drosophila*, wurde auf weitere Screens und Klonierungen verzichtet. Die bereits erhaltenen Sequenzdaten wurden mit denen der Datenbanken abgeglichen.

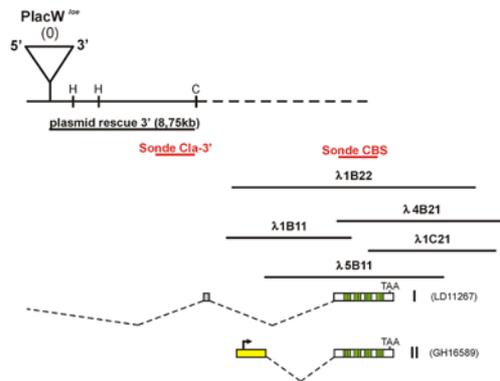


Abb. 6: Relative Position der λ -Klone zu den Transkriptvarianten

Schnittstellen: H – Hind III, C – Cla I
Eingezeichnet sind die für die Screens verwendeten Sonden *Cla-3'* und *CBS*.

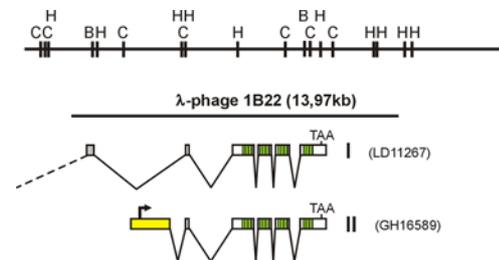


Abb. 7: Karte des λ -Klons 1B22

Schnittstellen: H – Hind III, C – Cla I, B – BamHI
Die genaue Intron/Exon-Struktur der beiden Transkriptvarianten ist dargestellt.

2. Northern Blot Hybridisierung

Um die bekannten Transkriptionsvarianten auf einem Northern Blot sichtbar zu machen, wurde mit einer Sonde ('CBS'-Sonde, s. Abb. 10) aus der gemeinsamen Region der CBS-Domänen geprobt (Abb. 8).

Der so geprobte Northern Blot zeigt für *loe* deutlich mehr als nur zwei Transkripte von ca. 2,1 bzw. 2,7kb. Mit einer nur für *loeI* spezifischen Sonde ('loeI'-Sonde, s. Abb. 10) sollte *loeI* unter den Transkripten identifiziert werden (Abb. 9).

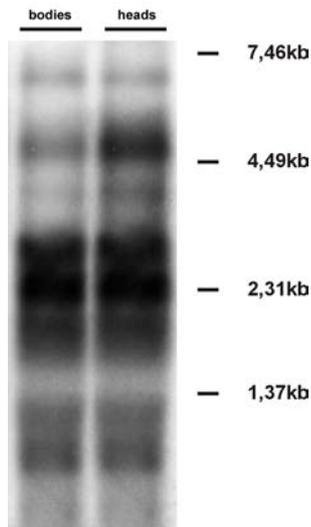


Abb. 8: Northern Blot geprobt mit einer für die CBS-Domänen spezifischen Sonde.

Zu erkennen sind: 1. Es gibt mehr als nur zwei Transkripte mit CBS-Domänen. 2.

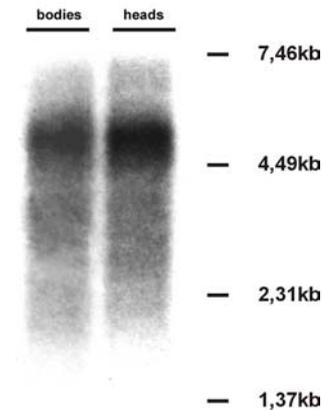


Abb. 9: Northern Blot geprobt mit einer für *loeI* spezifischen Sonde.

Das im vorangeprobten Northern Blot detektierte 4,6kb-Transkript wird mit einer für *loeI* spezifischen Sonde markiert.

Abb. 9 Zeigt, dass das *loeI*-Transkript mit einer Länge von ca. 4,7kb deutlich größer als die bekannte *loeI*-cDNA von 2,183kb ist. Dieser cDNA-Klon konnte folglich nicht als *full length* angesehen werden. Die Klonierung des tatsächlichen 5'-Endes des *loeI*-Transkriptes war somit unerlässlich (s. C. I.4).

3. Klonierung der Transkriptvarianten *loeII*, *loeIV* – *loeIX*

Da die Northern-Blot Experimente mit einer Sonde aus dem Bereich der CBS-Domänen zeigten, dass für *loeI* mehr als nur zwei alternative Transkripte vorhanden zu sein scheinen, wurde nach weiteren homologen cDNAs in den Datenbanken gesucht. Die voranschreitenden Sequenzierprojekt von EDGP/BDGP auf cDNA-Ebene (*Expressed Sequence Tags*) lieferten eine Reihe unabhängiger cDNAs der γ -Untereinheit aus *Drosophila*. Sie wurden bestellt, um-, subkloniert sowie sequenziert und als *loeII* – *loeIX* bezeichnet (cDNA-Nummern s. Abb. 10). Die genauen cDNA-Sequenzen wurden ermittelt, in dem die erhaltenen Sequenzen der einzelnen Transkriptvarianten mit der genomischen Sequenz abgeglichen und die Korrektheit der resultierenden ORF parallel dazu überprüft wurden. Dabei konnte auch die Zuordnung der Intron-/Exon-Struktur erfolgen.

Im Laufe dieser Zuordnung wurde die bisher bekannte zweite Variante in *loeIII* umbenannt, die der P-Element Insertion näher liegende und damit evntl. relevantere als *loeII* bezeichnet. (s.Abb. 10)

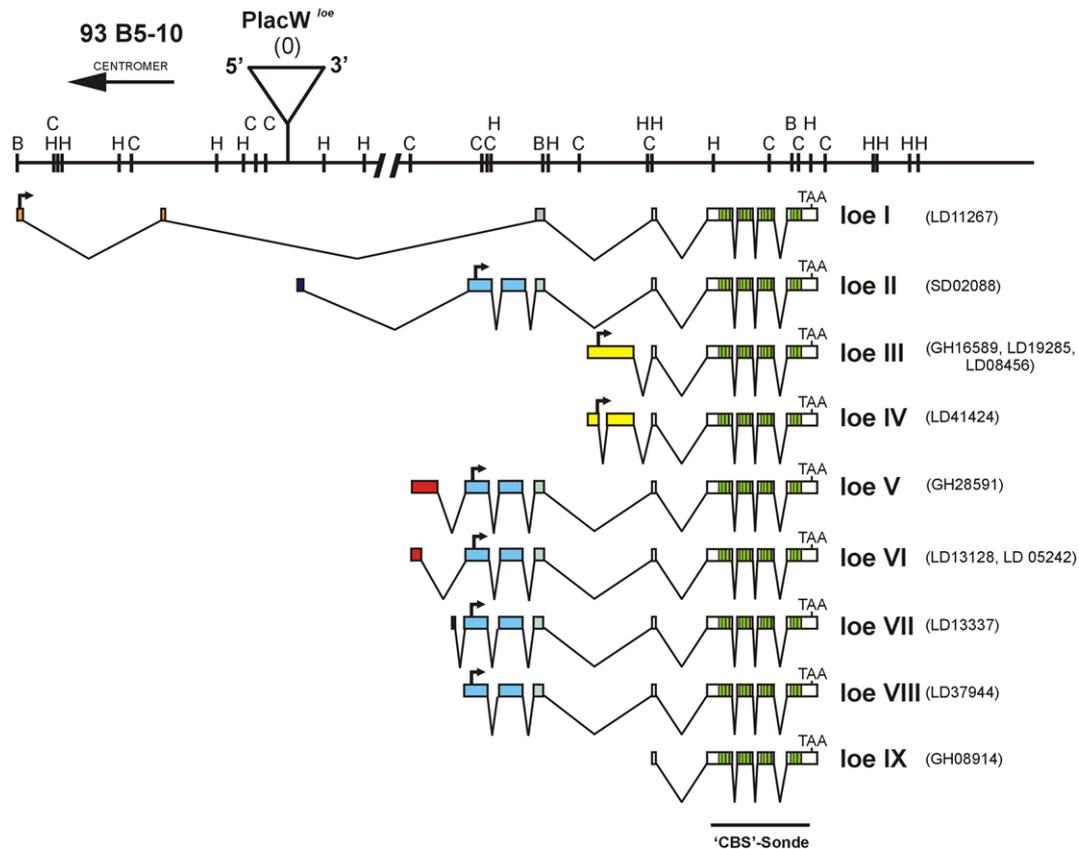


Abb. 10: Die Varianten loeI - loeIX

Gleiche Farben bedeuten gleiche Exons. Ebenfalls eingezeichnet ist das als 'CBS'-Sonde in den Northern-Blot-Experimenten verwendete Fragment (Abb. 8).

Spleißvariante	BDGP-Klon-Nummern	Größe
loeI*	<u>SD02114, LD11345, LP03036, LD45665, LP06189, LD25516, LD35134, LD28468, LD 039906, SD09567, LD11267</u>	4,789kb
loeII	<u>SD02088, RE12750, RE22690</u>	3,205kb
loeIII	<u>GH16589, LD19285, LD08456</u>	2,877kb
loeIV⁺	<u>LD41424</u>	2,690kb
loeV	<u>GH28592</u>	3,685kb
loeVI	<u>LD13128, LD05424</u>	3,321kb
loeVII	<u>LD13337</u>	3,160kb
loeVIII⁺	<u>LD37944</u>	3,125kb
loeIX⁺	<u>GH08914</u>	1,693kb

Tab. 4: Zuordnung der bestellten und sequenzierten cDNA-Klone zu den Transkriptvarianten
full length-Klone unterstrichen; * - s. 4.; + - s. Kapitel Diskussion

4. Klonierung der kompletten cDNA von loeI 'in silico'

Die Untersuchungen im Rahmen der Diplomarbeit (Tschaepe, 1998 #12) zeigten für *loeI* in 5' Richtung zwar einen kompletten ORF, der jedoch nicht in allen drei Leserastern geschlossen war. Desweiteren zeigte der für *loeI* spezifisch geprobte Northern Blot ein Transkript einer Größe von etwa 4,7kb, abweichend von dem bekannten Transkript mit 2,183kb (Abb. 9). So wurden die in 5' Richtung liegenden Fragmente des genomischen Sequenzierungsprojektes nach weiteren Transkripten in den Datenbanken durchsucht. Ausgehend von der 5'-Sequenz des 5'-BamHI-*plasmid rescues* (Abb. 5) wurden die cDNA Klone LD 039906, SD09567 und überlappend nur mit SD09567 der Klon LD28468 isoliert. Davon liegt LD28468 bereits in dem nächsten 5'-gelegenen genomischen Subklon des Sequenzierprojektes (Ac014087). In diesem konnte wiederum Klon LD35134 lokalisiert werden, welcher seinerseits mit SD02114, LD15665 u.a. überlappte (Abb. 11, s.a. Tab. 4). Isolierte Klone wurden bestellt und sequenziert, um die Zuordnung zum Transkript *loeI* zu überprüfen. Es konnten mehrere unabhängige cDNA-Klone isoliert werden, die einem *full length*-Transkript von *loeI* entsprachen. Davon wurden drei (SD02114, LD11345, LP03036) subkloniert und komplett sequenziert. Die genaue cDNA-Sequenz wurde ermittelt, in dem die Sequenzen der partiellen und der vollständigen cDNA Klone mit der genomischen Sequenz abgeglichen und die Korrektheit des resultierenden ORF parallel dazu überprüft wurden. Die so erhaltene Sequenz eines *loeI*-Transkriptes entspricht mit seiner Größe von 4,789kb der in den Northern Blot Experimenten ermittelten mRNA-Länge. Die cDNA zeigt in 5'-Richtung in allen drei Leserastern ein *stop*-Kodon vor dem Translationstart.

Es ist somit das vollständige Transkript für *loeI* kloniert worden. Der Klon SD02114 wurde für alle weiteren Klonierungen und Experimente (z.B. Proteinexpression, *rescue*-Experimente etc.) verwendet.

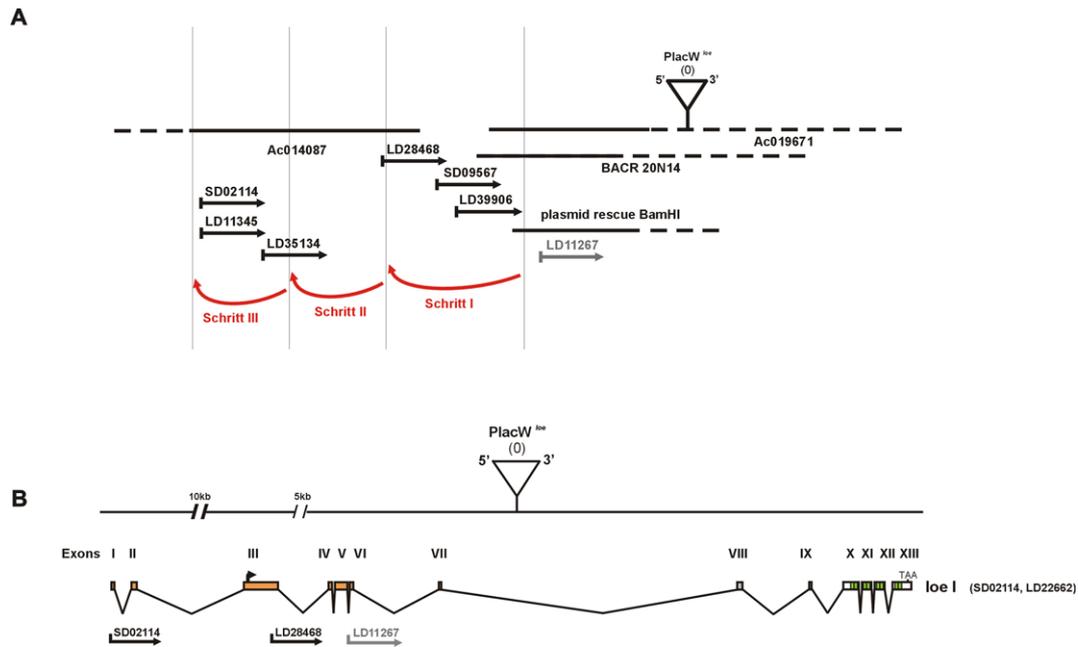


Abb. 11: Die *in silico* Klonierung des 5'-Bereiches von *loeI* – 'virtual RACE'

A. Pfeile mit Nummern repräsentieren die ESTs der cDNAs, keine kompletten Sequenzen. Von den cDNAs, die dem *full length* Transkript von *loeI* entsprechen, sind nur zwei Klone stellvertretend eingetragen. Die ESTs sind im Durchschnitt ca 500bp lang. Waagerechte Linien repräsentieren genomische Klone und *plasmid rescues*.
 B. Das komplette Transkript von *loeI* als Ergebnis dieser Klonierung. Zur Orientierung ist der Beginn der kurzen cDNAs LD28468 und LD11267 eingetragen. SD02114 entspricht der für weitere Experimente verwendeten cDNA.

5. Die unterschiedlichen Genprodukte der Transkriptvarianten I – VII

Die in dem *loe*-Genlocus gefundenen Transkriptvarianten unterscheiden sich nicht nur durch Präsenz oder Fehlen einzelner Exons, sondern bestehen z.T. aus gänzlich unterschiedlichen Exons, welche aus einem gemeinsamen Primärtranskript nur sehr aufwändig *trans*-gespleißt werden könnten. Wahrscheinlicher sind daher mehrere Promotoren. Der untersuchte Genlocus ist im Genom von *Drosophila* der einzige für eine γ -Untereinheit der AMPK.

a) Proteinsequenzen und Domänen

Aus dieser unterschiedlichen Zusammensetzung resultieren somit auch unterschiedliche Proteine mit unterschiedlichen Domänen. Sie lassen sich in drei bis vier Untergruppen teilen:

- LOE I
- LOE II, LOE V –VII
- LOE III/IV

Allen Varianten gemein sind die für die γ -Untereinheit der AMPK charakteristischen 4 CBS (Cystathion- β -Synthase) –Domänen im C-terminalen Teil des jeweiligen Proteins. Um so unterschiedlicher sind dafür die N-Termini der Varianten. Die Transkripte *loeII* sowie *loeV-VII* ergeben

ein in der Proteinsequenz identisches Produkt. Davon unterscheiden sich die Produkte von *loeIII* und *loeIV*, wobei LOE IV eine deletierte Version von LOE III darstellt (Abb. 12). Das LOE I Protein unterscheidet sich von den anderen Varianten vor allem durch den deutlich längeren N-Terminus. Die drei Untergruppen unterscheiden sich auch in ihrem Aufbau hinsichtlich α -Helices und β -Faltblättern.

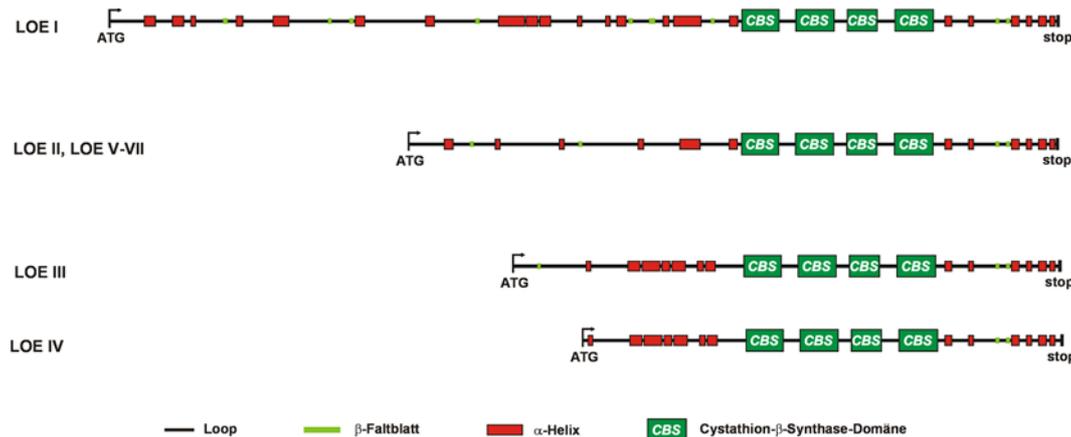


Abb. 12: Die Genprodukte der *loe*-Transkriptvarianten.

Es lassen sich drei Untergruppen erkennen: LOE I, LOEII/V-VII und LOE III/IV. Die strukturellen Voraussagen wurden durch *PHD* und *PREDPROT* auf www.expasy.ch erstellt.

b) LOE I

Das LOE I-Protein hebt sich nicht nur hinsichtlich der Länge des N-Terminus von den anderen Varianten ab. Der auf Neuronen beschränkte Phänotyp und die alleinige Verantwortung von *loeI* dafür (s.u., C. II), suggeriert für LOE I offenbar sehr spezifische Funktionen im Stoffwechsel von Neuronen (C. II). Diese Spezifität ist im N-Terminus des Proteins zu suchen. Die Struktur und mögliche Funktionen dieses N-terminalen Bereiches sollten daher genauer untersucht werden.

Sekundär- und Tertiärstruktur

Die Sekundärstruktur des LOE I-Genproduktes ist in Hinsicht auf α -Helices oder β -Faltblätter in Abb. 12 dargestellt. Eine Voraussage der Tertiärstruktur des N-Terminus von LOE I ist aufgrund mangelnder Strukturhomologien schwierig. Die Verteilung eventueller Bindungs- und Interaktionsmotive kann u. U. mehr zur Aufklärung der Funktion beitragen.

Motive und Domänen

Der N-Terminus des Proteins wurde auf Homologien und Bindungsmotive in Datenbanken untersucht. Dabei standen zwei Fragen im Vordergrund:

1. Gibt es Homologe in Vertebraten, die ebenfalls einen längeren N-Terminus haben?
2. Welche Hinweise geben Motive auf Interaktionspartner?

Kürzlich wurden zwei weitere γ -Untereinheiten aus *Homo sapiens* isoliert (Cheung, 2000 #29). Diese neuen Isoformen zeigen im Gegensatz zu den bislang aus Vertebraten bekannten Orthologen (Kemp, 1999 #28) längere N-Termini ohne bekannte Homologien. Eine Zusammenfassung der Übereinstimmungen zwischen den γ -Untereinheiten aus Vertebraten und LOE I gibt Abb. 13: Die Homologien zwischen LOE I und der AMPK- γ aus Vertebraten wieder. Der zwischen den Spezies hochkonservierte Bereich der CBS-Domänen ist zwischen den humanen Homologen und LOE I zu 53,1%-64,1% identisch und stimmt zu 76%-80% positiv überein. Das Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae* SNF4 ist in diesen Bereich zu 36% identisch (Abb. 13).

Die in 2000 klonierten neuen humanen Isoformen 2 und 3 (Cheung, 2000 #29) mit längeren N-Termini sind hinsichtlich ihrer Übereinstimmung in diesen N-terminalen Bereichen untersucht worden. Die Isoform 3 stimmt zu 17,2% die Isoform 2 zu 18,2% mit dem LOE I-N-Terminus positiv überein. Diese Werte beziehen sich auf die Gesamtsequenzen der verglichenen Bereiche, welche sich hinsichtlich ihrer Länge jedoch enorm unterscheiden und somit diese Werte u. U. anders betrachtet werden müssen (s. D. I). Dennoch ist diese Methode ein Standard für Homologien und somit diese Werte für die Vergleichbarkeit der Übereinstimmungen wichtig.

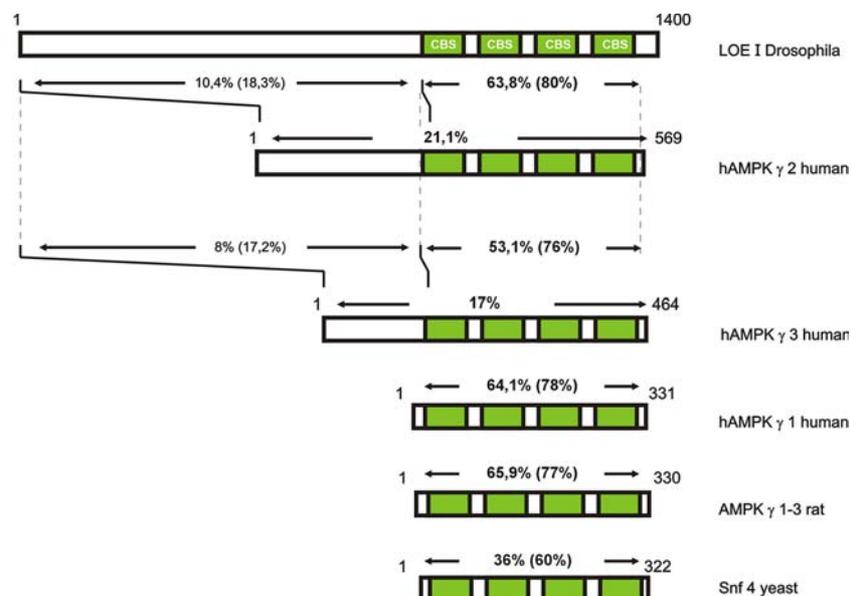


Abb. 13: Die Homologien zwischen LOE I und der AMPK- γ aus Vertebraten

Gezeigt sind hier schematisch die homologen Bereiche zwischen γ -AMPK aus Vertebraten und LOE I. Die Prozentangaben beziehen sich auf Identität bzw. positive Übereinstimmung (in Klammern). Für detaillierte *alignments* s. Abschnitt F.

Da die Homologien des N-Terminus von LOE I zu den humanen Isoformen 2 und 3 der γ -AMPK nicht besonders hoch sind, wurde nach weiteren Homologien auch zu Proteinen ohne CBS-Domänen gesucht.

Es gibt in den öffentlichen Datenbanken keine dem LOE I-N-Terminus hochgradig homologen Proteine. Im Hinblick auf die funktionelle Rolle von LOE I wurde in Datenbanken nach möglichen Interaktionsmotiven, posttranslationalen Modifikationsstellen und Domänenhomologien gesucht. Es wurden eine Vielzahl von Proteinmotiven aus den Datenbanken isoliert, die schwach oder nur über kurze Bereiche zu LOE I homolog sind. Aus diesen Domänen musste eine Auswahl getroffen werden. Folgende Kriterien wurden zur Auswahl herangezogen:

1. Die homologen Domänen sollten nicht überlappen (und sich somit ausschließen).
2. Mit den für LOE I durch genetische Interaktion festgestellten möglichen Wirkungsmechanismen sollte ein Zusammenhang herstellbar sein.
3. Die durch die Homologien vorstellbaren Wirkungsmechanismen durften sich nicht ausschließen.

So ist z. B. eine Rolle von LOE I als Homöoboxprotein oder (mit Prolin-reichen Domänen) dimerisierender Transkriptionsfaktor aufgrund des funktionellen Kontextes der AMPK nicht oder nur schwer vorstellbar und fand hier keine Beachtung. Mangels irgendeiner beschriebenen Funktion wurde hier auch eine deutliche Homologie zu *EAST* (*Enhanced Adult Salt Tolerance*) aus *Drosophila* nicht einbezogen.

Motive posttranslationaler Modifikation wurden hingegen trotz Redundanz und/oder Überlagerung übernommen, da hier keine Auswahl hinsichtlich der Bedeutung getroffen werden konnte. In Abb. 14 sind folgende homologe Domänen in einem detaillierten *alignement* eingezeichnet:

1. Ein X11 α -/mint-2-homologes Motiv (X11 α)
2. Homologien zu dem *Amyloid-like Precursor Protein* (dALPP) aus *Drosophila*.

Eine mögliche Bindungsstelle für Profilin, zwei mögliche Interaktionsstellen der MAP2-Kinase oder von p34^{cdc2} und zwei mögliche Interaktionsstellen mit Proteinen der Klasse IV-WW-Interaktionsdomänenproteine sind ebenfalls im N-Terminus des LOE I-Proteins vorhanden (s. D. I) (Kay, 2000 #30).

Motive der posttranslationalen Modifikation finden sich zahlreich im N-Terminus von LOE I. So sind diverse Glycosylierungsstellen, Phosphorylierungsstellen und Myristylierungsstellen zu finden (s. Abb. 14). Eine Bewertung dieser möglichen Modifikationen wird in D. I besprochen.

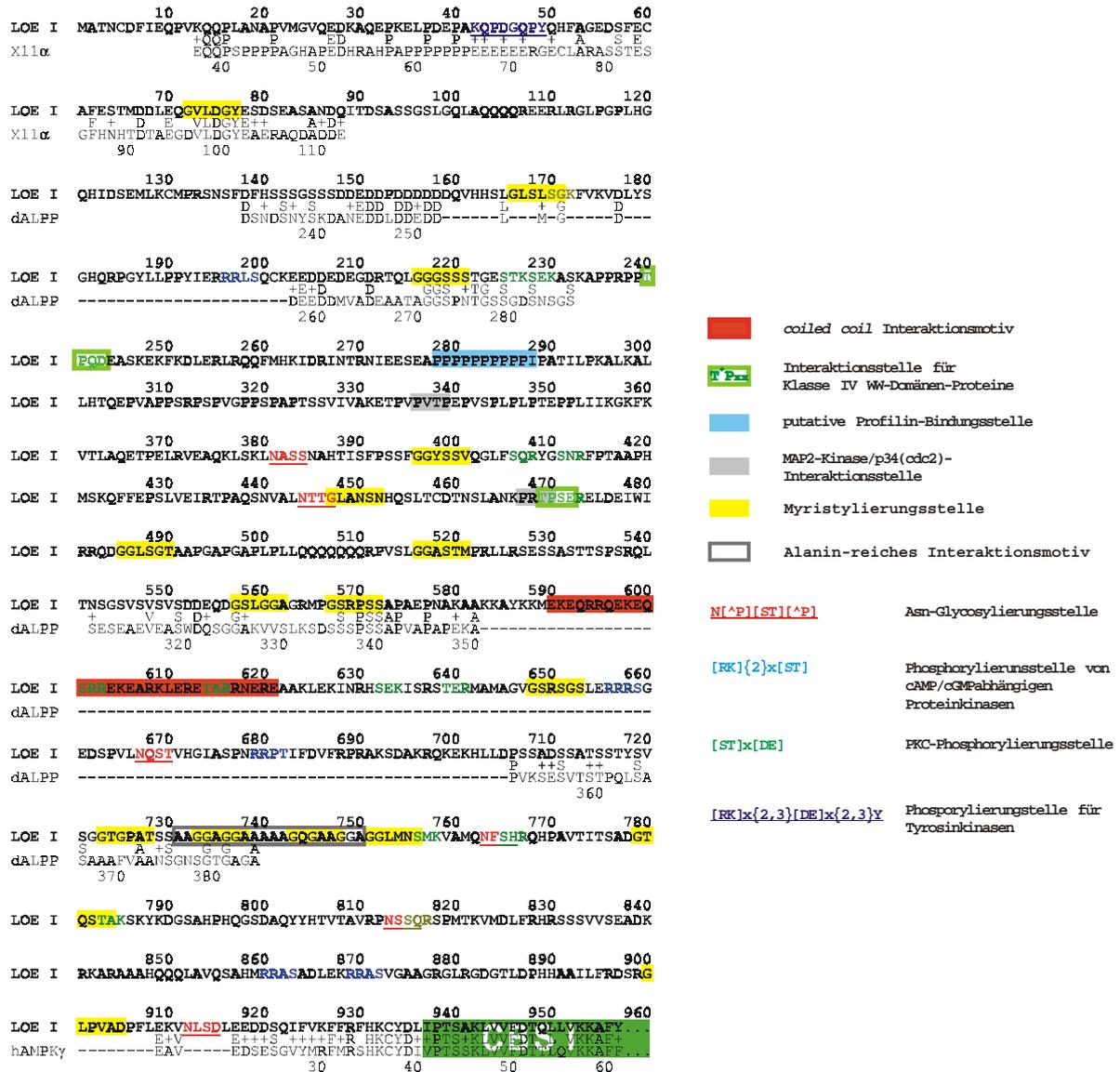


Abb. 14: Eventuell funktionell bedeutende Motive im N-Terminus von LOE I

Im Hinblick auf die funktionelle Rolle von LOE I sind hier mögliche Interaktionsmotive, posttranslationale Modifikationsstellen und Domänenhomologien dargestellt.

Die Motiv-Homologien zu X11α und dem dALPP sind im detaillierten *alignement* eingetragen.

In der entsprechenden Farbe der eingetragenen Sequenz ist in der Legende die Konsensus-Sequenz des Motivs bezeichnet. Ein x steht für jede beliebige AS, {x} für deren Anzahl, [x] stehen für präferenzielle AS an dieser Stelle und [^x] für jede AS außer x.

c) Die GADFly Voraussage für das *loe*-Gen

Mit der Veröffentlichung der genomischen Sequenz von *Drosophila* ging die Voraussage von möglichen und Positionsbestimmung von bekannten Genen im Genom durch Analyseprojekte in verschiedenen Institutionen voran. Einer dieser Dienste ist **GadFly** auf den Servern des BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*). Diese Suchmaschinen verwenden ORFs und deren Produkte, sowie mögliche Homologien dieser Produkte als Kriterien zur Bestimmung von putativen Genen. Diese Voraussagen werden dann z.T. durch Augenschein der betreuenden Wissenschaftler und durch weitere Verfeinerung der vorhergesagten Struktur (Spleißstellen, Promotoren etc.) konkretisiert (Adams, 2000 #22 Rubin, 2000 #23).

Abb. 15 zeigt die Genvoraussagen für die AMPK- γ -Untereinheit (SNF4 γ) in *Drosophila*. Interessanterweise ordnet das Programm die zwischen den Exons von *loeI* liegenden Exons der Formen II, V-VII und III nicht dem Gen zu, auch wenn sich dadurch ein durchgehender ORF ergäbe. Die von E. N. Yoshida 1998 veröffentlichte Sequenz (Yoshida, 1999 #24) einer verkürzten SNF4- γ (entspricht LD11267, s. Abb. 15) gab dazu wahrscheinlich die Vorlage, offen bleibt dann hingegen, warum das in LD11267 und somit auch in der Sequenz von E N. Yoshida enthaltene kleine Exon VII nicht in die Vorhersage miteinbezogen wurde. Zur Komplettssequenzierung des Gens wurde von BDGP der Klon LD22662 ausgewählt, er entspricht mit seinem 5'-EST SD02114 und wurde in der Arbeit nicht untersucht.

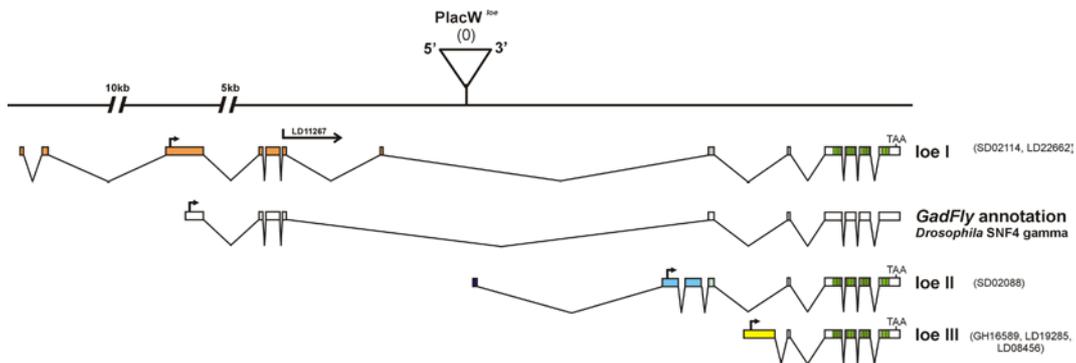


Abb. 15: Die GadFly-Genvoraussage für die AMPK- γ -Untereinheit (SNF4 γ) in *Drosophila*.

Gezeigt sind die annotierten Exons im Vergleich zu den Exons von drei der anderen Spleißformen, deren Exons zwischen den vorausgesagten liegen. Die cDNA-Nummern entsprechen *full length*-Transkripten. Der Klon LD22662 (*loeI*) wurde vom BDGP als Klon zur Komplettssequenzierung ausgewählt, er wurde in der Arbeit jedoch nicht untersucht. Zur Orientierung ist der von Yoshida et al zugrundegelegte cDNA-Klon LD11267 eingetragen.

6. Die α - und β -Untereinheiten des AMPK-Komplexes in *Drosophila*

Der 5-AMP-aktivierte-Proteinkinase-Komplex (AMPK) ist konserviert über die Speziesgrenzen hinweg. Homologe sind in *Saccharomyces cerevisiae* ebenso beschrieben wie in Vertebraten. Dieser Proteinkinasekomplex besteht aus drei Untereinheiten: der katalytischen α -Untereinheit und den regulatorischen β - und γ -Untereinheiten.

In der Bäckerhefe reguliert dieser Komplex bei Glucose-Mangel Energie-intensive Synthesewege durch Phosphorylierung ihrer Schlüsselenzyme herunter. Für den AMPK-Komplex aus Vertebraten wurden ähnliche Wirkungsmechanismen in Abhängigkeit von dem ATP/AMP Verhältnis in der Zelle beschrieben (s.a. D. I). Der Komplex existiert in einer inaktiven und einer aktiven Form, in welche er durch Bindung eines Moleküls 5'-AMP überführt wird.

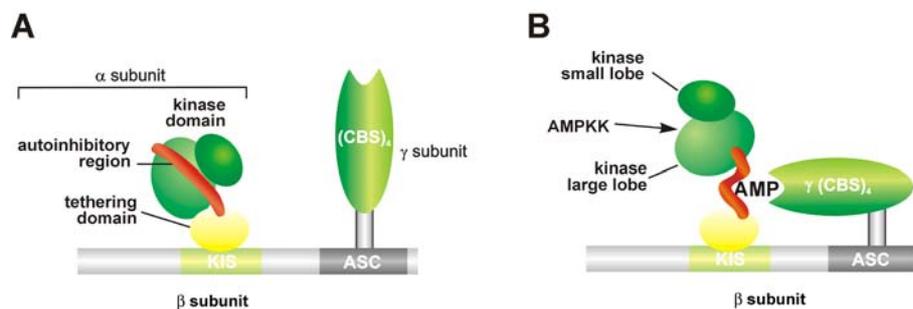


Abb. 16: Der AMPK-Komplex im inaktiven und aktiven Zustand

A. inaktiver Zustand, B. aktiver Zustand (Cheung, 2000 #29)

Die α - und β -Untereinheiten des AMPK-Komplexes in *Drosophila* sind seit der Veröffentlichung der Gen-Annotationen bekannt. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit war lediglich ein fragmentarischer Homologie-Klon der α -Untereinheit in den Datenbanken bekannt, desweiteren eine als prä-mRNA zu wertende Transkriptsequenz. Die β -Untereinheit(en) sind ebenfalls nicht kloniert gewesen. Um eventuelle Interaktionen und eine Überexpression des gesamten Komplexes untersuchen zu können, mussten die Untereinheiten aus Homologievergleichen in Datenbanken isoliert und kloniert werden.

a) Der Genlocus der α -Untereinheit

Ausgehend von homologen Sequenzen der α -AMPK aus Vertebraten konnten aus den cDNA-Sequenzierprojekten zwei cDNA-Klone isoliert werden: GH08222 und GH07170. Nach Subklonierung und Sequenzierung der beiden cDNAs konnten sie als zu einer Isoform gehörig charakterisiert werden. Die bereits in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen für eine α -AMPK in *Drosophila* konnten korrigiert und ergänzt werden. Anhand veröffentlichten genomischen Sequenz des Cosmids 132E8 konnte das Transkript in seiner Intro-/Exon-Struktur aufgeklärt werden (Abb. 17).

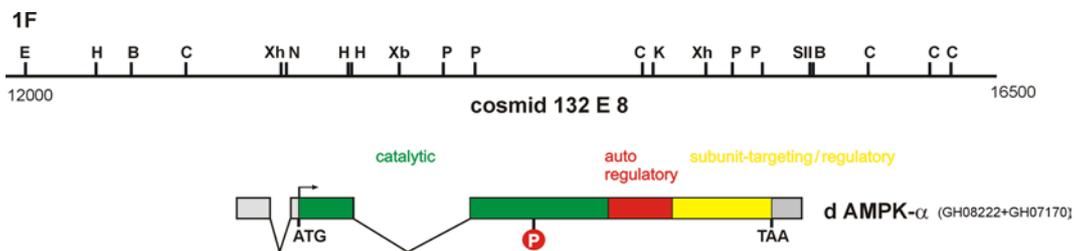


Abb. 17: Das Gen der dAMPK- α

Die Intron-/Exonstruktur der dAMPK- α . **P** bezeichnet die wichtigste regulatorische Phosphorylierungsstelle (Crute, 1998 #25).

Durch Sequenzvergleiche der Proteinsequenzen zwischen dem humanen (Crute, 1998 #25) und dem *Drosophila*-Homolog konnten der dAMPK- α die für diese Untereinheit typischen funktionellen Domänen zugeordnet werden (Abb. 18). Die Homologie erstreckt sich über alle drei Domänen der α -AMPK, dabei steht grün für die katalytische Domäne, rot für die autoregulatorische Domäne und gelb für die regulatorische Domäne, an welche auch die β -Untereinheit bindet (Crute, 1998 #25) (s.a. Abb. 16).

b) Der Genlocus der β -Untereinheit

Ausgehend von homologen Sequenzen der β -AMPK aus Vertebraten konnten aus den cDNA-Sequenzierprojekten drei cDNA-Klone isoliert werden: GH 26685, LD03031 und LD36793. Nach Subklonierung und Sequenzierung der beiden cDNAs konnten sie als zu einer Isoform gehörig charakterisiert werden, wobei GH26685 eine partielle, verkürzte cDNA darstellt. Anhand der Sequenz des genomischen Klons BACR10N14 in der Datenbank konnte das Transkript in seiner Intro-/Exon-Struktur aufgeklärt werden

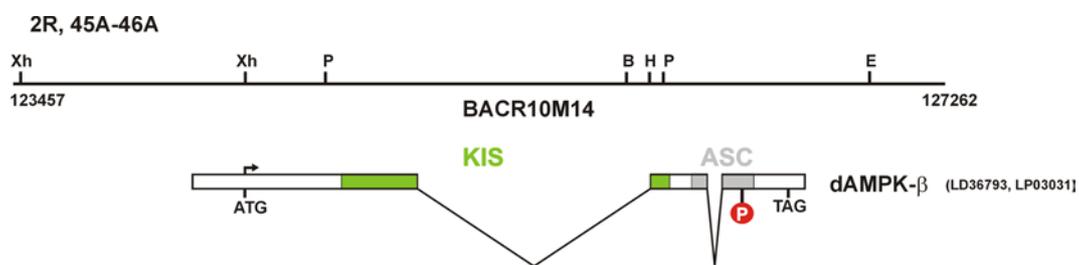


Abb. 19: Das Gen der dAMPK- β

Die Intron-/Exonstruktur der dAMPK- β , **P** bezeichnet die wichtigste regulatorische Phosphorylierungsstelle (Mitchellhill, 1997 #26)

Durch Sequenzvergleiche der Proteinsequenzen zwischen dem humanen und dem *Drosophila*-Homolog konnten der dAMPK- β die für diese Untereinheit typischen funktionellen Domänen zugeordnet werden (Abb. 20). Die Homologie erstreckt sich über diese charakteristischen Domänen der β -Untereinheiten der AMPK, dabei steht grün für die KIS (*kinase interacting sequence*)-Domäne und grau für die ASC (*association with SNF1 complex*)-Domäne (Hardie, 1998 #18) (s.a. Abb. 16).

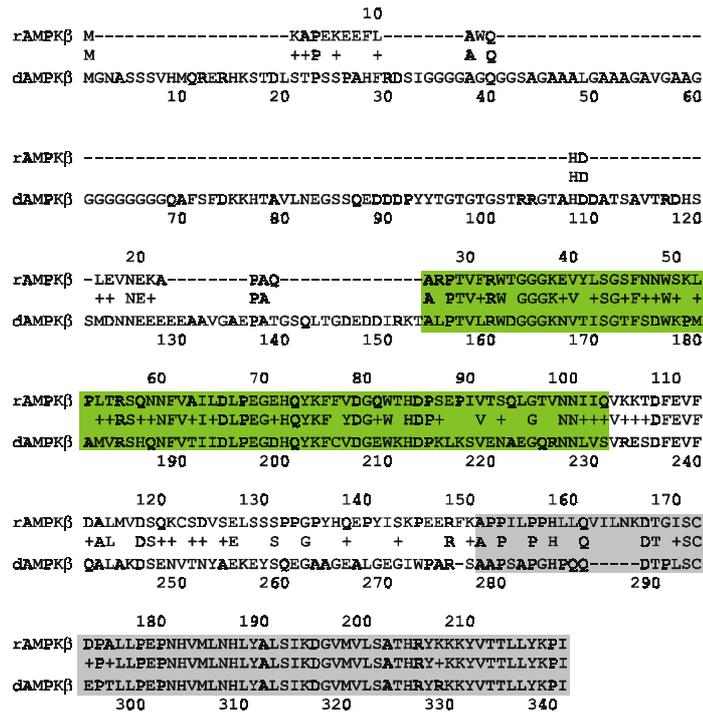


Abb. 20: Die Homologien der AMPK- β zwischen Vertebraten und *Drosophila* und die funktionellen Domänen

Eingezeichnet in grün die KIS (*kinase interacting sequence*)-Domäne und in grau die ASC (*association with SNF1 complex*)-Domäne. Stellvertretend für die Vertebraten-Homologe ist die β -AMPK aus *Rattus norvegicus* verwendet worden.

Die Existenz des AMPK-Komplexes ist mit den drei charakteristischen Untereinheiten in *Drosophila* nachgewiesen worden. Die Transkriptvarianten von *loe* kodieren für die γ -Untereinheit dieses Komplexes. Es wurden darüberhinaus eine α - und eine β -Untereinheit der AMPK kloniert. Im Vergleich mit Homologen aus anderen Spezies sind sie als konserviert zu bezeichnen.

Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der Homologe der drei AMPK-Untereinheiten sind im Anhang in Abb. 54 dargestellt.

II. Die Variante loeI ist für die Mutation und den Phänotyp verantwortlich

Die Insertionsstelle des P-Elementes in *loe* liegt in unmittelbarer Nähe zweier Transkriptvarianten: *loeI* (in Intron VII) und *loeII* (in der vermutlichen Promotor-Region). Von der Insertion können somit beide betroffen sein. Ein erster Hinweis darauf, dass nicht *loeII* für den Phänotyp verantwortlich ist, stammt aus *jump out*-Experimenten (Hammerschmied, 1999 #14): Eine dabei erzeugte Deletion entfernt das erste, allerdings nicht kodierende Exon von *loeII*. Diese Fliegen zeigen keinen *loe*-Phänotyp. Dennoch mußte für beide Transkripte die Verantwortlichkeit für den Phänotyp überprüft werden: Durch Expression der wildtypischen Transkripte im mutanten Hintergrund *in vivo* und molekular durch eventuelle Veränderungen auf mRNA-Ebene.

1. Northern-Blot-Experimente

Zur Charakterisierung des *loe* Phänotyps auf molekularer Ebene wurden Northern-Blot-Experimente durchgeführt. Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Gibt es Veränderungen des Transkriptes *loeI* in der *loe*-Mutante auf mRNA-Ebene?
2. Lassen sich diese Veränderungen charakterisieren?
3. Ist auch die Variante II betroffen?

Es wurden jeweils Kopf- und Körper-Homogenisate des Wildtypes (als wildtypischer Referenzstamm diente *w¹¹¹⁸*, da es der Hintergrundstamm der P-Elementinsertion ist) und der *loe* Mutante miteinander verglichen. Fragestellung 1 wurde durch Hybridisierung mit einer für *loeI* spezifischen Sonde beantwortet (Abb. 21A.). Das Transkript *loeI* ist in *loe* um etwa 1-2kb vergrößert. Ein kleines, kopfspezifisches Transkript von ca. 0,6kb wurde ebenfalls von der Sonde erkannt. Es muß aus Exons komponiert sein, die von der ursprünglich verwendeten 'loeI'-Sonde nicht erfaßt wurden. Dieses Transkript ist in *loe* nicht verändert.

Aufgrund der Lage des P-Elementes im Intron VII des Transkriptes I sind Spleiß-Artefakte in *loe* wahrscheinlich. So wurde zur Klärung der Fragestellung 2 mit einer Sonde aus dem inserierten P-Element-Typ P-lacW hybridisiert (s. Abb. 21B.). Die bereits mit der Sonde für *loeI* detektierte Bande hybridisiert auch mit der Sonde aus dem P-Element P-lacW. Das bedeutet, dass offenbar in *loe* ein Teil des PlacW-Elementes in das *loeI*-Transkript hineingespleißt wird. Desweiteren sind die Transkripte von lacZ (ca. 2,2kb) und mini-*white* (ca.4,5kb) erkannt, da beide Transkripte auf dem PlacW-Element liegen und abgelesen werden. Im Wildtyp läßt sich keine dieser Banden nachweisen.

Das Transkript *loeII* zeigt keinerlei Veränderung in Größe oder Expressionsstärke, wie durch Hybridisierung mit einer für das erste Exon von *loeII* spezifischen genomischen Sonde nachgewiesen

wurde. Zur Kontrolle der aufgetragenen mRNA-Mengen wurde mit einer rp49-Sonde hybridisiert (Abb. 21C.), scheinbare Unterschiede in der Expressionsstärke sind auf die unterschiedlichen RNA-Mengen zurückzuführen: Das gilt für *loe II* in Abb. 21C und das kleine kopfspezifische Transkript in Abb. 21A.

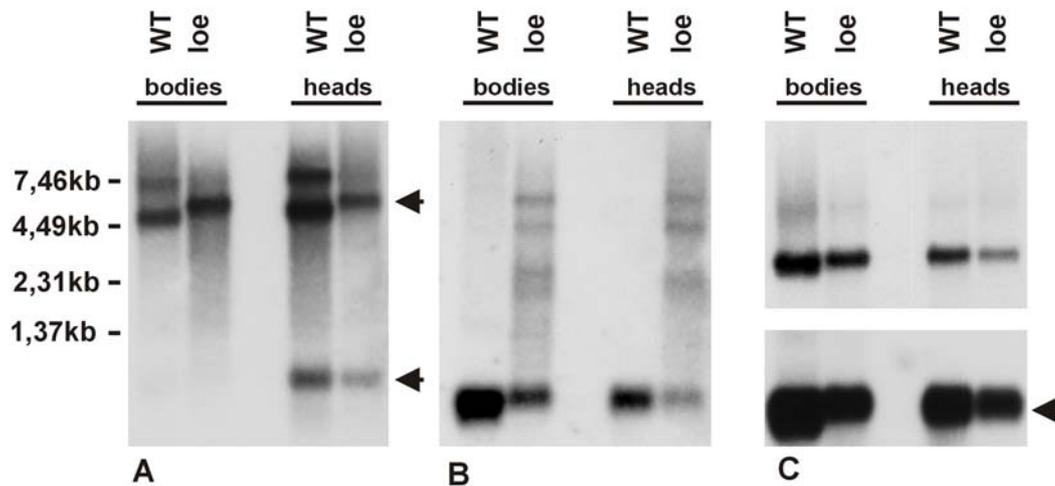


Abb. 21: Northern-Blot-Hybridisierungen zur Charakterisierung des *loe* Phänotypes auf molekularer Ebene.

A. Hybridisierung mit einer für *loeI* spezifischen Sonde: Deutlich zu erkennen ist die Verlängerung des *loeI* Transkriptes in der *loe*-Mutante. Die weitaus größere Bande im Wildtyp muß als unvollständig gespleißtes Transkript gedeutet werden, da sie in vorangegangenen Experimenten nicht detektiert werden konnte (s. Abb. 9). Ein kleines, kopfspezifisches Transkript von ca. 0,6kb wurde ebenfalls von der Sonde erkannt. Es muß aus Exons komponiert sein, die von der ursprünglich verwendeten 'loeI'-Sonde nicht erfaßt wurden.

B. Hybridisierung mit einer aus PlacW generierten Sonde: Zu erkennen sind in *loe* das mini-*white*-Transkript (ca. 4,5kb) das lacZ-Transkript(ca. 2,2kb) und das *loeI*-Transkript (ca. 6kb). Die unteren Banden bei ca. 0,5kb sind Reste der Hybridisierungen mit der rp49-Sonde (s.u.).

C. Hybridisierungen mit einer für *loeII* spezifischen (genomischen) Sonde. Weder in Größe noch in Expressionsstärke ist das *loeII*-Transkript alteriert. Als Mengenkontrolle darunter die Hybridisierung mit einer Sonde für rp49 (Ribosomales Protein 49)

2. Rescue der Mutation und des Phänotypes und Überexpression von *loeI*

Als Beweis dafür, dass ein Phänotyp von einem mutierten Gen verursacht wird, gilt die Reversion des Phänotypes durch Expression einer wildtypischen Kopie dieses Gens im mutanten Hintergrund. Das musste aufgrund der molekularen Befunde trotzdem sowohl mit *loeI* als auch mit *loeII* durchgeführt werden.

a) Konstrukte

Aufgrund der enormen Ausdehnung des *loe*-Genlocus auf genomischer Ebene (55kb) kamen *rescue*-Konstrukte, die den gesamten genomischen Kontext der Transkriptvarianten umfassen nicht in Frage. Auch hätte dieses Verfahren die Transkriptspezifität nicht geklärt. Als Transformationsvektoren wurden pUAST und pINDY-5 (s. B. I.2) verwendet. Abb. 22 zeigt die unterschiedliche Domänen umfassenden Konstrukte. Überprüft werden sollte damit, dass tatsächlich der N-Terminus von *loeI* für eine vollständige Reversion des Phänotypes notwendig ist und die X-11 α -homologe Domäne in Exon I eine Bedeutung für die Funktion von *loeI* und somit für den Phänotyp hat.

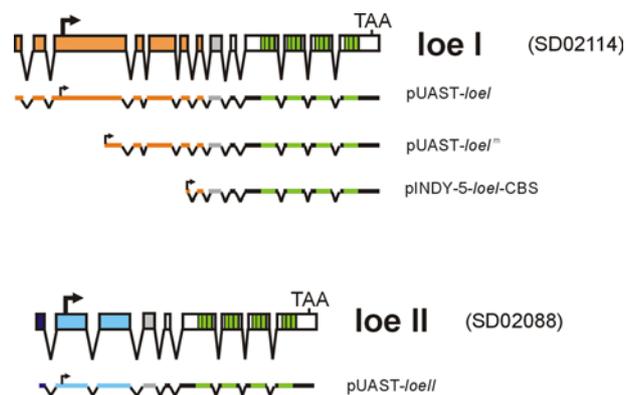


Abb. 22: Die Transformations-Konstrukte von *loeI* und *loeII*

b) Rescue- und Überexpressionsexperimente

Sämtliche Rescue- und Überexpressionsexperimente wurden auf Basis des Gal-4-Systems durchgeführt. Als Promotor-Konstrukte kamen die neuronalen Treiber *Appl-Gal4* und *elav-Gal4*, sowie die glialen Treiber *loco-Gal4* und *MIB-Gal4* zur Verwendung. Im Falle dieser Experimente wurden nur UAS-Konstrukte verwendet, die auf dem X-Chromosom inseriert sind.

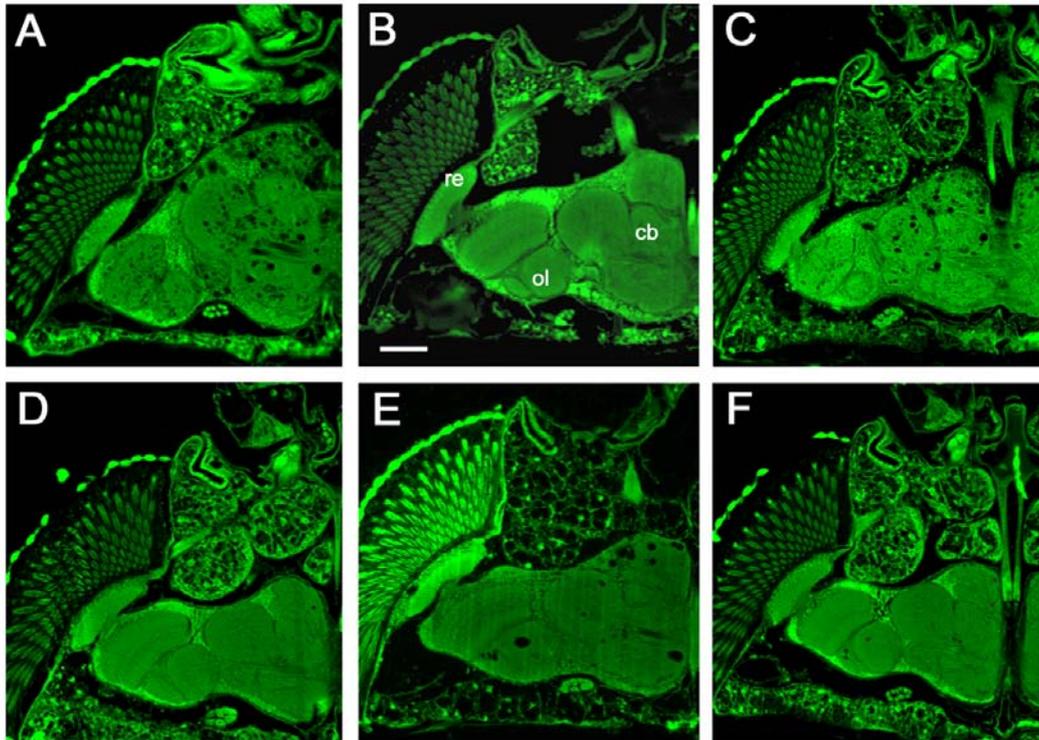


Abb. 23: Rescue-Experimente mit *loeI*- und *loeII*-Konstrukten

Horizontalschnitte durch Gehirne von Fliegen folgender Genotypen (Es sind nur die relevanten Konstrukte und Marker genannt, alle Konstrukte sind lediglich heterozygot, die *loe*-Mutation jeweils homozygot):

A. *loe* B. *W¹¹¹⁸* C. *elav-Gal4* ; UAS-*loeII* ; *loe* D. *elav-Gal4* ; UAS-*loeI* ; *loe*
 E. *elav-Gal4* ; UAS-*loeI*-CBS ; *loe* F. *elav-Gal4* ; UAS-*loeI^m* ; *loe*

Eine Reversion des Phänotypes konnte nur mit den neuronalen Treibern erreicht werden. Mit glialen Treibern konnte das nicht gezeigt werden, was die histologischen Befunde (Nekrose von neuronalen Zellen) in der *loe*-Mutante bestätigt.

Deutlich ist der nur partielle Rescue des Phänotypes durch die beiden verkürzten Konstrukte *loeI*-CBS und *loeI^m* zu ersehen. Dies zeigt die funktionelle Notwendigkeit auch der äußerst N-terminalen Domänen, wie z.B. des X11 α -Homologie-Motives.

Erwartungsgemäß ist die Expression von *loeII* zu keiner Reversion des Phänotypes fähig.

Bei verschiedenen Fehl- bzw. Überexpressionsexperimenten mit den Treibern *Act-Gal4* (zwei Konstrukte), *GMR-Gal4* (zwei Konstrukte) sowie *MIB-Gal4* und *loco-Gal4* konnten keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden (Bildraten nicht gezeigt)

Expression einer konstitutiv aktiven katalytischen α -Untereinheit der AMPK

Expriert man die ersten 312AS der AMPK α aus Vertebraten, erhält man eine konstitutiv aktive AMPK meßbar an ihrer Kinase-Aktivität (Crute, 1998 #25). Um diese Experimente *in vivo* in *Dro-*

sophila zu wiederholen und eventuelle Auswirkungen auf die *loe*-Mutation zu untersuchen, wurde ein entsprechendes Fragment aus der *Drosophila*-cDNA in den pINDY-5-Vektor kloniert (Abb. 24).

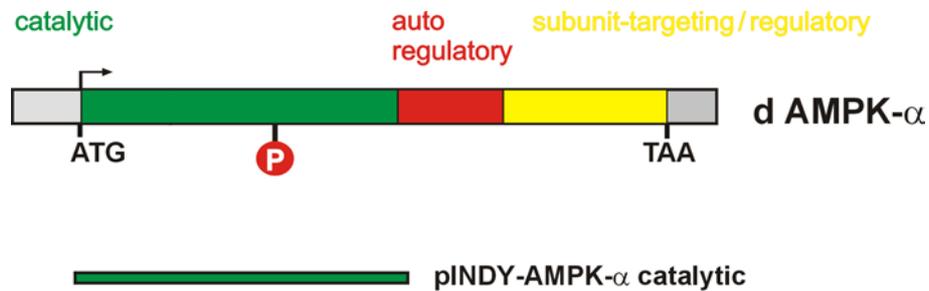


Abb. 24: Das Konstrukt zur Expression einer konstitutiv aktiven α -AMPK

Eine Über- und Fehlexpression dieser konstitutiv aktiven katalytischen α -Untereinheit der *Drosophila*-AMPK in Neuronen und Gliazellen führte ebensowenig zu einer Änderung des *loe*-Phänotypes wie zu einem neuen Phänotyp im wildtypischen Hintergrund (Bildaten nicht gezeigt).

III. Die Expression von *loeI* auf Proteinebene in *Drosophila*

Vorangegangene *in situ*-Hybridisierungsexperimente zur Feststellung der RNA-Expression (durchgeführt von Doris Kretzschmar) ließen für *loeI* eine Expression im gesamten Cortex annehmen. Da aber die Expression eines Gens noch nichts über die Verteilung des Genproduktes aussagt, sind Antikörperfärbungen gegen das LOE I-Protein von Interesse. Die Generierung von polyklonalen Antikörpern wurde aus Kosten- und Zeitgründen der von monoklonalen vorgezogen.

1. Generierung und Charakterisierung der polyklonalen Antikörper

Die Generierung von Antikörpern gegen bekannte Proteine kann im Prinzip auf zwei Wegen erfolgen: Durch Immunisierung der Spendertiere gegen das gereinigte Protein oder gegen besonders antigene, synthetisch erzeugte Peptide. Es werden hierzu Peptide aus der bekannten Aminosäuresequenz der Proteine ausgewählt und durch verschiedene Algorithmen bezüglich Antigenizität und Überlappung mit Epitopen anderer Proteine selektiert.

Da Proteinexpression in *E. coli* und die darauffolgende Reinigung ein zeitaufwendiger Prozess sind, wurde hier die Immunisierung gegen Peptide gewählt. Diese Peptide werden dann synthetisch hergestellt und zur Immunisierung verwendet. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass man die Lage des Epitopes genau kennt.

Zur besseren Charakterisierung der Antikörper wurden allerdings geringe Mengen eines kurzen LOE I-Proteins als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, jedoch nie über Affinitätschromatografie o.ä. aufgereinigt (s.u.). Zur Verwendung kam hierbei das Konstrukt pQE 32 *loe*-CBS (s. Abb. 29).

a) 1. Charge (Firma Pineda)

Eine erste Charge Antikörper wurde bei der Firma Dr.Pineda Antikörper Service (Bitterfelderstr.19, 12681 Berlin) bestellt. Es wurden dort Peptide aus den N-Termini von LOE I und LOE III ausgewählt (die Variante *loeII* war zu diesem Zeitpunkt noch nicht isoliert). Auch entsprach dieses LOE I dem Produkt der kurzen cDNA LD11267 (Abb. 10), welche auch zur Produktion des Fusionsproteins (s.o.) verwendet wurde, da die vollständige cDNA von *loeI* zu diesem Zeitpunkt noch nicht kloniert war.

Peptidsequenzen:

Peptid I aus LOE I: NH₂ - CADGTQSTAKSKYKDGSAHPHQGSD - COO

PeptidII aus LOE III: NH₂ - CHHVSRRDDSQSHSHSESP – COO

Die Peptide sind in ihrer Lage zu den Exons der Transkriptvarianten I und III in Abb. 28 dargestellt.

Immunisiert wurden mit Peptid I und II je 2 Kanninchen und je ein Meerschweinchen. Die finalen Antikörperfraktionen wurden über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt geliefert.

Westernblots zur Charakterisierung

Die als Zwischenproben genommenen sog. *bleeds* wurden auf Western-Blots auf ihre Reaktivität gegen das LOE I-Protein getestet, um den aktuellen Titer des Antikörpers in den immunisierten Tieren zu verfolgen und das Ende der Immunisierung festzulegen. Eine detektierbare Änderung ließ sich nicht verfolgen und so wurde die Immunisierung maximal ausgedehnt. Auf optimierten Western-Blots konnte für den *anti-LOE I GP*-AK (*GP* steht für *guinea pig* - Meerschweinchen) gezeigt werden, dass er eindeutig mit dem in *E. coli* exprimierten Fusionsprotein reagiert, in *Drosophila*-Kopfhomogenaten allerdings kein eindeutiges Signal ergibt (Abb. 25). Die am stärksten erkannte Proteinbande liegt mit >240kDa deutlich über den erwarteten 190kDa des LOE I-Proteins. Der zwischen W^{1118} und *loe* zu erkennende Unterschied ist nicht reproduzierbar.

Die aus Kanninchen gewonnenen Antikörper konnten auch gegen das Fusionsprotein nicht positiv getestet werden.

Die gewonnenen Antiseren waren auch bei histologischen Untersuchungen an Kryostatschnitten nicht spezifisch.

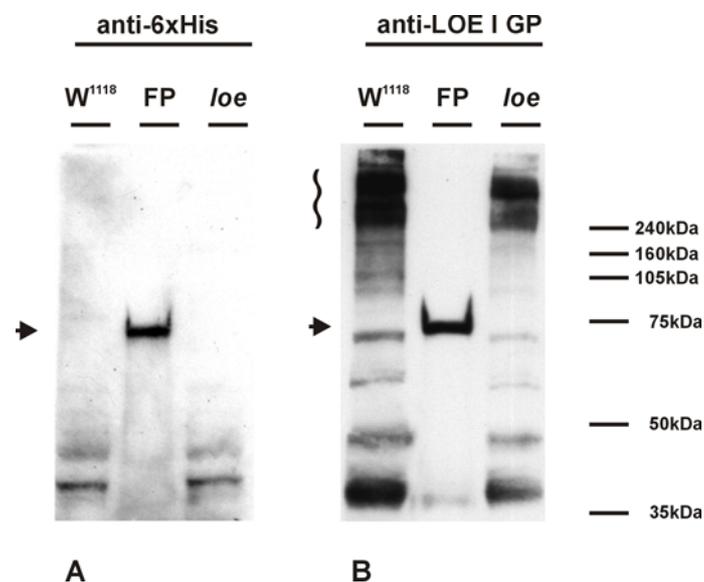


Abb. 25: Western Blot zur Charakterisierung des Antikörpers *anti-LOE I GP*

A. Western-Blot geprobt mit dem monoklonalen AK gegen das RGS-6xHis-Epitop; zu erkennen ist die 75kDa Bande des Fusionsproteins (FP) (Pfeil)

B. Der selbe Westernblot geprobt mit dem *anti-LOE I GP*-AK. Das Fusionsprotein wird von diesem AK spezifisch erkannt (Pfeil). Die Spezifität in Kopfhomogenisaten ist nicht befriedigend. Die am stärksten erkannte Proteinbande liegt mit >240kDa deutlich über den erwarteten 190kDa des LOE I-Proteins. Der zwischen W^{1118} und *loe* zu erkennende Unterschied (Wellenlinie) ist nicht reproduzierbar. Auch scheint das Epitop-tragende Protein der Degradation zu unterliegen. Sekundärer anti-GP-HRP-AK 1:10 000 verdünnt.

Mit den *bleeds* aus gegen LOE III immunisierten Tieren wurde, wie oben für die anti-LOE I-Antikörper beschrieben, verfahren. Abb. 26 zeigt die drei gewonnenen Antiseren im Vergleich. Als am spezifischsten stellte sich der *anti-LOE III-R1-AK* (- **Rabbit 1**) heraus. Die Größe von LOE III beträgt in Übereinstimmung mit der Größenkalkulation auf Basis der Proteinsequenz etwa 90kDa. Das mit aufgetragene kurze LOE I-Fusionsprotein aus *E coli* wird von diesem AK richtigerweise nicht erkannt.

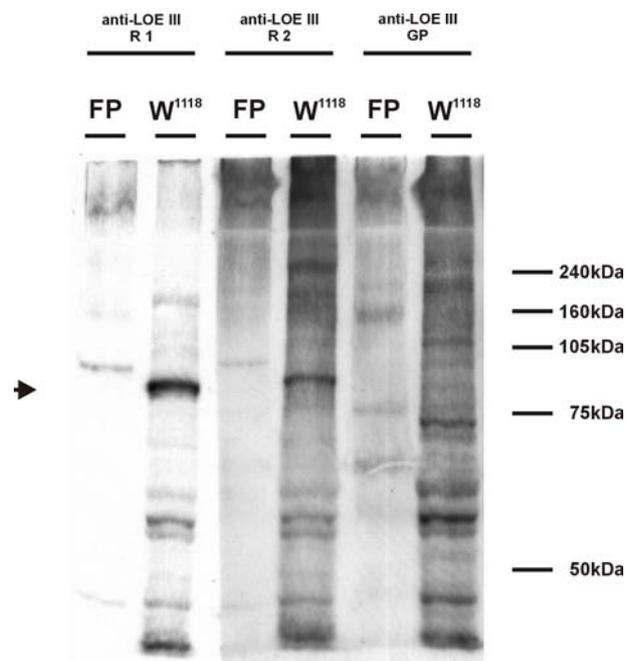


Abb. 26: Western-Blot zum Vergleich der Immunoreaktivität der drei gegen LOE III erhaltenen Antiseren

Als am spezifischsten stellte sich der *anti-LOE III-R1-AK* (- **Rabbit 1**) heraus. Die Größe von LOE III beträgt in Übereinstimmung mit der Größenkalkulation etwa 90kDa (Pfeil).

Das aufgetragene kurze LOE I-Fusionsprotein (FP) wird von diesem AK richtigerweise nicht erkannt. GP steht für *guinea pig* - Meerschweinchen

Histologie

Aufgrund der Spezifität des *anti-LOE III-R1-AK* wurden damit histologische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden Kryostat-Schnitte mit dem Antikörper in einer Verdünnung 1:1000 inkubiert und mittels des *ABC-VectaStain*-Systems entwickelt (Abb. 27).



Abb. 27: Immunhistologische Färbung für *anti-LOE III-R1-AK* an einem Gehirn-Horizontalschnitt

Es ist deutlich eine Färbung der Retina zu erkennen (Pfeile). Die Variante loeIII ist offenbar für die Photorezeptoren spezifisch.

Die gegen LOE I generierten Antikörper lieferten in der Histologie keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt)

b) 2. Charge (Firma Davids Biotechnologie)

Da die Ergebnisse mit dem ersten Antikörper gegen LOE I im Western-Blot nicht befriedigten wurde eine weitere Charge Antikörper, diesmal gegen den N-Terminus des kompletten LOE I (entspricht dem Produkt der cDNA SD02114) generiert. Wieder wurde die Peptidimmunisierung der Immunisierung mit Protein vorgezogen. Allerdings wurde parallel dazu die Expression und Reinigung des N-Terminus-Fragmentes von LOE I in *E. coli* aus zwei Gründen begonnen (s. C. III.1.c):

1. Die Immunisierung gegen Peptide hatte bei der 1. Charge bei LOE I nicht zum Erfolg geführt. Eine Immunisierung gegen das gereinigte Protein könnte größeren Erfolg haben.
2. Die neuen Antiseren können nicht gegen das bereits verwendete, kurze LOE I-Fusionsprotein getestet werden, da es die gewählten Epitope nicht enthält.

Peptidsequenzen

Es wurden folgende Peptide aus dem N-Terminus (Exon V) von LOE I ausgewählt:

Peptid III $\text{NH}_2 - \text{CRPRAKSDAKRQK} - \text{COO}$

Peptid IV $\text{NH}_2 - \text{CAKSKYKDGSAPHP} - \text{COO}$

Die Peptide sind in ihrer Lage zum Exon V der Transkriptvariante I in Abb. 28 dargestellt.

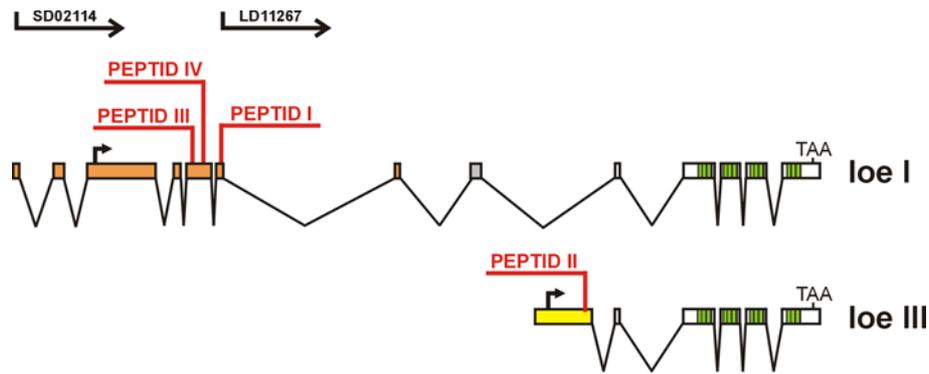


Abb. 28: Die als Epitope gewählten Peptide in ihrer Lage relativ zu den Exons von *loeI* und *loeIII*

Zur Orientierung sind die Anfänge der cDNAs LD11267 und SD 02114 eingezeichnet. Bei der Generierung der 1. Charge von Antikörpern (Peptid I+II) galt LD11267 als *full length*-Transkript, das tatsächliche (SD02114) war noch nicht bekannt. Bei Auswahl der Peptide der 2. Charge wurde die kompletten Sequenz von *loeI* zugrunde gelegt.

Mit den Peptiden wurden je ein Kaninchen und ein Huhn immunisiert. Die finalen Antikörperfraktionen wurden über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt geliefert.

Westernblots zur Charakterisierung

Die zur Überwachung des Antikörpertiters im immunisierten Tier bislang durchgeführten *bleed*-Tests entfielen, da sie von der Firma *Davids Biotechnologie* durch auf *ELISA* basierenden Tests ersetzt wurden. Die gereinigten Antikörper wurden direkt in Western-Blots eingesetzt (s. Abb. 33).

c) Expression von *loe I*-Konstrukten in *E. coli*

Zur eventuellen Immunisierung und zum Antikörpertest wurde jeweils parallel zu den Peptid-Immunisierungen versucht, das Peptidmotiv enthaltende Proteine in *E. coli* zu exprimieren. Zur Anwendung kam hierbei ausschließlich das System *QiaExpressionist*[®] von *QiaGen*. Das System beruht auf einer IPTG induzierbaren Expression von Fusionskonstrukten, dessen Produkte aufgrund der fusionierten 6xHistidin-Motive über Nickel-NTA-Matrizes isoliert werden können (Details s. *QiaExpressionist*)

(1) Konstrukte

Zum Austesten der anti-LOE I-Antikörper der ersten Charge (s.o.) wurde ein kurzes *loeI*-Fragment inklusive der CBS –Domänen von *loeI* exprimiert und isoliert (pQE 32-*loe*-CBS, s. Abb. 29). Für *loeIII* wurde auf diesen Schritt angesichts geringerer Bedeutung dieser Variante für die Mutation *loe* verzichtet.

Aus den oben genannten Gründen wurde für die zweite Charge auch eine Immunisierung gegen gereinigtes Fusionsprotein aus *E. coli* erwogen.

Dafür war die Expression eines Fusionsproteins vonnöten, das folgende Eigenschaften besitzt:

Es musste die beiden für die 2. Charge gewählten Peptid-Epitope enthalten.

Es durfte nicht die allen *loe*-Spleißformen gemeinsamen CBS-Domänen enthalten, da sonst bei einer Immunisierung gegen dieses Portein kein LOE I-spezifischer Antikörper zu erhalten ist.

Die Expressionskonstrukte zur Expression des kurzen LOE I-Fusionsproteins und die Konstrukte zur Expression des N-Terminus von LOE I unterscheiden sich somit deutlich voneinander (s. Abb. 29).

Da sich das isoliert exprimierte N-terminale Fragment von LOE I als sehr instabil erwies, wurde versucht durch Verkürzung der Konstrukte dieses Problem zu umgehen (pQE32-*loeI*-Nterm II-IV).

In den Westernblotanalysen (s.u.) konnte eine schon in der uninduzierten Kultur vorhandene Expression des Fusionsproteins beobachtet werden. Das sollte durch Veränderung des Repressionsmechanismus mit der Verwendung von Vektoren der pQE80er-Serie verhindert werden. Diese Vektoren tragen den Repressor sowie das Fusionskonstrukt, die Haltung von zwei Plasmiden in einem Bakterien-Klon mit zwei verschiedenen Resistenzmarkern kann so umgangen werden und der Induktionseffekt stärker gestaltet werden.

Zur besseren Zugänglichkeit des fusionierten Motivs bei der Aufreinigung wurde ein weiteres Konstrukt mit dem Vektor pQE-70 hergestellt, dessen Produkt das 6xHis-Motiv am C-Terminus fusioniert hat (s. Abb. 29).

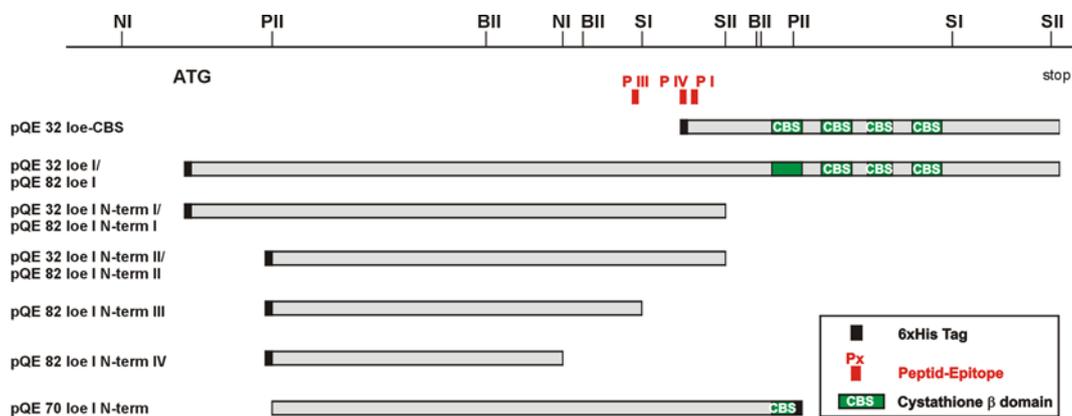


Abb. 29: Die Proteinexpressionskonstrukte in pQE-Vektoren des *QiaExpressionist*-Systems

Gezeichnet sind die unterschiedlichen Konstrukte im Verhältnis zum gesamten Transkript (entspricht pQE-32/82-*loeI*) Domänen und fusionierte Peptide s. Legende)

Zur Orientierung sind auch die drei Peptid-Epitope in LOE I eingezeichnet.

(2) Westernblotanalyse von Lysaten aus *E. coli*-Expressionskulturen

Proben der Expressionskulturen wurden nach den Empfehlungen im *QiaExpressionist* entnommen und unter denaturierenden Bedingungen verarbeitet. Die denaturierenden Bedingungen wurden gewählt, da sich das RGS-6xHis-Epitop in ersten Tests für den AK nur dann als zugänglich erwies,

wenn die Proben unter Zugabe von 8M Harnstoff aufgeschlossen wurden (Abb. 30). Diese Tests wurde mit dem Konstrukt pQE32-loe-CBS durchgeführt.

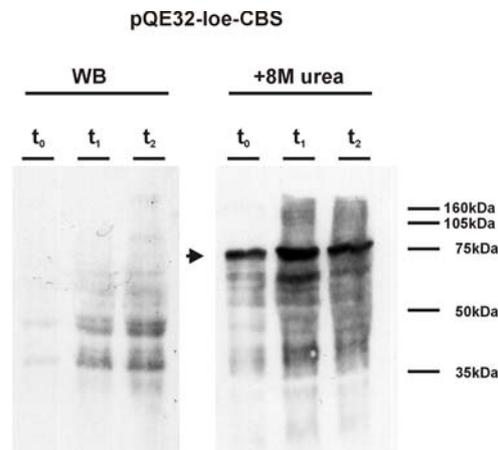


Abb. 30: Expression von pQE32-loe-CBS in *E. coli*; Vergleich der Aufschlußarten

Western-Blot geprobt mit anti-RGS-6xHis-AK

t₀ – Probe vor der Induktion mit IPTG, t₁ – 1h nach der Induktion, usw.

Der Pfeil weist auf das exprimierte Fusionsprotein mit einer erwarteten Größe von ca. 75kDa. Deutlich ist auch, dass das Konstrukt in erheblichem Maße auch schon ohne Induktion zur Expression kommt.

WB steht für 2xWestern Buffer.

Beispielhaft für die Expression von Konstrukten des N-Terminus von loeI in *E. coli* sollen hier die Experimente mit pQE-loeI-NtermII und pQE82-loeI-NtermI gezeigt werden (Konstrukte s. Abb. 29).

Wie in Abb. 31 zu sehen ist, kann keines der beiden Konstrukte stabil und ohne Degradation des Proteins exprimiert werden (Abb. 31). Zusätzlich dazu traten bei Expression des Konstruktes pQE82-loeI-NtermI Abbruchartefakte auf, d.h. die Translation des Fusionsproteines wurde vor dem eigentlichen *stop*-Kodon abgebrochen. Das Resultat sind Doppel- oder multiple Banden (s. Abb. 31 B). Ebenfalls wird deutlich, dass keines der beiden Repressionssysteme eine Expression der Konstrukte ohne Induktion verhindert.

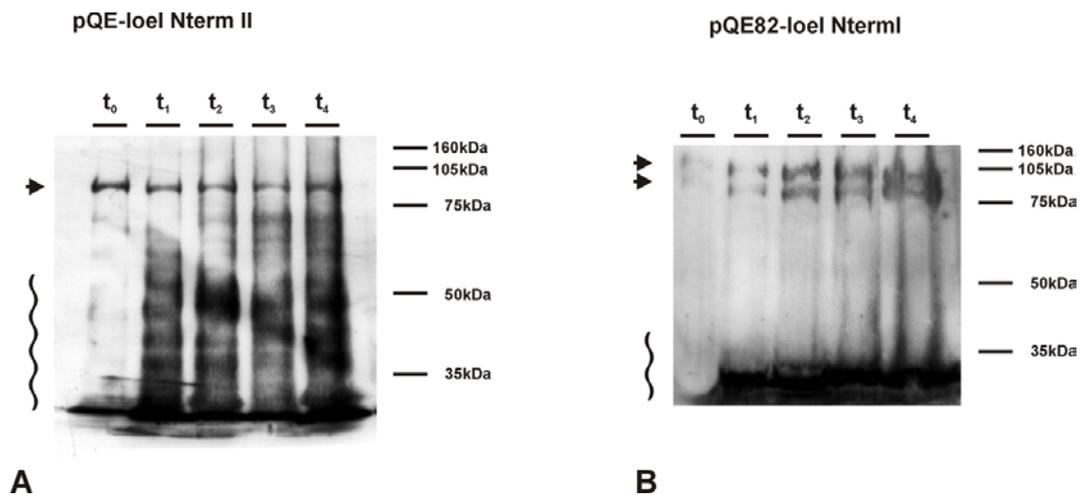


Abb. 31: Expression von pQE32-loe-I-NtermII und pQE82-loe-NtermI in *E. coli*

Western-Blot geprobt mit anti-RGS-6xHis-AK

A. Der Pfeil weist auf die erwartete Größe des exprimierten Fusionsproteins. Deutlich ist die mit laufender Induktion zunehmende Degradation des Expressionsproduktes (Wellenlinie) zu erkennen.

B. Deutlich sichtbar sind die beiden prominenten Produkte der Expression, wobei die obere Bande in der Größe dem erwarteten Produkt von ca. 105kDa entspricht; die untere ist als Abbruchprodukt zu werten. Trotz des geänderten Repressionsmechanismus ist eine Expression in der uninduzierten Probe nachzuweisen.

Eine weitere Verkürzung der fusionierten Fragmente des *loeI*-N-Terminus konnten die Degradationsprobleme nicht lösen.

Einzig die Expression des Konstruktes pQE70-loe-I-Nterm lieferte ein stabiles Produkt. Die Besonderheit dieses Konstruktes liegt darin, dass aus Klonierungs-technischen Gründen die erste CBS-Domäne mit in dem Fusionskonstrukt enthalten ist. Da CBS-Domänen aufgrund ihrer kompakten tertiären Struktur gegenüber dem weniger strukturierten restlichen N-Terminus von LOE I als mehr antigen einzustufen sind, eignen sich Proteinpräparationen aus dieser Expression schlecht zur Immunisierung von Tieren mit dem Ziel, einen LOE I-spezifischen Antikörper zu erhalten. Die Antikörper aus den Peptid-Immunisierungen können aber gegen dieses Expressionsprodukt getestet werden, da es die gewählten Peptid-Epitope beinhaltet.

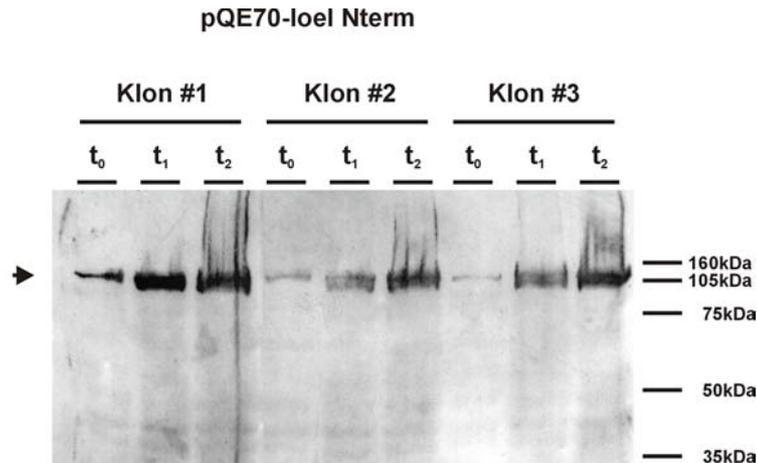


Abb. 32: Expression von pQE70-loe-I-Nterm in *E. coli*

Das erhaltene Produkt entspricht in seiner Größe (ca. 100kDa) den Erwartungen, es ist nicht degradiert. Deutlich auch in diesen Experimenten zu sehen: Die Repression funktioniert nicht optimal, in den uninduzierten Proben (t_0) ist bereits Proteinexpression nachzuweisen (Pfeil). Die Klone 1-3 zeigen darüberhinaus unerwartet unterschiedliche Expressionsstärken.

Da im Verlauf dieser Arbeiten funktionelle Antikörper aus den Peptid-Immunisierungen gewonnen werden konnten, wurden weitere Versuche abgebrochen, die Expression dieser Fusionsproteine in *E. coli* zu optimieren (z.B. unter Verwendung einfach- oder multipel-Protease-defizienter *E. coli*-Expressionsstämme).

2. Westernblotanalyse von Gehirnhomogenisaten

Mit den Antikörpern der zweiten Charge wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Dabei sollten eventuelle Veränderungen in der Größe des LOE I-Proteins in *loe* untersucht werden. Die Größe des detektierten Proteins entspricht im WT wie in *loe* nicht den erwarteten 152kDa. Das detektierte Protein hat ein ungefähres Gewicht von ca. 250kDa. Verantwortlich sein könnten dafür Myristylierungen oder Phosphorylierungen, welche durch die verwendeten Aufschlussmethoden nicht entfernt werden konnten. Denkbar ist auch die feste Einbindung in einen Komplex, der nicht aufgelöst werden kann, jedoch während der Denaturierung aggregiert.

Der erwartete Größenunterschied zwischen dem LOE I-Protein in WT und *loe* ließ sich aufgrund des unscharfen Laufverhaltens der Aggregate nicht reproduzieren. Das LOE I-Protein ist in Embryonen nicht nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

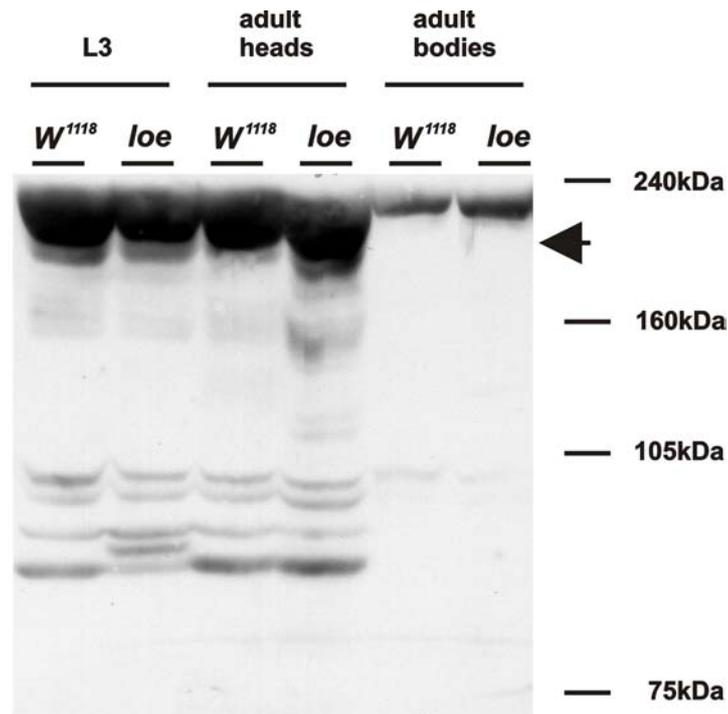


Abb. 33: Das LOE I-Protein in der Entwicklung im Vergleich Wildtyp und *loe*

Aufgetragen wurden: je 50 Embryonen, 10 larvale Gehirne, 5 adulte Köpfe und 1 Hinterleib.

Der scheinbare Größenunterschied des LOE I Proteins in *loe* Kopfpräparationen (geschlossener Pfeil) ist nicht reproduzierbar.

anti-LOE I-R1-AK 1:1000 verdünnt. Film 2,5min exponiert.

Um Proteinaggregate aufzulösen kann man zu härteren Denaturierungsmethoden greifen als die Denaturierung mit SDS. Um LOE I aus einem möglichen Aggregat oder Komplex herauszulösen, wurden die Proben mit einem Puffer denaturiert, der 8M Harnstoff enthält. Nach einer Denaturierungszeit von 15min konnte eine Bande der Größe von ca. 160kDa detektiert werden, die in etwa der Größe von LOE I entspricht (Abb. 34). Dabei wurde jedoch ca. 90% der Epitop-Reaktivität verloren, was sich durch die lange Exponierzeit von 1,5h (im Vergleich zu 2,5min in Abb. 33) zeigt.

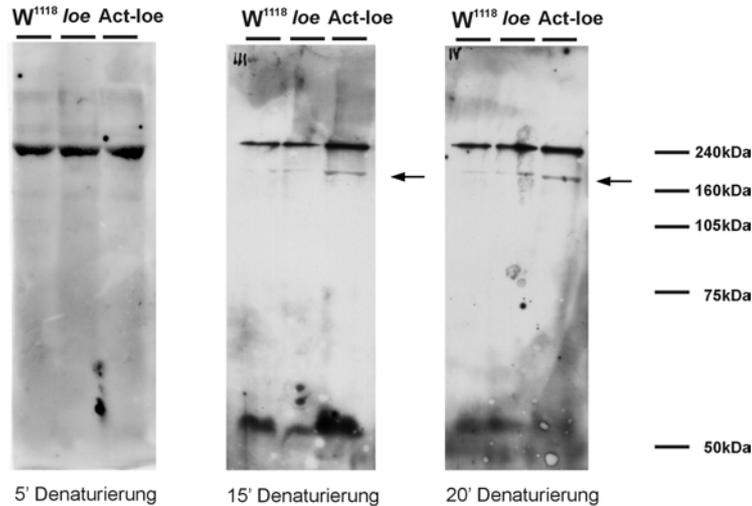


Abb. 34: Stärkere Denaturierung kann LOE I aus den Aggregaten herauslösen

Nach einer Denaturierungszeit von 15min in 8M Harnstoff konnte eine Bande der Größe von ca. 160kDa detektiert werden (Pfeil), die in etwa der Größe von LOE I entspricht (152kDa). Dabei wurde jedoch ca. 90% der Epitop-Reaktivität verloren, da die Exponierzeit auf **1,5h** angehoben werden musste.

anti-LOE I-R1-AK 1:1000 verdünnt.

Die Spezifität des Antikörpers lässt sich aber daran erkennen, dass in der Überexpression von UAS-*loeI* mit Act-Gal4 (Abb. 34) eine deutliche Zunahme des Signals zu erkennen ist. Das vom *anti-LOE I-R1-AK* erkannte Epitop ist also im LOE I-Protein enthalten. Für eine genauere Charakterisierung von LOE I im Vergleich zwischen WT und *loe* müssten die Denaturierung weiter optimiert werden und gegebenenfalls um chemische Prozessierungen (Demiristylierungen, Deacetylierungen o.ä.) ergänzt werden.

3. Lokalisierung der LOE-I Distribution an Kryostatschnitten

Mit dem in den Western-Blot-Experimenten als am spezifischsten reaktiven charakterisierten anti-LOE I-Antikörper (*anti-LOE I-R1-AK*) wurden histologische Untersuchungen angestellt. Es wurden Kryostat-Schnitte mit dem Antikörper in einer Verdünnung 1:1000 inkubiert und mittels des *ABC-VectaStain*-Systems entwickelt. LOE I ist nicht, wie man aufgrund des generellen neurodegenerativen Phänotypes vermuten könnte, in allen Neuronen exprimiert, sondern in einer distinkten Untergruppe von Nervenzellen (Abb. 35). Dennoch exprimieren im zentralen Teil des Gehirns mehr Zellen LOE I als im optischen System, was mit dem Phänotyp in *loe* korreliert (mehr und eher Degeneration im Zentralbereich als in den periferen Teilen oder dem optischen System, s. Abb. 3) Eine in Stärke oder Lokalisation geänderte Expression von *loeI* in der *loe*-Mutante lässt sich nicht erkennen. Da das Epitop topologisch vor der P-Element-Insertion liegt, ist auch kein Unterschied zu erwarten, da auch in *loe* LOE I-Protein produziert wird (Daten nicht gezeigt).

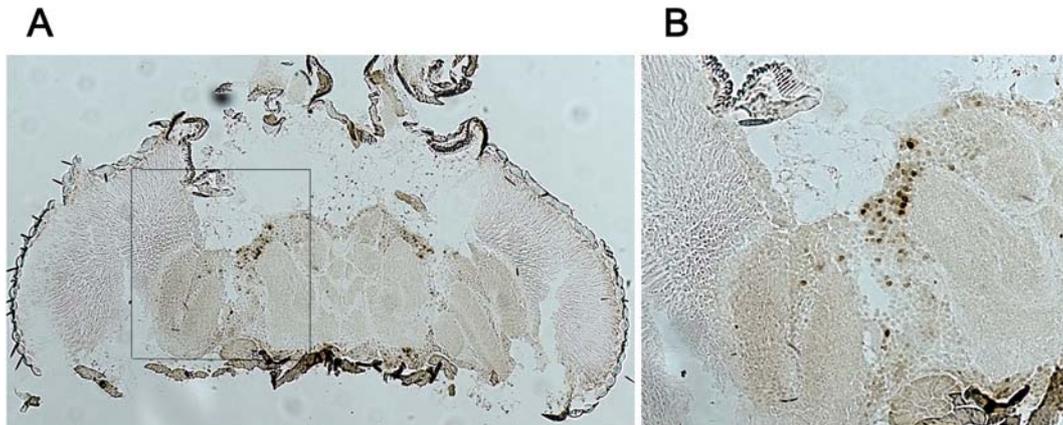


Abb. 35: Immunhistologische Färbung für *anti-LOE I-R1-AK* an Gehirn-Hizontalschnitten

Die Expression von LOE I ist auf eine Untergruppe von Neuronen beschränkt (Pfeile). In diesen Zellen ist die Expression allerdings vergleichsweise hoch. Ein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante lässt sich nicht feststellen. *anti-LOE I-R1-AK* 1:1000 verdünnt.

A. WT^{CS} Horizontalschnitt

B. Vergrößerung aus A (Neuaufnahme, der Ausschnitt entspricht in etwa der Box in A.)

IV. Erzeugung weiterer letaler Allele von *loe*

Da die *loe*-Mutation homozygot lebensfähig ist und aufgrund der Northern-Blot-Daten und der anti-LOE I-Antikörperfärbungen nicht davon auszugehen war, dass *loe* eine Null-Mutante ist, wurden im Rahmen der Diplomarbeit von C. Hammerschmied Rekombinationsexperimente unter Ausnutzung der *male recombination* nach dem HEI (**H**ybrid**E**lement**I**nsertion)-Prinzip durchgeführt (s. Abb. 36 und (Hammerschmied, 1999 #14). Als Rekombinationsmarker diente *ebony* (proximal) und *curled* (distal). Bei dieser speziellen Form der Rekombination in *Drosophila*-Männchen kommt es u. U. zu größeren Deletionen, Duplikationen oder Inversionen (Preston, 1996 #16).

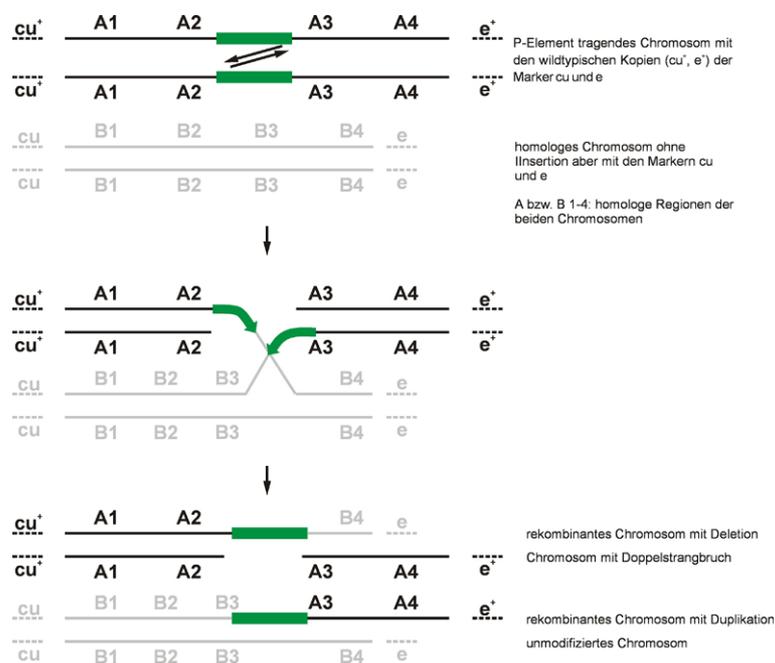


Abb. 36: Rekombinationen nach dem HEI-Prinzip
nach Preston et al (Preston, 1996 #16)

Ziel dieser Experimente war, homozygot letale *loe*-Allele zu erzeugen, die aufgrund der Größe des *loe*-Genlocus nicht durch z.B. herkömmliche *jump-outs* erzeugt werden konnten. Die rekombinanten Stämme zeigten über der Originalmutation den *loe*-Phänotyp und waren über der den *loe*-Genlocus überspannenden Defizienz 93B3-D2 letal, bzw. steril im Falle der Rekombinante R4 (Hammerschmied, 1999 #14).

1. Charakterisierung der isolierten Deletions- und Inversionsrekombinanten

Um die genaue Größe und Position der zugrunde liegenden genomischen Aberrationen zu charakterisieren, sollten die rekombinanten Linien mit molekularen Methoden untersucht werden.

Die Zahl der zu charakterisierenden rekombinanten Stämme belief sich nach Überprüfung der Phänotypen über der genannten Deletion und der *loe*-Mutation auf 12 Linien (Tab. 5).

Die Rekombinanten besitzen vermutlich alle ein inseriertes P-lacW-Element sichtbar an der orangenen Augenfarbe (Ausnahme R51), da sie ausgehend von der originalen P-Element-Insertion erzeugt wurden. Aus R51 konnten keine *plasmid rescues* gewonnen werden, da diese Linie wahrscheinlich keine intakten P-Element-Anteile mehr trägt. Auch für die Linien R6, R12 und R41 verliefen die *plasmid rescue*-Experimente negativ.

Tab. 5 faßt die Ergebnisse der *plasmid rescue*-Experimente zusammen.

Linie	<i>or</i> +/-	rekombinierter Marker	Typ der chromosomalen Veränderung	<i>plasmid rescue</i> möglich	5'-Position*	3'-Position*	Größe der chromosomalen Veränderung
R4	+	<i>e</i>	Deletion	+	@ -65 von PlacW ^{loc}	original	65bp
R6	+	<i>cu</i>	-	-	-	-	-
R12	+	<i>cu</i>	-	-	-	-	-
R8	+	<i>cu</i>	Translokation und Deletion	+	101F, BACN05O16 @35660	101F, BACN05O16 @23119	~12kb
R9/R10	+	<i>cu</i>	Deletion und Inversion	+	original	Ac019641 @37028	~92kb
R14/R17	+	<i>cu</i>	Deletion	+	original	Ac019641 @29843	~74kb
R37	+	<i>cu</i>	Translokation und Duplikation	+	original	89B11-89C2 Ac007641 @136436 49A2-49B8 Ac016021 @5036	?
R39	+	<i>cu</i>	Translokation	+	original	89B-89C Ac009840 @50522	?
R41	+	<i>cu</i>	-	-	-	-	-
R51	-	<i>cu</i>	-	-	-	-	-

Tab. 5: Zusammenfassung der molekularen Charakterisierung der *loe*-Rekombinanten

or – Augenfarbe als Hinweis auf ein intaktes *mini-white* und damit auf vorhandenes P-Element.

* Die Angaben zur Lokalisation beruhen auf den cytologischen Positionen (s.u.) der genomischen Klone, zu denen die Sequenzen der *plasmid rescues* homolog sind. Dazu sind die exakten Insertionsstellen (@...) in den genomischen Klonen der Sequenzierprojekte angegeben (Ac... oder BAC...),

cytologische Positionen: 1-20 X-Chromosom, 20-60 2. Chromosom, 61-100 3. Chromosom, 102-102 4. Chromosom.

Es konnte in vier Linien Aberrationen nachgewiesen werden, die die *loe*-Transkriptionseinheit vollständig entfernen: R9/10 und R14/17. Die erzeugten Deletionen dehnen sich in distaler Richtung aus, deletieren allerdings mehrere weitere Gene distal von *loe* (Abb. 37). Die homozygote Letalität in diesen Linien ist somit nicht unbedingt im Zusammenhang mit der Deletion des *loe*-Genlocus zu

sehen.

Im Falle der Linie R4 ist die Sterilität evntl. auf ein Fehlen des *loeII*-Transkriptes zurückzuführen, da die Deletion die Region des Promotors von *loeII* entfernt.

In den Linien R37 und R39 haben sich kompliziertere Umlagerungen ereignet, die nachzuweisenden P-Element-Insertionsorte liegen in anderen genomischen Regionen des 3. Chromosoms (Region 89B-C) bzw. auf dem 2. Chromosom (Region 49A-B, Linie R37). Im Falle der Linie R37 hat darüberhinaus eine Duplikation des re-inserierenden P-Elementes stattgefunden.

In der Linie R8 ist das P-Element nach dem Rekombinationsereignis auf dem 4. Chromosom (Region 101F) inseriert.

Mögliche Mechanismen der Aberrationen werden in der Diskussion erörtert (C. IV.1).

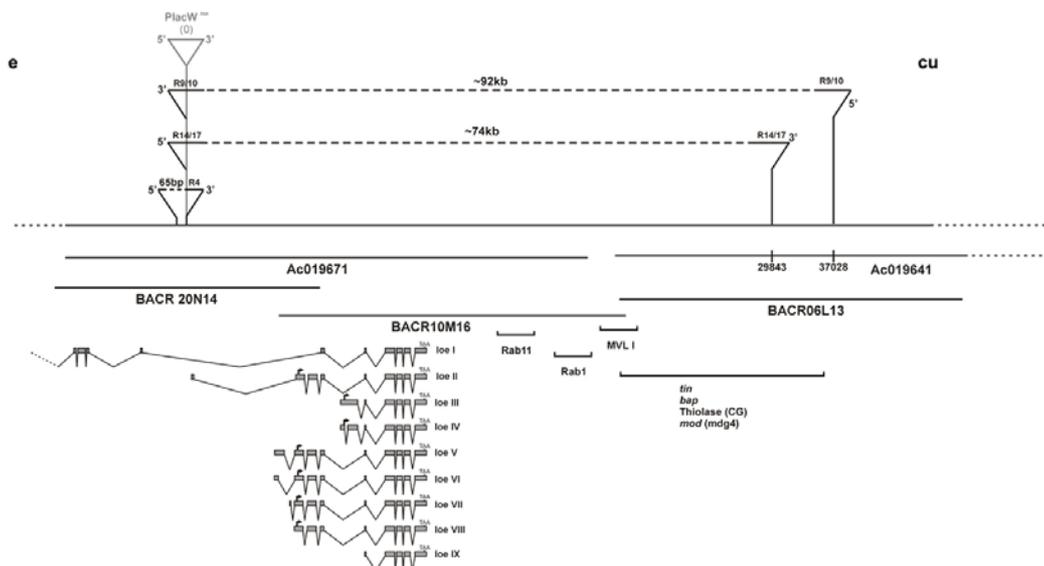


Abb. 37: Karte der genomischen Region von *loe* und die Rekombinationsereignisse

BACR ... – genomische Klone des ursprünglichen *Drosophila* Sequenzierprojektes (BDGP/EDGP)

Ac ... – genomische Klone des *CELERA*-Sequenzierprojektes

Die von den Defizienzen überspannten Gene sind nur ihrer ungefähren Position nach eingezeichnet.

V. Charakterisierung der Funktion des LOE I-N-Terminus

1. Yeast-two-hybrid-Screens

Die funktionelle Spezifität des LOE I-N-Terminus bringt die Frage nach spezifischen Interaktionspartnern mit sich. Eine Methode, solche Protein-Protein-Interaktionen zu finden und zu untersuchen sind *yeast two hybrid*-Screens. Die Wahl fiel auf das *Matchmaker-2*-System der Firma Clontech, da anfänglich nur für dieses System eine *Drosophila*-cDNA-Expressionsbibliothek erhältlich war. Das System beruht auf der Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors durch die Interaktion zwischen zwei Proteinen im Nukleus von Hefezellen. Transaktivierungs-Domäne und DNA-Bindungsdomäne von Gal4 sind auf zwei getrennten Vektoren kodiert, das Zielprotein wird in Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne, die Bibliothek in Fusion mit der Transaktivierungsdomäne exprimiert und in den Kern importiert (Clontech, 1998 #47).

Da die Screens mit dem *Matchmaker-2*-System keine große Ausbeute an möglichen Interaktionspartnern von LOE I ergaben, wurde nach einem anderen System gesucht.

Das CytoTrap[®]-System (Stratagene) beruht darauf, die Temperatur-sensitive *Ras*-Aktivierungskaskade in Hefen des *cdc25H*-Stammes zu rekonstituieren.

Dabei ist das Zielprotein in Fusion mit dem humanen *cdc25*-Homolog *hSos* exprimiert, die Bibliothek in Fusion mit dem Myristylierungssignal von *hSos*. Mit der Interaktion zwischen dem Zielprotein und einem Protein aus der Expressionsbibliothek wird *hSos* an der Membran lokalisiert. Es kann dort wieder als Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor wirken und über die Bindung an *Ras* und nachfolgende Aktivierung von *Ras* die Kaskade aktivieren und den Temperatur-sensitiven Hefen ein Wachstum bei der restriktiven Temperatur ermöglichen. Der problematische Kernimport wird dadurch umgangen. Auch werden so Interaktionen überhaupt erst möglich, die eine posttranslationale Modifikation der beteiligten Proteine erfordern.

a) Konstrukte

In den einzelnen Screens sollten eventuelle Bindungspartner des N-Terminus und der (allen Isoformen gemeinsamen) CBS-Domänen getrennt isoliert werden. Abb. 38 gibt die Konstrukte wieder, die für die Screens und/oder Verifikationen verwendet wurden. Die Konstrukte wurden für beide Systeme prinzipiell gleich gestaltet, lediglich erfolgte die Klonierung entsprechend der Erfordernisse der unterschiedlichen Vektoren in andere Restriktionsschnittstellen und damit die Erzeugung der Fragmente mit anderen PCR-Primern.

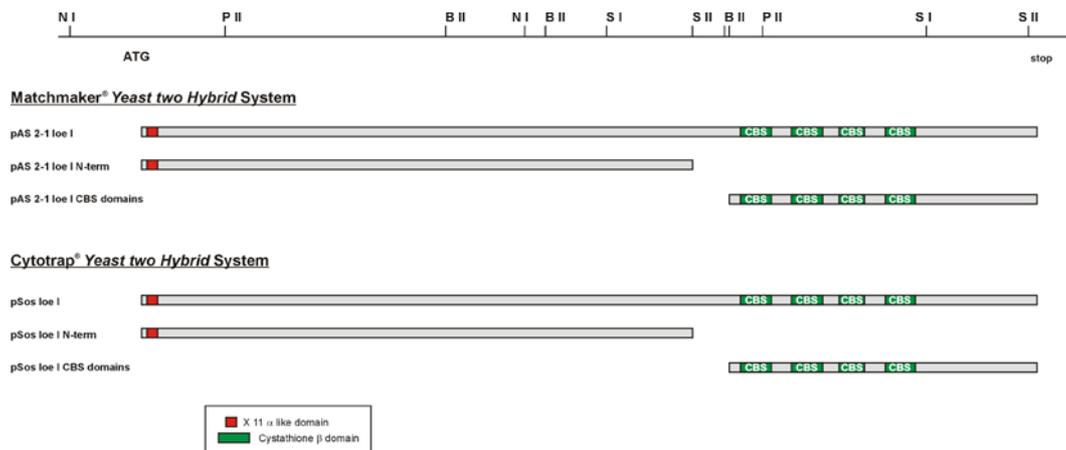


Abb. 38: Konstrukte in den Vektoren pAS-2-1 und pSos für die *yeast two hybrid*-Screens

Die Konstrukte wurden für beide Systeme prinzipiell gleich gestaltet, lediglich erfolgte die Klonierung in andere Restriktionsschnittstellen und damit die Erzeugung der Fragmente mit anderen PCR-Primern.

b) Screens mit dem *N-Terminus von LOE I*

Es wurden für den LOE I-N-Terminus insgesamt 5 Screens durchgeführt, dabei konnten nur in zwei Screens mit dem *Matchmaker-2*-System positive Klone isoliert werden.

Positive Klone müssen zusätzlich zur revertierten Histidin-Auxotrophie folgende Kriterien erfüllen:

1. Der lacZ-Reportertest muss positiv ausfallen.
2. Eine eventuelle Homologie muss in Bezug auf die Transaktivierungsdomäne im selben Leseraster liegen, da das ermittelte Protein sonst nicht in Fusion exprimiert wurde.

Aus den zwei positiv verlaufenen Screens mit dem N-Terminus von LOE I erfüllte nur eine Interaktionsklon reproduzierbar diese Kriterien: Dieser Klon kodiert für das NiPSNAP-Protein (4-NitrophenylPhosphatase-SNAP-25-like).

Diese Interaktion konnte sowohl in *yeast two hybrid*-Experimenten mit den ursprünglich verwendeten Konstrukten (pAS2-1-loeI-Nterm und pAct-NiPSNAP), als auch in Versuchen mit dem kompletten LOE I-Protein verifiziert werden. Eine Interaktion dieses Proteins mit den CBS-Domänen aus *loe* konnte nicht nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen NiPSNAP ist somit eindeutig funktionell dem N-Terminus von LOE I zuzuordnen.

Das NiPSNAP-Protein besitzt Homologien zu einer Nitrophenyl-Phosphatase und zu SNAP-25, einem Protein, das bei der Membranfusion von Vesikeln eine Rolle spielt. Die Interaktion mit LOE I erscheint auch insofern sinnvoll, da auch für APPL eine Rolle im Vesikeltransport diskutiert wird (Gunawardena, 2001 #54) und *loe* wiederum mit *App1* interagiert (s.a. D. V).

c) Screens mit dem CBS-Fragment

Mit dem die CBS-Domänen enthaltenden Fragment wurden Screens zur Isolierung von anderen β - und α -Untereinheiten durchgeführt. Das konnte nicht erreicht werden. Die Erklärung lieferten Cheung et al zum Ende der Arbeiten hin, die in ihren Experimenten zeigen konnten, dass die β - und γ -Untereinheit über den N-Terminus der γ -Untereinheit an einander binden (Cheung, 2000 #29), welcher in den hier verwendeten Konstrukten nicht enthalten war. Die Interaktion der γ - mit der α -Untereinheit wiederum geschieht nur im kompletten Komplex unter Bindung eines AMP (s. D. I, Abb. 49).

d) Screens mit dem CytoTrap[®]-System

Die Durchführung von *yeast two hybrid*- Screens nach dem CytoTrap[®]-System (Stratagene) konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beendet werden. Lediglich die Klonierung der dazu notwendigen Konstrukte konnte abgeschlossen werden.

VI. *loeI* und der Cholesterin-Stoffwechsel

Die Regulation eines Enzymes durch die AMPK ist in Vertebraten besonders gut charakterisiert: die Regulation der HMG-CoA-Reduktase durch Phosphorylierung (Hardie, 1998 #18). Deshalb wurde eine mögliche genetische Interaktion zwischen *loe* und *clb* (*columbus*, Mutante des *Drosophila* HMG-CoA-Reduktase-Gens) untersucht.

1. Die HMG-CoA-Reduktase hat Einfluss auf die *loe*-Mutation

Das Homolog der HMG-CoA-Reduktase in *Drosophila* ist *columbus* (*clb*). Die Mutante ist homozygot letal (Van Doren, 1998 #21). Um eine eventuelle genetische Interaktion zu zeigen wurde eine *loe-clb/loe*-Mutante erzeugt und in Neuronen die *clb*-cDNA im *loe*-Hintergrund überexprimiert. Während die Reduktion der *clb*-Expression um eine Kopie den *loe*-Phänotyp abschwächt, verstärkt die Expression einer zusätzlichen Kopie *clb* den *loe*-Phänotyp (Abb. 39). Zur Quantifizierung der Vakuolisierung wurde ein Kalkulationsprogramm von R. Wolf verwendet (Heisenberg, 1995 #20).

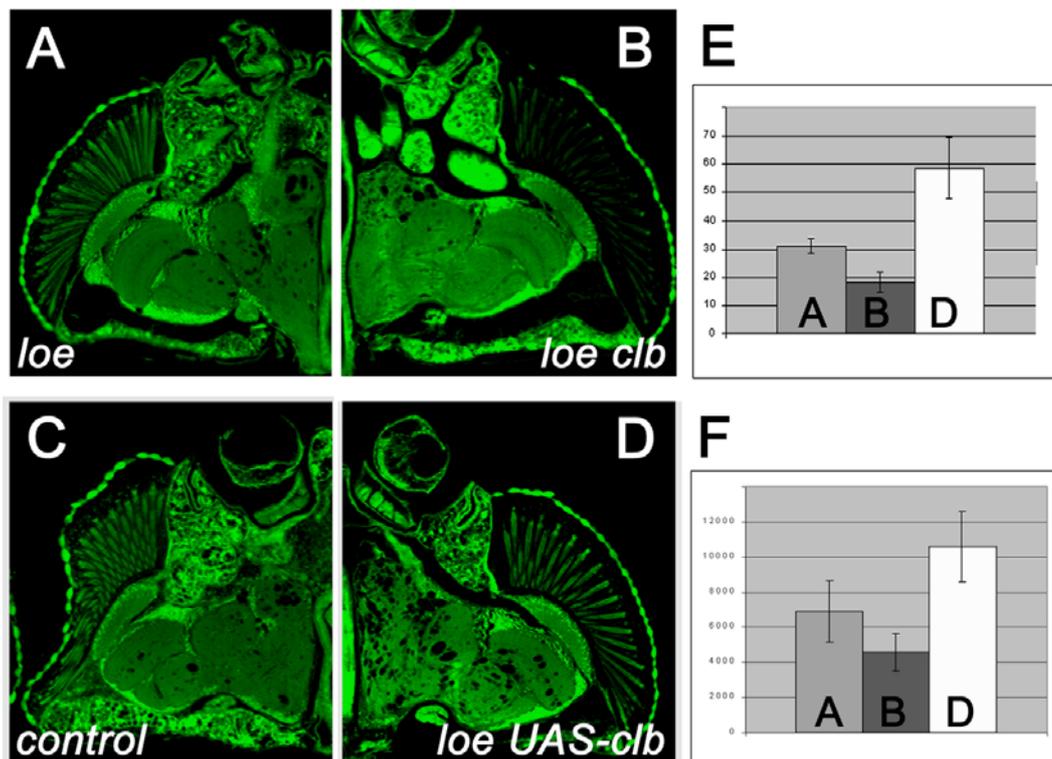


Abb. 39: Die genetische Interaktion zwischen *loe* und *clb*

Folgende Genotypen sind dargestellt: A. - *loe*, B. - *loe-clb/loe*, C. - FM7a ; UAS-*clb* ; *loe*, D. - *App1-Gal4* ; UAS-*clb* ; *loe*
 E. Kalkulation der Anzahl und F. des Gesamtvolumens der sichtbaren Löcher als Maß der Vakuolisierung.
 Eine Reduktion der *clb*-Expression um eine Kopie schwächt den *loe*-Phänotyp ab, die Expression einer zusätzlichen Kopie *clb* verstärkt den *loe*-Phänotyp.

Der Einfluss der Gendosis von *clb* auf die *loe*-Mutante belegt eine genetische Interaktion zwischen *loe* und *clb*. Diese Interaktion zeigt deutlich *in vivo*, dass die Regulation der HMG-CoA-Reduktase durch die AMPK in *Drosophila* konserviert ist.

2. Statine reduzieren den *loe*-Phänotyp

Die HMG-CoA-Reduktase kann mit einer *Statine* genannten Substanzklasse kompetitiv gehemmt werden (Wolozin, 2000 #10). Um die Rolle der Regulation von *clb* in der *loe*-Mutante weiter zu untersuchen, wurden wildtypische und *loe*-Fliegen mit dem Medikament *Mevinacor*[®] (MSD SHARP & DOME GmbH, Haar) behandelt. *Mevinacor*[®] enthält als wirksame Komponente Lovastatin, eine Substanz aus der Statin-Familie.

Die jeweiligen Genotypen wurden ab dem L3-Stadium auf Gläsern gehalten, in denen mit ddH₂O und Glucoselösung (40mg/ml) getränkte Zellstofftücher als Unterlage dienten. Die verschiedenen Konzentrationen des Medikaments *Mevinacor*[®] wurden in ddH₂O gelöst zugegeben (d.h. die Tücher bis zur Sättigung getränkt). Die Konzentration wurde durch Übertragen der oralen Maximaldosis beim Menschen auf das *Drosophila*-Lebendgewicht bestimmt und zu Kontrollzwecken auf ein Zehntel verringert und auf das 100- bzw. 1000-fache erhöht. Zur Anwendung kamen: 0,1ng/ml, 1ng/ml, 100ng/ml und 1µg/ml. Kontrollgruppen von WT- und *loe*-Fliegen wurden mit dem gleichen Volumen an ddH₂O (als Lösungsmittel des Medikaments) behandelt.

Es ließ sich bereits bei einer Konzentration von 0,1ng/ml eine Reduktion der Vakuolisierung nachweisen. Die starke Vakuolisierung in *loe*-Fliegen ließ sich durch die Behandlung deutlich reduzieren. Eine weitere Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ein Überdosierungseffekt (beim 1000fachen der wirksamen Dosis) war ebenfalls nicht zu erkennen (Abb. 40).

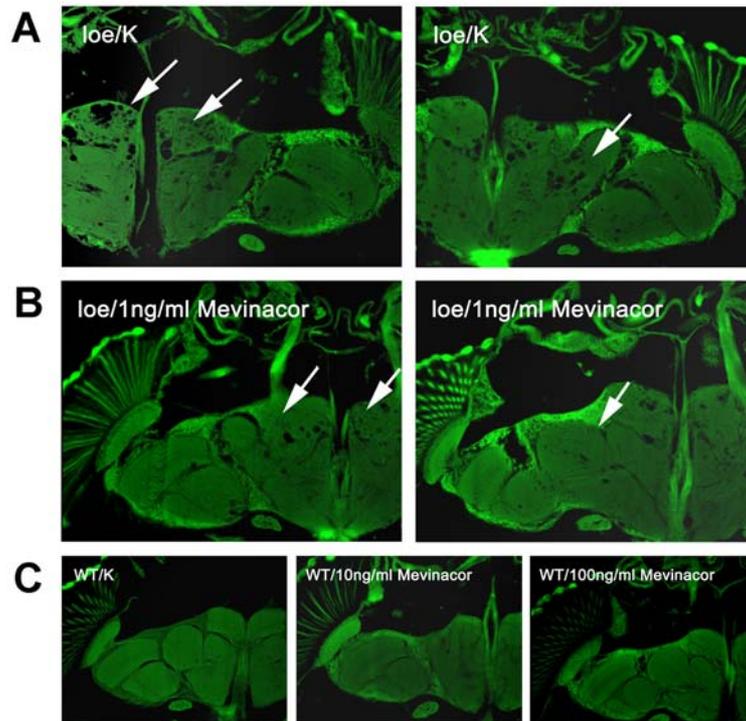


Abb. 40: Vergleich des Vakuolisierungsgrades in *loe*-Fliegen mit und ohne *Mevinacor*[®]-Behandlung
 Die Vakuolisierung in *loe*-Fliegen läßt sich durch die Behandlung mit *Mevinacor*[®] reduzieren (Pfeile in A, B)
 A. *loe*K - Kontrolle: *loe*-Fliegen mit ddH₂O/Glucose behandelt
 B. *loe* 1ng/ml *Mevinacor* – Medikament-behandelte *loe*-Fliegen
 C. Überdosierung bei der Behandlung von wildtypischen Fliegen, WT/K – Behandlung mit ddH₂O/Glucose

3. Die Lipidzusammensetzung ist in *loe* alteriert

Die HMG-CoA-Reduktase ist das Schlüsselenzym der Cholesterin-Biosynthese. In *Drosophila* ist die HMG-CoA-Reduktase konserviert. Ebenso ist deren Regulation sowohl durch die AMPK als auch durch Statine konserviert. Allerdings ist für Insekten keine Cholesterin *de novo*-Synthese gezeigt, da ihnen zwei katalytische Enzyme dieses Syntheseweges fehlen (Gertler, 1988 #11). Dennoch wurde eine Beeinflussung der Cholesterin-Homöostase in *loe* untersucht.

Es wurden Kopfhomogenisate von *Drosophila* hergestellt und eine Total-Lipid-Extraktion durchgeführt. Die Dünnschicht-Chromatographien zur Auftrennung und die Bestimmung von Lipiden in diesen Homogenisaten wurden von Dr Karin Athenstaedt (AG Prof. Dr G. Daum, TU Graz) durchgeführt. Untersucht wurden Cholesterin, Cholesterinester, Triacylglycerole und Phospholipide.

Der Gehalt an Cholesterinestern ist in der *loe*-Mutante auf ca. 40% reduziert, während die Spiegel von freiem Cholesterin, Triacylglyceriden und Phospholipiden nicht signifikant verändert sind. Quantifizierungen wurden auf den Gesamtgehalt an Phosphor bezogen (Athenstaedt, 1997 #19).

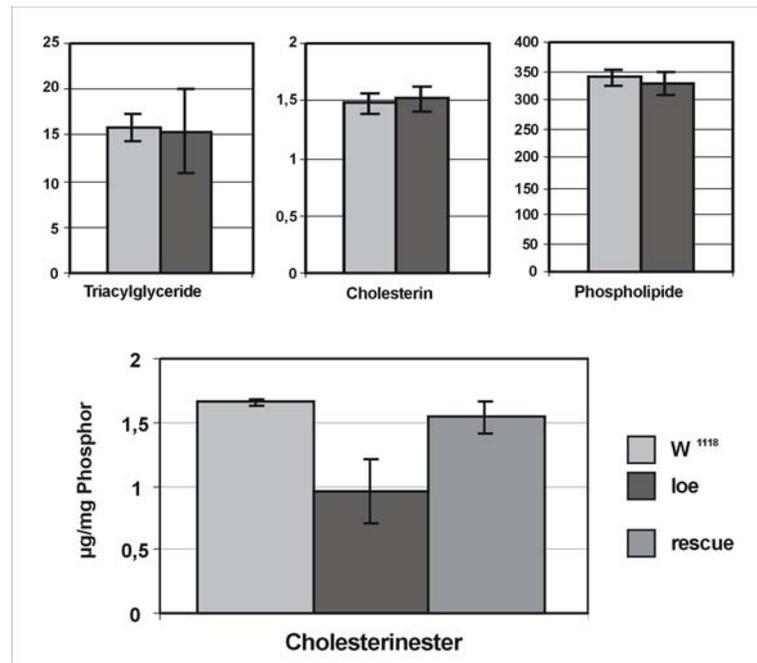


Abb. 41: Die Lipidzusammensetzung von Gehirnextrakten in *loe* verglichen mit dem Wildtyp

Der Gehalt an Cholesterinestern ist in der *loe*-Mutante um auf ca. 40% reduziert, während die Spiegel von freiem Cholesterin, Triacylglyceriden und Phospholipiden unverändert sind. Die Messwerte (je 3 Präparationen á 4 Messungen) wurden zusammengefasst und der Standardfehler berechnet.

rescue steht für den in den Reversionsexperimenten verwendeten Stamm (C. II.2.b)).

Überraschenderweise ist in *loe* tatsächlich ein Teil der Cholesterin-Homöostase beeinflusst: Der Gehalt an Cholesterinestern ist stark reduziert. Eine Betrachtung möglicher Regulationen wird in der Diskussion (D. V) besprochen.

VII. Die Mutanten *Appl* und *loe* interagieren miteinander

Für die neuronal-degenerative Alzheimer-Krankheit ist die Bildung von sog. amyloiden Plaques charakteristisch, die u.a. aus einem Peptid bestehen, das als A β -42 bezeichnet wird. Dieses Peptid entsteht durch proteolytische Prozessierung aus APP (**A**myloid **P**recursor **P**rotein). Mutationen in APP sind für den Großteil der familiären Alzheimer-Krankheit verantwortlich (Selkoe, 2001 #50).

Die Motivhomologie im N-Terminus von LOE I zu X11 α (welches an APP bindet) und dem damit denkbaren funktionellen Kontext mit APP ließ eine genetische Interaktion zwischen *loe* und *Appl*^d, der Null-Mutante des *Drosophila*-APP-Homologs, möglich erscheinen. Desweiteren ist eine Abhängigkeit der proteolytischen Prozessierung des APP in Verbindung mit Veränderungen der Cholesterinhomöostase beschrieben (De Strooper, 2000 #51).

Die hier verwendete *Appl*-Null-Mutante *Appl*^d ist verursacht durch eine Defizienz; es wird kein Protein erzeugt (Rosen, 1989 #46).

1. Phänotyp der Doppelmutante

Die Doppelmutante des Genotypes *Appl*^d;*II*;*loe* weist folgende neue Phänotypen auf:

1. Verstärkung des *loe*-Neurodegenerationsphänotypes

Die *Appl*^d-Fliegen zeigen keine Anzeichen von Neurodegeneration (Rosen, 1989 #46). Die Verstärkung des neurodegenerativen Phänotypes von *loe* ist von der Dosis der *Appl*^d-Mutation abhängig: Es ist eine Verstärkung nicht nur zwischen *loe* und der homozygoten Doppelmutante (im Hinblick auf *Appl*^d) zu erkennen, sondern bereits der Verlust einer Kopie *Appl* führt zu einer Verstärkung der Neurodegeneration (Abb. 42A-C). Zur Quantifizierung der Vakuolisierung wurden mittels des oben erwähnten Kalkulationsprogrammes (Heisenberg, 1995 #20) Zahl und Volumen der Vakuolen bestimmt (Abb. 42 F, G)

2. extrem verkürzte Lebensdauer (3-4d)

Appl^d-Fliegen haben eine weitestgehend dem Wildtyp entsprechende Lebensdauer (Rosen, 1989 #46), *loe*-Fliegen leben durchschnittlich ca. 14-17 Tage. Die Fliegen der *Appl-loe*-Doppelmutante leben lediglich 3-4 Tage. Die extrem verkürzte Lebensdauer könnte auf die starke Zunahme der Vakuolisierung im Gehirn zurückzuführen sein.

3. Sterilität der Weibchen

Sowohl *Appl*^d als auch *loe*-Fliegen sind lebensfähig und nicht steril. Die Weibchen der *Appl-loe*-Doppelmutante sind steril, die Männchen gleichen Genotypes hingegen nicht. Diese Sterilität der weiblichen Tiere ist vermutlich auf eine Verkümmern der Ovarien zurückzuführen (Abb. 42 E).

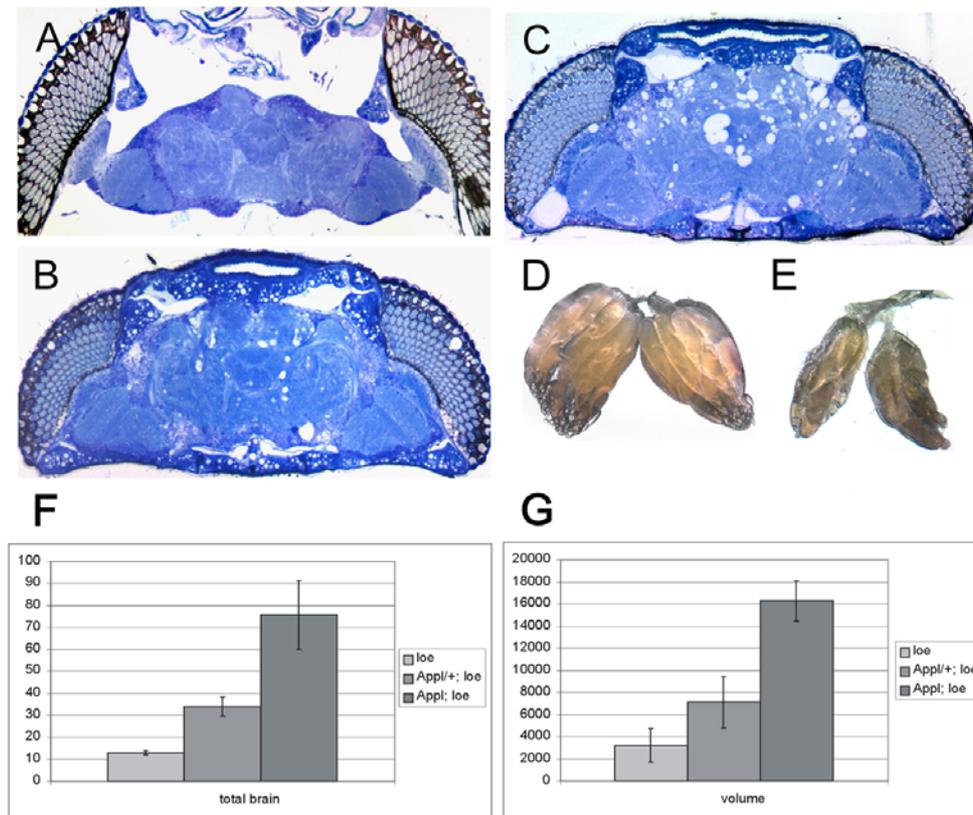


Abb. 42: Der histologische Phänotyp der *Appl^d-loe*-Doppelmutante

A-C, Horizontalschnitte des Gehirns: A – *Appl^d*, B – *loe*, C – *Appl^d;II;loe* D, E – Ovarien von *w¹¹⁸*- und *Appl^d;II;loe* – Fliegen F, G – Kalkulation der Zunahme der Vakuolisierung in den Doppelmutanten.

Die Untersuchungen an der Doppelmutante *Appl^d;II;loe* belegen eine eindeutige Interaktion zwischen den Genen *loe* und *Appl*, die neue, in den Einzelmутanten nicht erkennbare Phänotypen zeigt. Eine Funktion von LOE I im Zusammenhang mit der zellulären Funktion von APPL ist somit anzunehmen.

2. *Appl*-Prozessierung ist durch *loeI* beeinflusst

Der Befund, dass kritische Faktoren bei der Prozessierung von APP Cholesterin und Cholesterinester sind (Simons, 1998 #7) und in *loe* Änderungen im Gehalt an Cholesterinestern zu verzeichnen sind, ließen eine Beeinflussung der Prozessierung von APPL vermuten. Bestärkt wurde dies durch die genetische Interaktion zwischen *Appl^d* und *loe*.

Es wurden mittels Western-Blots sowohl der Einfluss von *loe* und LOE I auf die endogene Prozessierung von APPL, als auch die Prozessierung im Kontext verschiedener Überexpressionsexperimente untersucht.

Das APPL-Protein erscheint im Western-Blot mit gegen den N-Terminus gerichteten Antikörpern in zwei Formen: Einer membrangebundenen 145kDa und einer löslichen 130kDa-Bande, wobei die

130kDa-Bande durch proteolytische Prozessierung aus der größeren entsteht (Luo, 1990 #49). Entfernt man eine Kopie von *loeI*, so kann man im Vergleich zum Referenz-Wildtyp (*w¹¹¹⁸*) eine deutliche Reduzierung dieser prozessierten Bande beobachten, wohingegen eine Überexpression von *loeI* zu einer Verstärkung dieser Prozessierung führt (Abb. 43). Die Reduktion um eine Kopie wurde mit der heterozygoten *loe*-Mutation über einem Balancer-Chromosom, die Addition einer Kopie mit der Expression von *loeI* unter Kontrolle des Actin-Promotors realisiert.

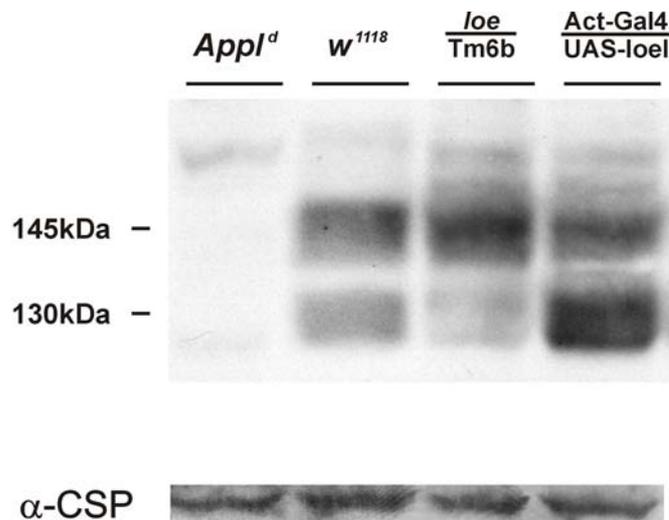


Abb. 43: Beeinflussung der Prozessierung von endogenem APPL-Protein durch *loeI*

Deutlich ist die Reduktion der prozessierten Form von APPL in *loe/TM6b* zu erkennen, ebenso deutlich die Verstärkung der Prozessierung bei Überexpression von *loeI*.

AppI^d – Negativkontrolle (kein APPL-Protein)

w¹¹¹⁸ – Positivkontrolle

loe/TM6b – nur eine wildtypische Kopie von *loeI*

Act-Gal4/UAS-*loe* – drei Kopien *loeI*

Geprobt wurde mit anti-APPL R1 1:4000.

Bei der Prozessierung der Proteine der APP-Familie spielen Sekretasen die entscheidende Rolle. In Vertebraten sind α -, β - und γ -Sekretasen beschrieben.

In Zellkultur aus Vertebraten ist eine Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität (BACE) durch Veränderungen der Cholesterin- und Cholesterinester-Spiegel im Medium gezeigt, die α -Sekretase ist davon unbeeinflusst (De Strooper, 2000 #51). Die β - und γ -Sekretase-Aktivität scheint in Vertebraten in einem gemeinsamen Plasmamembran-Kompartiment zu lokalisieren (Selkoe, 2001 #50). Die Prozessierung von APP durch die γ -Sekretase kann wiederum nur dann erfolgen, wenn eine Prozessierung durch die α - oder β -Sekretase vorangegangen ist.

In *Drosophila* sind Homologe der α - (*kuz* – *kuzbanian*, (Pan, 1997 #52)) und der γ -Sekretase (*Psn* – *presenilin*, (Nowotny, 2000 #53)) bekannt. Eine β -Sekretase ist in *Drosophila* nicht bekannt.

Eine Veränderung der APPL-Prozessierung könnte über die Beeinflussung einer der Sekretasen

passieren.

Eine mögliche Beeinflussung der γ -Sekretase *presenilin* durch *loeI* wurde im Kontext der APPL-Prozessierung untersucht. Dazu wurden sowohl *Appl* als auch *Psn* unter Kontrolle des neuronalen Treibers *elav-Gal4* exprimiert und gleichzeitig die Dosis mutanter *loe*-Expression variiert.

Für diese Experimente musste ein UAS-*Appl*-Konstrukt hergestellt werden. Dazu wurde der kodierende Teil (2,906kb von 5,422kb) der *Appl*-cDNA (BDGP # GH04413) in den pUAST-Vektor kloniert und dann mittels Keimbahntransformation transgene *Drosophila* erzeugt.

Die Überexpression von *Appl* und *Psn* in diesen Experimenten ist notwendig, um einen Effekt von *Psn* und *loe* auf die APPL-Prozessierung über die endogenen Prozesse hinaus (und damit unabhängig von α -, β - und anderen Sekretasen) beobachten zu können.

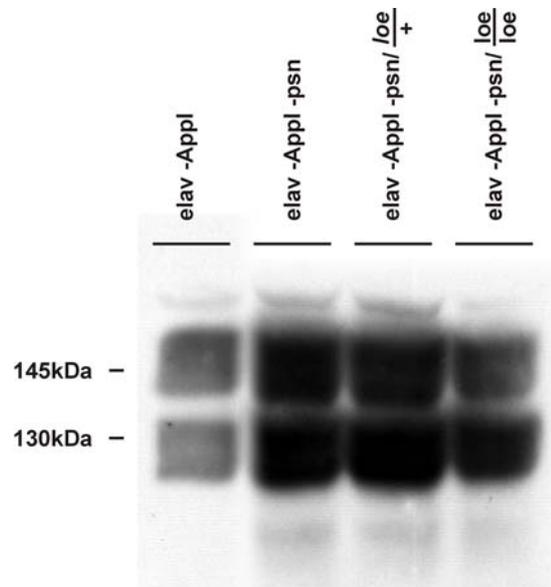


Abb. 44: Die Beeinflussung der *Appl*-Prozessierung durch Überexpression von *presenilin* in Abhängigkeit von *loeI*

Die Prozessierung von APPL wird nicht durch die Überexpression von einer Kopie *Psn* beeinflusst. Die *loe*-Mutation hat darauf keinen Effekt.

Es bedeuten:

elav-*Appl* – *elav-Gal4*; UAS-*Appl*

elav-*Appl*-*psn* – analog, mit zusätzlich UAS-*psn*

elav-*Appl*-*psn/loe*+ oder *loe/loe* – analog, mit einer oder zwei Kopien des mutanten *loe*-Chromosomes.

Geprobt wurde mit anti-APPL R1 1:4000.

Die Prozessierung von APPL wird erwartungsgemäß nicht durch die Überexpression von *Psn* beeinflusst. Bevor Presenilin APP schneiden kann, muss (in Vertebraten) ein initialer Prozessierungsschritt durch eine α - oder β -Sekretase erfolgt sein.

Dieser Sachverhalt ist vermutlich in *Drosophila* ähnlich. Eine Überexpression von *Psn* allein verstärkt nicht die Prozessierung von APPL.

Die *loe*-Mutation hat keinen Effekt auf die Prozessierung von APPL durch Presenilin, wenn auf-

grund starker Überexpression von *Appl* und *Psu* der Einfluss der endogenen Sekretasen vernachlässigt werden kann (s.a. D. VIII).

Presenilin ist auch an der proteolytischen Prozessierung des NOTCH-Proteins beteiligt (Kopan, 2000 #56). Um eine Beeinflussung von PSN sowie eine generelle Beeinflussung von proteolytischen Prozessen durch *loe* auszuschließen, wurde die NOTCH-Prozessierung in Wildtyp und der *loe*-Mutante untersucht. Das NOTCH-Molekül wird von Presenilin in ein 300kDa- und ein 100kDa-Fragment geschnitten (Nowotny, 2000 #53).

Die Prozessierung von NOTCH ist in *loe* nicht verändert (Abb. 45).

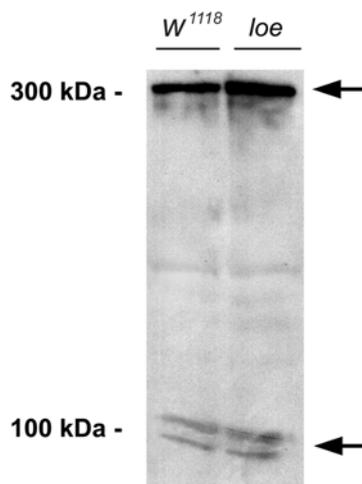


Abb. 45: Die Prozessierung von NOTCH in *loe*

Das NOTCH-Molekül wird von Presenilin in ein 300kDa- und ein 100kDa-Fragment geschnitten (Nowotny, 2000 #53). Die Prozessierung von NOTCH ist in *loe* nicht verändert. Geprüft wurde mit dem AK C17.9C6 1:500.

Hat *loe* einen Einfluss auf die Aktivität der α -Sekretase, die in *Drosophila* vermutlich *kuz* ist, so müsste die Prozessierung von NOTCH ebenfalls gestört sein, da die KUZ-Sekretase NOTCH prozessiert (Pan, 1997 #52). Das ist nicht der Fall, dennoch ist eine andere Funktion von KUZ im Hinblick auf die APPL-Prozessierung denkbar.

Deswegen wurde die APPL-Prozessierung *kuz*- sowie *kuz/loe*-Doppelmutanten untersucht.

In der heterozygoten *kuz*-Mutation ist eine neue Prozessierungsform von APPL zu detektieren: Sie ist kleiner als die endogenen Prozessierungsprodukte und hat eine Größe von ca. 125kDa. Diese Prozessierung muss als *gain of function* in diesem *kuz*-Allel gewertet werden (die genaue Art der Mutation in diesem Allel ist unbekannt). Diese Fehlprozessierung wird nicht von der *loe*-Mutation alteriert (Abb. 46, geschlossener Pfeil). Auch in diesen Experimenten ist die endogenen Form der Prozessierung durch *loe* beeinflusst (Abb. 46, offener Pfeil), wie schon in vorangegangenen Experimenten gezeigt (Abb. 43).

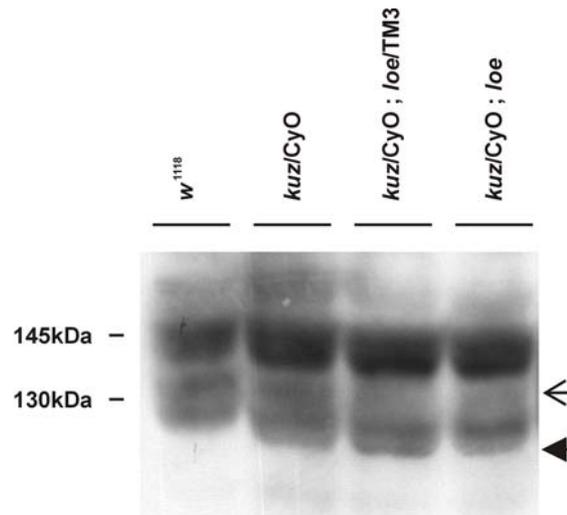


Abb. 46: Der Einfluss von *kuz* auf die Prozessierung von APPL

In der heterozygoten *kuz*-Mutation ist eine neue Prozessierungsform von APPL zu detektieren: Sie ist kleiner als die endogenen Prozessierungsprodukte und hat eine Größe von ca. 125kDa. Diese Prozessierung muss als *gain of function* in diesem *kuz*-Allel gewertet werden. Diese Fehlprozessierung wird nicht von der *loe*-Mutation alteriert (geschlossener Pfeil). Dennoch wird die normale Form der Prozessierung durch *loe* beeinflusst, wie schon in vorangegangenen Experimenten gezeigt (offener Pfeil).

Geprobt wurde mit anti-APPL R1 1:4000.

Wie in Abb. 45 gezeigt, beeinflusst *loe* nicht die Aktivität von KUZ bei der Prozessierung von NOTCH. Pan et al haben gezeigt, dass in dem Nullallel *kuz*^{p2} keine Prozessierung von NOTCH mehr stattfindet (Pan, 1997 #52). Hätte *loe* einen Einfluss auf KUZ, müsste sich das in der Prozessierung von NOTCH niederschlagen.

Andere Sekretasen als KUZ und PSN sind in *Drosophila* bislang nicht bekannt, jedoch enthalten die Genvoraussagen der *Drosophila*-Sequenzierprojekte (GadFly, s. C. I.5.c)) mehrere Metalloproteasen (zu welchen alle Sekretasen gehören).

Es konnte gezeigt werden, dass ein Homogenat aus *Drosophila*-Köpfen APP aus Vertebraten prozessieren kann. Diese Prozessierung unterscheidet sich jedoch von der Prozessierung durch BACE, der β -Sekretase aus Vertebraten, und von der Prozessierung durch die α -Sekretase (R. Reifegerste, persönliche Mitteilung, Daten unveröffentlicht). Es muss also eine weitere endogene Sekretase in *Drosophila* existieren.

In Umkehrung dieser Tatsache konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, dass die BACE-Sekretase aus Vertebraten ebenso APPL aus *Drosophila* prozessieren kann (s.u.). Ein Einfluss von *loe* auf diese Sekretase wurde untersucht, um evntl. Rückschlüsse auf die Beeinflussung der endogenen APPL-Prozessierung ziehen zu können.

Dazu wurden *Appl* und *bace* unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 exprimiert. Kombiniert wurde diese Überexpression mit zusätzlicher Expression von *loeI* oder der *loe*-Mutation (Abb. 47).

Das Produkt der Prozessierung von APPL durch BACE entspricht in seiner Größe nicht dem en-

dogenen 130kDa-APPL-Fragment. Das neue Fragment hat eine Größe von etwa 135kDa. Diese Prozessierung wird durch die *loe*-Mutation unterbunden. Dieser Effekt lässt sich sowohl bei Überexpression von *App1* (Abb. 47 A) als auch bei der BACE-Prozessierung des endogenen APPL beobachten (Abb. 47 B). Eine Überexpression von *loeI* scheint diese Prozessierung zu fördern, jedoch ist das Verschwinden der unprozessierten 145kDa-APPL-Bande als eine Überlagerung von gesteigerter BACE-Aktivität und gesteigerter Aktivität der endogenen Sekretase zu interpretieren. (Abb. 47 A, s. D. VIII). Der Effekt auf die endogene Sekretase allein ist in Abb. 43 zu sehen: Die 145kDa-Form wird deutlich vermindert, bleibt aber detektierbar.

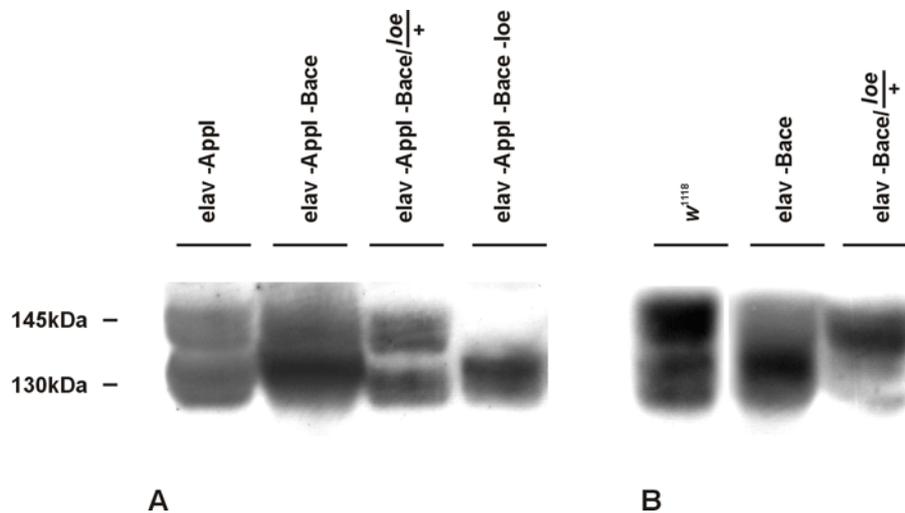


Abb. 47: Die Prozessierung von APPL durch BACE in Abhängigkeit von *loeI*

Das Produkt der Prozessierung von APPL durch BACE entspricht in seiner Größe nicht dem endogenen 130kDa-APPL-Fragment. Das neue Fragment hat eine Größe von etwa 135kDa. Diese Prozessierung wird durch die *loe*-Mutation unterbunden. Dieser Effekt lässt sich sowohl bei Überexpression von *App1* als auch bei der BACE-Prozessierung des endogenen APPL beobachten. Eine Überexpression von *loeI* scheint diese Prozessierung zu fördern, sie zumindest jedoch nicht negativ zu beeinflussen.

Es bedeuten:

A:

elav-App1 – *elav*-Gal4; UAS-*App1*

elav-App1-Bace – analog, mit zusätzlich UAS-*Bace*

elav-App1-Bace/*loe*/+ – analog mit einer Kopie des mutanten *loe*-Chromosomes.

elav-App1-Bace-*loe* – analog ohne *loe*, mit zusätzlich UAS-*loeI*

B:

*w*¹¹⁸ – Referenz-Wildtyp

elav-Bace – *elav*-Gal4; UAS-*bace*

elav-Bace/*loe*/+ – analog mit einer Kopie des mutanten *loe*-Chromosomes

Die vergleichbare Signalstärke der endogenen APPL-Menge in A und der überexprimierten in B wurde durch längere Exposition des Films gegen die Membran in B erreicht. In B wurden zwischen der Spur für *w*¹¹⁸ und den restlichen der besseren Übersicht wegen zwei Spuren eines anderen Experimentes weggelassen.

Geprobt wurde mit anti-APPL R1 1:4000.

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

Die endogene Prozessierung des APPL-Proteins ist eindeutig durch *loeI* beeinflusst.

Eine Inhibition von Presenilin ist nicht die Ursache dieser Beeinflussung.

Die vermutliche α -Sekretase KUZ ist ebensowenig durch *loe* in ihrer Aktivität alteriert.

Eine Sekretase, die in ihrer Aktivität der β -Sekretase BACE ähnelt, könnte Ziel des Einflusses von LOE I sein.

D. Diskussion

*I. Das *loe* Gen und der AMPK-Komplex*

Promotoren

Die *loe*-Transkriptionseinheit ist mit über 55kb verhältnismäßig groß. Die Anzahl von (mind.) VII Transkriptvarianten lässt, was die post-transkriptionalen Prozessierungen angeht, zwei Möglichkeiten zu:

1. Die mRNAs aller Varianten werden reguliert von einem Promotor exprimiert und aus einem Primärtranskript gespleißt. Dabei müsste dann der Spleißvorgang die Spezifität im Hinblick auf Exonkomposition (C. I.5) und Zelltyp (z.B. C. II.2.b), C. III.1.a) oder C. III.3) erzeugen. Die Regulation der Spezifität der Genprodukte läge somit in einem differentiellen Spleißvorgang eines einzigen Primärtranskriptes

2. Die mRNA(s) jeder Variante oder zumindest der Untergruppen der Varianten werden von einem eigenen Promotor reguliert und in einem (Zell-)spezifischen Kontext gespleißt. Die Regulation der Spezifität der Genprodukte läge somit in der Erzeugung mehrerer verschiedener Primärtranskripte.

Die erste Möglichkeit ist experimentell schwer zu überprüfen. Die Spleißvorgänge, die alle Transkriptvarianten Entwicklungs- und Zelltyp- abhängig liefern müssten, sind jedoch als so kompliziert anzusehen, dass sie nicht angenommen werden können.

So kann man die zweite Möglichkeit als die wahrscheinlicher verwirklichte betrachten.

Es gibt für die meisten Organismen Konsensussequenzen für Promotoren. Der Konsensus in *Drosophila* ist für die -25/-30-Region von TATA-Boxen-enthaltenden Promotoren mit $^A/G/C$ TATA-AA $^G/G/C$, der Konsensus für die Transkriptionsstart mit $^T/A/G$ TCA $^G/T$ $^T/C$ G festgelegt worden. Einen Konsensus für die -25/-30-Region für Promotoren, die keine TATA-Boxen enthalten, gibt es nicht. Dazu gehören in *Drosophila* etwa die Hälfte aller Promotoren, der Konsensus für den Transkriptionsstart gilt für nur $1/3$ der Transkripte (Arkhipova, 1995 #31). Mit Hilfe dieser Promotorkonsensi wurden für die *loe*-Transkriptionseinheit mögliche Promotoren für die einzelnen Varianten bestimmt. Es muss festgestellt werden, dass außer im Falle von *loeIX* (s.u.) für keine der Transkriptvarianten ein Promotor der TATA-haltigen Art bestimmt werden konnte. Auch entspricht keiner der Transkriptionsstartpunkte dem von Arkhipova bestimmten Konsensus.

Transkriptlängen

Die Transkriptlängen, die in den Northern Blot Experimenten zu Abb. 8 ermittelt wurden, können nur teilweise den entsprechenden Varianten zugeordnet werden. Eine genaue Untersuchung hätte

für jede Variante spezifische genomische oder cDNA-Proben verlangt. Dieser Aufwand war im Hinblick auf die Relevanz der einzelnen Transkripte für den Phänotyp nicht angemessen. Die Zuordnung erfolgte, wo es möglich war, über die Längen der ermittelten cDNA-Sequenzen.

Eine weitere Frage, die mit diesem Problem zusammenhängt, ist die nach den scheinbar partiellen Transkripten unter den isolierten cDNAs aus den Sequenzierprojekten: So können *loeIV*, *loeVI*, *loeVIII* und *loeIX* als partielle oder unvollständig gespleißte cDNAs der anderen Isoformen gesehen werden. Zwei Argumente sprechen allerdings dagegen:

1. Sie bestehen immer aus vollständigen Exons und ergeben potentiell funktionelle γ -Untereinheiten der AMPK.
2. Sie sind durch die Spleiß-Konsensi für Exons in *Drosophila* (Mount, 1992 #36) begrenzt (Ausnahme: *loeIV*).

In Frage gestellt werden müssen besonders die als *loeVII* und *loeIX* bezeichneten Transkripte. In ihrem Fall scheint ein zufälliger Abbruch der reversen Transkription bei der cDNA-Synthese an einer Exon-Grenze wahrscheinlich. Dennoch sind Transkripte dieser Exon-Komposition nicht auszuschließen, vor allem da für ein mögliches Transkript *loeIX* ein TATA-haltiger Promotor zu finden ist.

Wie oben erwähnt müsste zur Aufklärung dieser Fragen eine komplizierte Analyse der Transkripte auf RNA-Ebene erfolgen, die aufgrund fehlenden wissenschaftlicher Relevanz im Sinne des Projektes jedoch nicht unternommen wurden.

Die AMPK und die Isoformen der γ -Untereinheit

Der 5-AMP-aktivierte-Proteinkinase-Komplex (AMPK) ist konserviert über die Speziesgrenzen hinweg. Homologe sind in *Saccharomyces cerevisiae* ebenso beschrieben wie in Vertebraten. Es finden sich Homologe aller Untereinheiten in vielen Spezies (s. F. , Abb. 54). In der Bäckerhefe reguliert dieser Komplex bei Glucose-Mangel Energie-intensive Synthesewege durch Phosphorylierung ihrer Schlüsselenzyme herunter. Für den AMPK-Komplex aus Vertebraten wurden ähnliche Wirkungsmechanismen in Abhängigkeit von dem ATP/AMP Verhältnis in der Zelle beschrieben. Darüberhinaus sind in den letzten Jahren für die AMPK in Vertebraten weitere regulatorische Funktionen beschrieben worden (Hardie, 1998 #18). Abb. 48 zeigt, wie verschieden die Regulationsziele der AMPK sind.

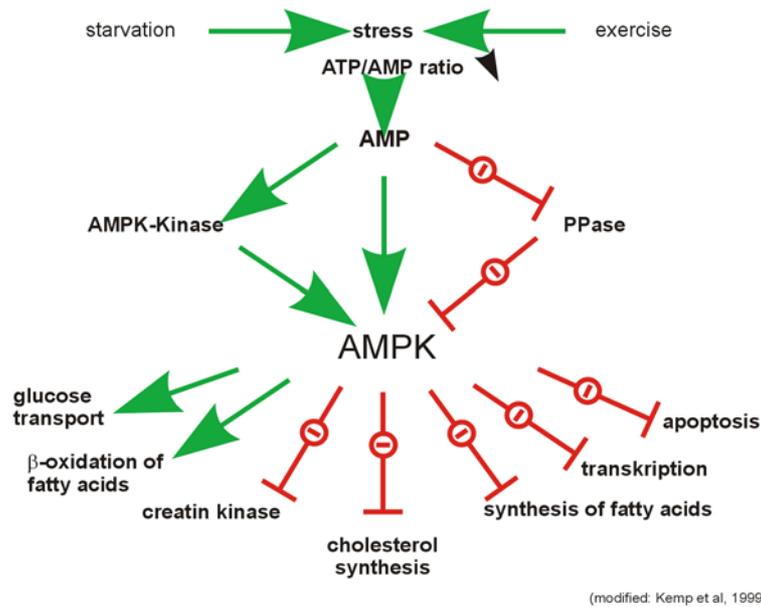


Abb. 48: Zusammenfassung der beschriebenen Regulationen durch den AMPK-Komplex
(nach Kemp, 1999 #28)

Wie in Vertebraten gezeigt, bilden die unterschiedlichen α -, β - und γ -Untereinheiten Zell- oder Gewebs-spezifische Komplexe (Hardie, 1998 #18). Dabei dient die β -Untereinheit als Adapter zwischen der α - und der γ -Untereinheit. Bei der Aktivierung binden die α - und die γ -Untereinheit AMP und durch eine Konformationsänderung wird die Kinase Domäne der α -Untereinheit aktiv (Abb. 49 (Cheung, 2000 #29)).

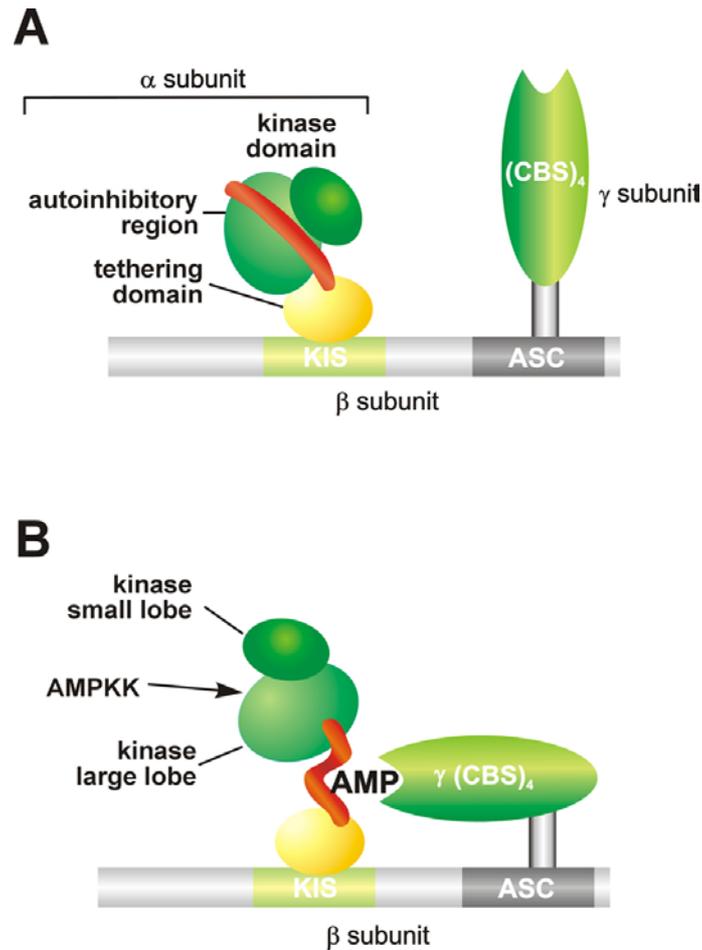


Abb. 49: Der AMPK-Komplex im inaktiven und aktiven Zustand

A. inaktiver Zustand, B. aktiver Zustand (Cheung, 2000 #29)

Wie in Abb. 49 zu sehen, wird die Interaktion zwischen der β - und der γ -Untereinheit über den N-Terminus der γ -Untereinheit vermittelt. Die Spezifität der Zusammenstellung des Komplexes im Hinblick auf die γ -Untereinheiten könnte über die verschiedenen N-Termini vermittelt werden. Dafür sprechen die deutlichen Unterschiede in diesen Bereichen bei relativ stark konstanten C-Termini mit den konservierten 4 CBS-Domänen sowie die Ergebnisse dieser Arbeit: Die Expression einer nur im N-Terminus unterschiedlichen Transkriptvariante (*loeII*) reicht nicht aus, um die Funktion der anderen (*loeI*) im selben Kontext (*loe*-Mutation) zu erfüllen (Abb. 23). Auch binden bestimmte, sich N-terminal unterscheidende γ -Untereinheiten stärker oder schwächer an die verschiedenen β -Untereinheiten (Cheung, 2000 #29).

Eine weitere Funktion der N-Termini (zumindest der stark verlängerten in *Drosophila* und Vertebraten) kann in der Rekrutierung weiterer Co-Aktoren oder Co-Regulatoren des AMPK-Komplexes gesehen werden. Diese Faktoren könnten die AMPK in einen spezifischen regulatorischen Kontext stellen oder den Komplex innerhalb der Zelle an einem speziellen Wirkungsort

lokalisieren. Eventuelle Interaktionsmotive in diesen N-Termini sollen im folgenden diskutiert werden.

LOE I

Die Untersuchungen zu der *loe*-Mutation deuten auf eine Funktion für LOE I, die mit dem Überleben von Nervenzellen eng verbunden ist. Die Auswirkungen einer Fehlfunktion in diesem Sinne sind in *loe* sowohl im Cholesterinhaushalt und in der Prozessierung von APPL zu finden. Die Spezifität dieser Funktion(en) liegt im N-Terminus des LOE I Proteins. Zur speziellen Funktion des LOE I-N-Terminus sind, vor allem hinsichtlich einer funktionellen Homologie zu Vertebraten, prinzipiell drei Möglichkeiten denkbar:

Möglichkeit A: LOE I ist einer bisher unbekannt humanen γ -AMPK homolog.

Möglichkeit B: LOE I ist funktionell der γ -AMPK 2 oder 3 aus *Homo sapiens* homolog.

Möglichkeit C: LOE I ist mit seinem N-Terminus funktionell anderen (Vertebraten-) Proteinen homolog.

A. LOE I ist einer unbekannt humanen γ -AMPK-Isoform aus Vertebraten homolog

Wäre dies der Fall, müssten sich im Bereich der Genloci der humanen γ -Untereinheiten der AMPK vorausgesagte offene Leseraster finden, die eine höhere Homologie zu dem N-Terminus von LOE I haben als die N-Termini der bekannten Isoformen h γ AMPK1, 2 und 3. Dann könnten diese offenen Leseraster für bis dahin unbekannte N-Termini der h γ AMPK kodieren. Das konnte jedoch für alle möglichen Genloci in den zugänglichen genomischen Datenbanken ausgeschlossen werden. Ob ein direktes Homolog zu LOE I in dem immer noch unveröffentlichten Sequenzinformationen des Humangenoms zu finden ist, bleibt offen.

B. LOE I ist funktionell der γ -AMPK 2 oder 3 aus *Homo sapiens* homolog

Die Homologien der humanen γ -Untereinheiten 2 bzw. 3 betragen zu LOE I 21,1% und 17% respektive, wenn man die gesamte Sequenz der Proteine gegenüberstellt. Die konservierten CBS-Domänen zeigen zu über 75% positive Übereinstimmung (Abb. 13, s. C. I.5.b)). Die verlängerten N-Termini der humanen Isoformen 2 und 3 stimmen mit dem N-Terminus von LOE I zu 18,3% bzw. 17,2% positiv überein. Diese Werte müssen allerdings unter der Voraussetzung gesehen werden, dass die N-Termini von h γ AMPK 2 und 3 569AS bzw. 464AS lang sind, der N-Terminale Bereich von LOE I hingegen 936AS. Betrachtet man die direkten Gegenüberstellungen der Sequenzen, so sind kürzere, aber höher homologe Übereinstimmungen zu erkennen, wie es allgemei-

nen für Proteine typisch ist, die Motive gemeinsam haben. Diese Übereinstimmungen sind in Tab. 6 zusammengefasst.

	hγAMPK2	hγAMPK3
Länge des N-Terminus	569AS	464AS
Länge der <i>alignements</i>	253AS	156AS
Identitäten total	10,4%	8,0%
positive Übereinstimmungen total	18,3%	17,2%
Identitäten im <i>alignement</i>	97AS / 38,3%	71AS / 45,5%
positive Übereinstimmungen im <i>alignement</i>	177AS / 70,0%	122AS / 78,2%

Tab. 6: Gegenüberstellung der Homologiewerte zwischen LOE I und den beiden humanen Homologen hγAMPK2 und 3

Die Werte für das *alignement* wurden folgendermaßen berechnet:

Anzahl der identischen AS / Länge des *alignements* x100 = % bzw.

Anzahl der positiv übereinstimmenden AS / Länge des *alignements* x100 = %.

Die in den N-Termini beider humaner Isoformen enthaltenen Phosphorylierungs- und Myristylierungsstellen ließen einen ähnlichen zellulären Kontext der beiden humanen Proteine und LOE I postulieren. Da solche Motive allerdings recht häufig vorkommen und über eine Relevanz nur spekuliert werden könnte, bleiben sie bei diesen Betrachtungen unberücksichtigt, soweit sie sich nicht in gleicher Weise in LOE I finden (s.u.).

Betrachtet man die Sequenzvergleiche unter strukturellen Gesichtspunkten, fallen folgende Dinge auf:

Die Übereinstimmungen zwischen hγAMPK3 und LOE I erstrecken sich auf viele sehr kurze Abschnitte, die die Glaubwürdigkeit herabsetzen und damit den höheren Wert der Identitäten abschwächen.

Die Homologien zwischen hγAMPK2 und LOE I finden sich dagegen über längere Teile der Sequenz, es werden sogar zwei mögliche Interaktionsstellen gemeinsam geteilt:

1. eine Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle [ST]x[DE] (¹⁷⁰SGK¹⁷³ bezogen auf LOE I)
2. eine p34^{cdc2} Interaktionsstelle [PxTP] (⁴⁶⁶PRTP⁴⁷⁰ bezogen auf LOE I)

Beide Proteine (und damit der mit ihnen gebildete AMPK-Komplex können über diese Motive einerseits in Antwort auf extrazelluläre Signale (Protein-Kinase C), andererseits in Abhängigkeit von Zellzyklus (p34^{cdc2}) reguliert werden. Eine funktionelle Homologie zwischen hγAMPK2 und LOE I ist somit diskutierbar.

Es bleiben jedoch bei einer Beschränkung auf diese funktionelle Homologie eine Reihe ebenso homologer Motive im N-Terminus von LOE I unbeachtet.

(Der detaillierte Sequenzvergleich zwischen h γ AMPK2 und LOE I ist im Anhang (F. Abb. 53) angefügt.)

C. Der LOE I-N-Terminus ist funktionell anderen (Vertebraten-) Proteinen homolog

In Datenbanksuchen konnten dem N-terminalen Bereich von LOE I diverse Homologien, Motive und Modifikationsstellen zugeordnet werden (Abb. 14, C. I.5.b)).

Betrachtet man die Sequenz des N-Terminus von LOE I, so fallen eine große Anzahl von Prolinen auf - in loser Folge aber auch in einem sog. *stretch*: ²⁷⁸P-P²⁸⁸. Proline sind die prominente Aminosäure in Protein-Interaktionsmotiven. Die einzelnen Motive variieren sehr stark in ihrem jeweiligen Konsensus, können jedoch Klassen zugeteilt werden (Kay, 2000 #30). Solche Interaktionsmotive und weitere Homologien sollen im folgenden diskutiert werden.

X11 α und dALPP

Unmittelbar am N-Terminus von LOE I findet sich eine Homologie zu einem Protein der *mint*-Familie, X11 α . Diese *unc-18 interacting proteins* interagieren mit der PTB-Domäne im C-Terminus des APP aus Vertebraten durch eine der zwei enthaltenen PDZ-Domänen (Borg, 1998 #35). Die Homologie zu dem Bereich in LOE I liegt nicht in dieser PDZ-Domäne, stellt jedoch eine Verbindung zu den möglichen Interaktionspartnern des APP her. Im weiter C-terminal gelegenen Bereich finden sich Motive, die homolog zu Bereichen in einem Protein der *Drosophila*-APP-Familie sind. Dieses Protein ist zu dem APP-Homolog in *Drosophila* (*App1*) lediglich paralog und in seiner Funktion nicht charakterisiert, es wird in der *SwissProt*-Datenbank als *dALPP* (*Drosophila* β -Amyloid-like precursor protein) bezeichnet. Die übereinstimmenden Bereiche weisen keine sehr hohe Homologie auf, sie sind jedoch innerhalb der möglichen Motive im korrekten Aminosäureabstand und innerhalb der beiden Moleküle in der richtigen Reihenfolge. Zusammen mit der genetischen Interaktion zwischen *App1* und *loe* könnte dies ein Hinweis auf eine Funktion von LOE I (und damit der AMPK) im cytologischen Kontext von APPL sein.

Assoziation an das Cytoskelett

LOE I weist von AS278 bis 288 einen Prolin-*stretch* auf, der in mehreren anderen Proteinen als funktionelle Domäne diskutiert wird. An dieses Prolin-Motiv bindet Profilin (*Drosophila* *chic - cicadee* (Cooley, 1992 #34)), ein Microtubuli-assoziiertes Protein, das das sog. +-Ende von Aktin-Filamenten stabilisiert und somit eine Funktion beim Auf- und Abbau der Aktinfilamente und somit in der Plastizität des Cytoskeletts hat.

Für das Protein WASp (*Wiskott-Aldrich Syndrom protein*) sind zwei solche Prolin-Motive beschrieben und die Profilinbindung über diese Motive im Arp2/3-WASp-Komplex gezeigt (Wear, 2000 #38). Eines dieser Motive ist hochgradig homolog zu dem in LOE I zu findenden Prolin-*stretch*. Profilin wird als einer der Mediatoren zwischen Signalprozessen und daraus resultierenden Umstrukturierungen des Cytoskeletts diskutiert.

```

LOE I      S-EAPPPPPPPPIPATIL-----PKALKALLHTQEPVAPPSPRSPVGGPPSPAPTSSVIVAKETVPVPTPEP---VSPLPLPTEPP
S         PPPPPPPP PAT L          P L+          P PP P P+ PSP P +          ET VPV P P V LP P PP
hWASp1    SMTSTPPPPPPPPPPATALQAPAVPPPPAPLQIAPGVLHPAPPIAP-PLVQPSP-PVARAAPVCET-VPVHPLPQGEVQGLPPPPPP

```

Abb. 50: Die Homologie zwischen hWASp1 und LOE I im Bereich der Profilin-Interaktionsstelle
In rot sind die Profilin –Bindungsstellen eingezeichnet

Eine weitere auf einem Prolin-reichen Motiv basierende Übereinstimmung besteht zwischen Formin und LOE I. Auch dieses Protein ist im Zusammenhang mit dem Cytoskelett beschrieben, es assembliert Aktin-Filamente in einer von dem Arp2/3-Komplex unabhängigen Art und Weise (Evangelista, 2002 #39).

Wie von B. Kay beschrieben, finden sich unter den Protein-Interaktions-Modulen sehr viele mit variierenden Kombinationen aus PLxPP, PPLPP, LPPLPPL und anderen Aminosäuren (Kay, 2000 #30). Die Interaktionen zwischen Fe65 und Mena (*Drosophila ena – enabled*), Proteine die an APP binden, werden ebenfalls über Klasse I-WW-Domänen vermittelt, die an poly-Prolin-Module binden, welche im Aufbau den Prolin-Motiven in LOE I ähnlich sind, aber nicht genau den Konsensi entsprechen (Ermeikova, 1997 #40).

Die Zahl der beschriebenen Interaktionsmotive wächst ständig und so sind, auch wenn noch nicht konkret einer Interaktion zuzuweisen, die zahlreichen Prolin-Leuzin-reichen Aminosäureabfolgen im LOE I-N-Terminus als sicherer Hinweis auf verschiedenste Intraaktionen zu werten.

Proteininteraktion über ein coiled coil-Motiv

Eine weitere Homologie findet sich im N-Terminus von LOE I in einer prominenten α -Helix (AS 578-617). Die Aminosäuren dieser Domäne formen einen sog. *coiled coil*, eine strenge α -Helix, die in vielen Proteinen als Interaktionsmotiv fungiert. Proteine mit solchen Helices sind z.B. das Produkt des Gens *plexus* aus *Drosophila* oder SPEN (*spen – split ends*). Das coiled coil-Motiv wird als Oligomerisierungsdomäne beschrieben (Beck, 1998 #42), wie z.B. bei der Bindung von Zink-Finger-Proteinen oder der Bildung des SNARE-Komplexes bei der Vesikelfusion. Dabei tetramersieren *coiled coils* aus Synaptobrevin, Sytaxin und SNAP-25 (2) (Burkhard, 2001 #43). Im Bezug auf die *in yeast two hybrid*-Experimenten für LOE I gezeigte Interaktion mit NiPSNAP, welches ebenfalls ein *coiled coil*-Motiv enthält, ist das eine mögliche Erklärung der Funktion des *coiled coil*-Motivs in LOE I.

Yeast two hybrid-Experimente mit den *coiled coil*-Motiven aus beiden Proteinen könnten diese Funktion belegen.

Proteininteraktion über ein Alanin-reiches Motiv

Für viele Transkriptionsregulatoren, deren Wirkung auf der Interaktion mit anderen Proteinen beruht, ist ein weiteres Motiv beschrieben, eine Alanin-reiche Region (Bieker, 2001 #44). In LOE I könnte sie ebenfalls zur Interaktion mit anderen Proteinen herangezogen werden, eine konkrete Funktion oder ein Zielprotein lassen sich im bisher bekannten Kontext von LOE I allerdings nicht finden.

Myristylierung, PKC und p34^{cdc2}-Interaktionsstelle

Wie schon im Zusammenhang mit den humanen Homologen diskutiert, finden sich im N-Terminus von LOE I diverse Phosphorylierungsstellen, über die sowohl die Bindungsaffinität an die β -Untereinheit als auch die Bindung an andere Interaktionspartner reguliert werden können. Eine Regulation in Antwort auf extrazelluläre Signale (PKC und cAMP/cGMP-abhängige Protein-kinasen) oder in Abhängigkeit vom Zellzyklus (p34cdc2) scheint möglich, über tatsächliche Regulationsmechanismen kann nur spekuliert werden. Auch eine Lokalisation des LOE I enthaltenden AMPK-Komplexes an der inneren Cytoplasmamembran mittels eines Myristyl-Ankers ist denkbar, jedoch nicht nachgewiesen.

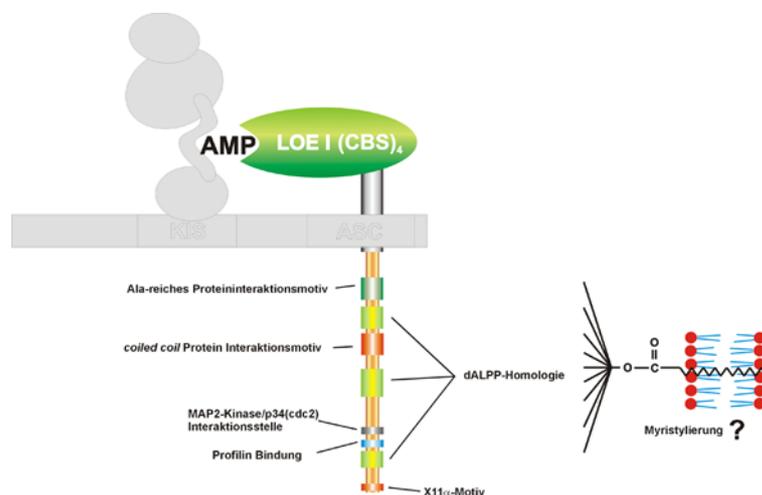


Abb. 51: Zusammenfassung möglicher Interaktionsmotive von LOE I im AMPK-Komplex verändert nach Cheung (Cheung, 2000 #29)

Motive und Domänen von LOE II-VII

Die Genprodukte der Varianten II-VII teilen sich in (mindestens) zwei Gruppen: LOE III/IV und LOEII/V-VII.

Die Proteine beider Gruppen unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur und der

daraus resultierenden denkbaren Tertiärstruktur. Es sind für beide unterschiedliche Funktionen anzunehmen, nicht zuletzt aufgrund der für LOE III gezeigten Expression in Photorezeptoren (C. III.1.a)).

Wie auch LOE I tragen Proteine beider Untergruppen mehrere Glycosylierungssignale, die allerdings angesichts der angenommenen cytosolischen Funktion keine Rolle spielen sollten. Bedeutsamer erscheinen Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C und CaseinkinaseII: Eine Regulation der mit diesen Untereinheiten gebildeten AMPK-Komplexe im Zell-physiologischen Kontext durch Phosphorylierung ist sehr wahrscheinlich, auch wenn zu möglichen Regulationswegen und –arten keine Experimente durchgeführt wurden.

Der N-Terminus von LOEIII trägt drüberhinaus zwei Motive zur Interaktion mit Klasse I- und Klasse-IV-WW-Domänen-Proteinen. Diese Motive sind interessanterweise in LOE VI (der verkürzten Variante von LOE III) nicht enthalten. Klasse I-WW-Domänen-Proteine sind z.B. Nedd-4 (eine Ubiquitin-Ligase), Dystrophin (ein Aktin-bindendes Protein aus der Z-Scheibe von Muskelzellen) und YAP-65 (ein mit Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie interagierendes Protein). Klasse IV-WW-Domänen-Proteine sind z.B. Essl/Pin1 (eine Prolylisomerase) und ebenfalls Nedd-4 (eine Ubiquitin-Ligase) (Kay, 2000 #30). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen LOE III und einigen dieser Proteine ist denkbar, aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Beim Vergleich der Homologen der γ -Untereinheiten zwischen Vertebraten und *Drosophila* fällt ein weiterer Unterschied besonders auf:

Während in Vertebraten die verschiedenen Isoformen in getrennten Genloci kodiert werden und sich schwach sowohl im N-Terminus als auch in den konservierten Domänen unterscheiden, sind in *Drosophila* alle Isoformen in einem Genlocus kodiert, differieren aber enorm (in Länge und Sequenz) in ihren N-Termini. Das könnte Ausdruck verschiedener evolutorischer Mechanismen sein, die jeweils zu den unterschiedlichen Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen geführt haben.

II. Expressionsstudien in vivo

Partielle Rescues und Überexpression

Wie in Abb. 23 gezeigt, reicht die Expression einer nur im N-Terminus unterschiedlichen Transkriptvariante (*loeII*) nicht aus, um die Funktion der anderen (*loeI*) im selben Kontext (*loe*-Mutation) zu erfüllen. Die Expression eines anderen N-Terminus hat sogar einen geringeren Effekt (im Hinblick auf die Reversion des Phänotyps) als die Expression eines *loeI*-Konstruktes mit einem sehr kurzen Anteil des LOE I-N-Terminus. Eine Erklärung auf biochemischer Ebene könnte so aussehen:

Die γ -Untereinheit bindet mit ihrem N-Terminus an die β -Untereinheit, mit den CBS-Domänen unter Bindung eines AMP an die α -Untereinheit und aktiviert diese (Cheung, 2000 #29).

Exprimiert man nun einen 'falschen' N-Terminus (*loeII*) im 'falschen' mutanten Kontext (*loe*) kann das zur Rekrutierung der falschen Interaktionspartner und damit zu einer geringeren Reversion des *löchrig*-Phänotyps führen als mit der Expression eines Konstruktes ohne längeren N-Terminus. Diese verkürzte γ -Untereinheit kann zwar nicht die erforderlichen (hypothetischen) Co-Faktoren rekrutieren und daher den Phänotyp nicht vollständig revertieren, jedoch zumindest einen funktionellen AMPK-Komplex bilden, der eine 'Minimal-Funktion' erfüllt.

Offenbar liegen aber funktionell für LOE I wichtige Motive in dem kurzen Bereich, der in *loeI^Δ* N-terminal von den CBS-Domänen liegt und in der Sequenz von LOE II abweicht (s. Abb. 22).

Eine Überexpression von *loeI* hat keinen Effekt hinsichtlich eines neurodegenerativen Phänotyps (C. II.2.b)), wohl aber auf die Prozessierung von APPL (C. VII.2). Wie ist das zu erklären?

1. Überschüssiges LOE I hat keinen generell negativen Effekt auf Nervenzellen.
2. Der Effekt der Überexpression wirkt sich auf die proteolytische Prozessierung des APPL-Proteins aus. Eine Auswirkung hinsichtlich Neurodegeneration müsste sich auf den *AppI*-Phänotyp beziehen. Die *AppI*-Mutante selbst hat jedoch keinen neurodegenerativen Phänotyp und somit kann dieser auch nicht von der Überexpression von *loeI* beeinflusst werden.

Verwendung der neuronalen Treiber verglichen mit dem Expressionsmuster von *loeI* in vivo

Hinsichtlich des Phänotyps ist die Expression vom *loeI* unter der Kontrolle neuronaler Treiber (*AppI*-Gal4 und *elav*-Gal4) völlig ausreichend zur Reversion des Phänotyps (s.C. II.2.b)), wohingegen gliale Treiber keinerlei Effekt zeigen. Wie durch die Antikörperfärbungen an Kryostatschnitten mit einem Antikörper gegen LOE I gezeigt werden konnte ist das Expressionsmuster von *loeI* deutlich detaillierter (C. III.3) und nur auf bestimmte Neuronen beschränkt. Da jedoch auch eine Überexpression von *loeI* unter der Kontrolle stärkerer Treiber (z.B. *actin*-Gal4) keine Effekte im Hinblick

auf Neurodegeneration zeigt, lässt sich die aus der neuronalen Expression resultierende überschüssige Expression in allen Neuronen vernachlässigen.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass *loeI* eine neuronale Funktion hat, bei deren Ausfall Neuronen nekrotisch sterben. Diese Funktion hinsichtlich Neurodegeneration ist an den N-Terminus von LOE I gebunden, wobei alle vorhandenen Motive dieses Bereiches für eine korrekte Funktion notwendig sind – fehlen einige, wird der Phänotyp der Mutante nicht vollständig revertiert.

LOE I als γ -Untereinheit der AMPK stellt diesen Komplex in einen funktionellen Kontext, der über die Regulation von Prozessen hinausgeht, die die allgemeine Zellphysiologie umfassen. Vielmehr zeigt die Arbeit über *loeI* neue, Nerven-spezifische Funktionen des AMPK-Komplexes, die durch keine der anderen Isoformen substituiert werden können.

Northern Blot Experimente

Das *loeI* Transkript ist in der *loe*-Mutante um ca. 1,5kb verlängert. Durch die Hybridisierungen mit einer P-Element-Sonde konnte gezeigt werden, dass das *loeI*-Transkript in *loe* einen Teil des P-Elementes enthält. Versuche, dieses Transkript mit RT-PCR zu gewinnen und so Aufschluss über die genaue Zusammensetzung dieses Mischtranskriptes zu erlangen, waren nicht erfolgreich. Es kann von der Produktion eines in AS-Zusammensetzung und evntl. Größe veränderten Proteins ausgegangen werden, auch wenn dieses nicht in Western-Blot-Experimenten verifiziert werden konnte (s. D. III).

Ein kleines, kopfspezifisches Transkript von ca. 0,6kb, das aus Exons des 5'-Bereichs von *loeI* bestehen muss, konnte in Northern-Blot-Experimenten ebenfalls detektiert werden. Es ist in *loe* nicht verändert und somit auch ohne Relevanz für den *loe*-Phänotyp. Versuche, dieses Transkript mit RT-PCR zu gewinnen und so Aufschluss über die genaue Sequenz dieses Transkriptes zu erlangen, waren nicht erfolgreich.

III. Proteinlokalisierung und –detektion

Spezifität der gewählten Peptide und Selektivität der Antikörper

Die Aminosäuresequenz der Peptide, die zur Immunisierung der Tiere verwendet wurden, ist durch verschiedene Verfahren bei den beauftragten Firmen bestimmt worden. Dabei spielen in erster Linie die AS-Seitenketten eine Rolle, in Verbindung mit einer Strukturdatenbank antigener Motive. Die ermittelten Sequenzen werden dann noch auf Redundanz gegen Datenbanken bekannter Proteine und Motive überprüft, um eine ungewollte Übereinstimmung der ermittelten Epitope mit Epitopen anderer Proteine zu verhindern.

Trotzdem sind Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen in Totalhomogenisaten von Geweben nicht ausgeschlossen. Dies ist bei Antikörpern der ersten und zweiten Charge von Antikörpern der Fall (s. C. III.1.a) und C. III.1.b)).

Die Tatsache, dass manche Antikörper zwar das in *E. coli* exprimierte Fusionsprotein erkennen, nicht jedoch das Protein in Fliegenhomogenisaten kann aufgrund der unterschiedlichen organismischen Herkunft nicht verwundern: Posttranslationale Modifikationen fehlen ebenso wie eine korrekte Tertiärstruktur, die die Epitope maskieren kann.

Stabilität der fremdexprimierten Proteine

Die Voraussagen für eine Sekundärstruktur von LOE I belegen für den N-Terminus einen losen Aufbau ohne prominente Strukturdomänen (C. I.5.b)). Für die Expression solcher *low complexity*-Proteine wird eine Fusion mit fremden Strukturdomänen zur Erhöhung der Stabilität empfohlen (QiaGen, 2001 #45). Mit einem Fusionskonstrukt, das eine CBS-Domäne (pQE70-loeI-Nterm) als stabilisierendes Element enthielt, konnte tatsächlich eine Expression stabiler Produkte erreicht werden (Abb. 32). Fusionskonstrukte mit der DHFR (**De**Hydro**Folat**Reduktase) aus der Maus (Vektoren pQE-16 und -40) können die Stabilität eines Fusionsproduktes durch die stabilisierende Wirkung der stark globulären DHFR erhöhen. Aufgrund der sehr geringen Antigenizität der DHFR würde diese auch nicht die Antikörpergeneration stören. Die Produktgröße wäre jedoch auf über 160kDa angestiegen, was eine erfolgreiche Expression unwahrscheinlich macht.

Versuche, das Kulturenwachstum bei reduzierter Temperatur (30°C) durchzuführen, konnten ebenso wenig die Degradation der anderen Expressionsprodukte verhindern wie die Verwendung Protease-defizienter Stämme (s. B. I.1.b)). Eine Induktion für eine kürzere Zeitperiode, wie ebenfalls im *QiaExpressionist* (QiaGen, 2001 #45) empfohlen, konnte aufgrund der Expression in der uninduzierten Kultur als Lösung ebenfalls ausgeschlossen werden.

LOE I in Western Blot-Experimenten mit Kopf-Totalhomogenisaten

Der Widerspruch zwischen dem theoretischen Molakulargewicht von 152kDa und der in Western-Blots für LOE I ermittelte Größe von <240kDa lässt sich nicht abschließend lösen. Verantwortlich sein könnten dafür Myristylierungen oder Phosphorylierungen, welche durch die verwendeten Aufschlussmethoden nicht entfernt werden konnten. Denkbar ist auch die feste Einbindung in einen Komplex, der nicht aufgelöst werden kann, jedoch während der Denaturierung aggregiert. LOE I-Protein kann zu einem geringen Teil unter Verlust eines großen Teils der Epitop-Reaktivität aus diesen Aggregaten herausgelöst werden und mit einer Größe von ca. 160kDa bestimmt werden.

Für eine genauere Charakterisierung von LOE I im Vergleich zwischen WT und *loe* müssten die Detaturierung weiter optimiert werden und gegebenenfalls um chemische Prozessierungen (Demyristylierungen, Deacetylierungen o.ä.) ergänzt werden.

IV. Letale Rekombinanten

Das Ziel der Rekombinationsexperimente war es, neue, letale Allele von *loe* zu erzeugen. Deshalb wurden die erhaltenen Linien auf ihre Lebensfähigkeit hin selektioniert (Hammerschmied, 1999 #14).

Wie in Abb. 37 zu sehen, wurden bei den Rekombinationsexperimenten große Chromosomenveränderungen verursacht. Dabei sind neben Rekombination im Sinne des *HEI*-Prinzips (s. Abb. 36) weitere, komplizierte Umlagerungen zu verzeichnen.

Dabei ist zuerst ein Rekombinationsereignis wie nach dem *HEI*-Prinzip zu postulieren, da in allen Fällen die eingesetzten Marker (*e* oder *cn*) auf das P-Element-tragende Originalchromosom rekombiniert wurden. Danach kam es allerdings aufgrund mangelnder Stabilisierung zu weiteren Translokationen des P-Elementes.

Die Linien R14 und R17 tragen eine ca. 74kb große Deletion über den *loe*-Genlocus aber auch über eine Reihe anderer Gene hinweg (s. Abb. 37). Nach dem ersten Rekombinationsereignis sind keine weiteren Umlagerungen vor sich gegangen.

Ähnlich ist die Situation in den Linien R9 und R10. Hier wurde ein Bereich von ca. 92kb deletiert. Zusätzlich dazu ereignete sich eine Inversion des P-Elementes, ob dies vor oder nach dem Rekombinationsereignis geschah, kann nicht überprüft werden.

Dem Rekombinationsereignis in Linie R8 folgte ein *jump out*, wobei eine kleine Deletion im Bereich der ehemaligen Insertionsstelle hinterlassen wurde (Hammerschmied, 1999 #14). Die Re-Insertion des P-Elementes geschah in 101F auf dem 4. Chromosom. Die gesetzte Deletion liegt im nichtkodierenden Bereich von *loe*, somit ist vermutlich die Reinsertion auf dem 4. Chromosom für die Letalität verantwortlich.

Die widersprüchlichsten Ergebnisse lieferten die Linien R39 und R37. Reproduzierbare *plasmid*

rescues in 5'-Richtung belegten die Lage des P-Elementes an der originalen Position in 93B-C, ebenso reproduzierbare *plasmid rescues* in 3' Richtung deuteten im Falle von R39 auf eine Position in 89B-C, im Falle von R37 gar auf eine Positionierung in 49A-B und 89B-C.

Die wahrscheinlichste Erklärung für beide Fälle kann so gegeben werden: Nach dem anfänglichen Rekombinationsereignis erfolgte ein unpräziser *jump out*, bei dem ein größeres genomisches Fragment aus dem 5'-Bereich der ehemaligen Insertionsstelle mitgenommen wurde. Dieses genomische Fragment muss größer sein als die Lauflänge einer durchschnittlichen Sequenzierreaktion, so dass nie über dieses Fragment hinaus in 5'-Richtung sequenziert werden konnte. In Linie R39 erfolgte dann eine Re-Insertion dieses falsch exzisierten P-Elementes in 89B-C, in R37 eine Duplikation dieses Elementes und zwei Re-Insertionen (in 49A-B und 89B-C). Das hat zur Folge, dass die Sequenzierung in 5'-Richtung die originale Position vorgibt (aufgrund des mit-translozierten genomischen Stückes), Sequenzierungen in 3'-Richtung jedoch den tatsächlichen Insertionsort offenbaren.

Die Bildung von Mischchromosomen kann eher ausgeschlossen werden, da sich dann im Verlauf der nachfolgenden Kreuzungen Chromosomen-Duplikationen für das zweite und dritte Chromosom hätten manifestieren müssen, welche als letal anzusehen sind.

In allen Fällen ist die erzeugte Letalität wahrscheinlicher auf die Neuinsertionen der P-Elemente an anderen Orten und nicht auf die Veränderungen im *loe*-Genlocus zurückzuführen.

Im Falle der Linien, von denen keine *plasmid rescues* generiert werden konnten, kann nur durch andere Techniken eine genaue Rekonstruktion der chromosomalen Veränderungen erstellt werden.

Da jedoch die anderen letalen Rekombinationsereignisse immer auch andere Gene beeinflussten, konnte nicht klar gestellt werden, ob *loe* letal mutierbar ist. Eine Mitbeeinflussung anderer Gene wie in den bereits charakterisierten Linien ist u.U. zu erwarten. Die weitere Charakterisierung der verbleibenden Linien muss noch erfolgen.

V. Interaktionen des LOE I-N-Terminus

Die geringe Ausbeute in den *yeast two hybrid*-Screens mit dem *Matchmaker*-System könnte seine Ursachen in den verwendeten Konstrukten haben. Dabei sind zwei kritische Parameter naheliegend: Der in dem System enthaltene Kernimport der Fusions-Proteine und deren Größe sowie Stabilität.

Kernimport und Größe

Um als rekonstituierter Transkriptionsfaktor zu wirken, müssen die interagierenden Fusionsproteine in den Kern importiert werden. Die erzeugten Fusionsproteine tragen zwar jeweils ein nukleäres Lokalisationssignal, jedoch benötigen globuläre Proteine über 60kDa einen aktiven Transport durch die Kernpore (Mattaj, 1998 #66). Dabei wird nicht nur der Kernporenkanal erweitert, sondern für eine Reihe von Por-teinen ist für den korrekten Kernimport ein Entfalten des Proteins vonnöten. Dabei spielen z.B. die *heat shock*-Proteine Hsp60 und Hsp70 eine Rolle (Gorlich, 1998 #65). Das

Gal4-LOE I-Fusionsprotein hat eine Größe von 115,4kDa. Ein inkorrekt importiertes Kernprotein kann bei dieser Größe nicht ausgeschlossen werden.

Stabilität von LOE I

Wie sich in den Experimenten zur Expression eines LOE I-Fusionsproteins gezeigt hat, ist der isolierte N-Terminus des Proteins in *E.coli* relativ instabil (s. C. III.1.c)(2)). Diese Instabilität beruht zum einen auf der vermutlich nicht sehr kompakten Tertiärstruktur dieses N-terminalen Bereiches von LOE I (s. C. I.5.b)) andererseits auf der Größe des Fusionsproduktes (s.o.).

Das in den *yeast two hybrid*-Screens mit dem LOE I-N-Terminus verwendete Fusionskonstrukt entspricht in seiner Komposition hinsichtlich *loeI* den N-terminalen Konstrukten, die für die Proteinexpression verwendet wurden. Eine ähnliche Instabilität des Fusionsproduktes in Hefen ist anzunehmen. Ein degradiertes Protein wird vermutlich trotz NLS (*Nuclear Localization Signal*) erst gar nicht in den Nucleus importiert. Sollte dies doch der Fall sein, so ist jedoch nur ein Bruchteil der möglichen Interaktionen zu erwarten.

Lösungen

Nach der abgeschlossenen strukturellen Analyse in Bezug auf Interaktionsmotive und Domänen (s. C. I.5.b)) sollten die in den *yeast two hybrid*-Screens eingesetzten Konstrukte dahingehend verändert werden, dass nur noch einzelne Motive oder Domänen in den Konstrukten enthalten sind. Das hätte einerseits eine zwangsläufige Verkleinerung der Fusionsprodukte (und damit Steigerung der Stabilität) zu Folge, andererseits ergäben die *yeast two hybrid*-Screens dann gleich konkretere Beziehungen zwischen Interaktionspartner und Interaktionsmotiv. Auch das Problem des unsicheren Kernimportes kann so umgangen werden.

Eine weiterer, im Rahmen der Arbeit ja auch schon begonnener Weg ist, den kritischen Kernimport ganz zu umgehen. Dazu finden *yeast two hybrid*-Systeme Anwendung, deren Interaktion im Cytoplasma der Hefe-Zellen stattfindet, wie das bei dem CytoTrap[®]-System von Stratagene der Fall ist.

NiPSNAP – der Interaktionspartner von LOE I

Das NiPSNAP-Protein besitzt Homologien zu einer Nitrophenyl-Phosphatase und zu SNAP-25, einem Protein, das bei der Membranfusion von Vesikeln eine Rolle spielt. Nitrophenylphosphatase-Domänen sind über ihre katalytische Funktion charakterisiert: Sie dephosphorylieren das Pseudo-Substrat p-Nitrophenylphosphat. Diese Aktivität zeigen eine Reihe von Membran-ständigen ATPasen, die als Iontentransporter fungieren (Martin, 2000 #63). Welche Funktion diese Aktivität im Hinblick auf das NiPSNAP-Protein hat, ist nicht beschrieben (Seroussi, 1998 #64).

Die Interaktion mit LOE I erscheint insofern sinnvoll, da auch für APPL eine Rolle im Vesikeltransport diskutiert wird (Gunawardena, 2001 #54). Von Gunawardena et al wird für APPL eine

Funktion als Rezeptor für Kinesin I *in vivo* gezeigt. Darüberhinaus konnten Kamal et al zeigen, dass APP für den Transport von Membrankompartimenten benötigt wird, die sowohl β -Sekretase als auch Presenilin enthalten (Kamal, 2001 #55). Dass für solche spezialisierten Vesikel NiPSNAP und ein AMPK-Komplex mit LOE I eine Funktion haben ist spekulativ aber durchaus möglich.

VI. *loeI* und der Cholesterinstoffwechsel

Mit der erzeugten *loe-clb/loe* -Mutante und der Überexpression der *clb*-cDNA im *loe*-Hintergrund in Neuronen konnte eindeutig eine genetische Interaktion zwischen *loe* und *clb* nachgewiesen werden. Während die Reduktion der *clb*-Expression um eine Kopie den *loe*-Phänotyp abschwächt, verstärkt die Expression von zusätzlichem *clb* den *loe*-Phänotyp (Abb. 39).

Der Einfluss der Gendosis (Reduktion um eine Kopie und Expression einer weiteren Kopie von *clb*) von *clb* auf die *loe*-Mutante belegt diese Interaktion. Diese Interaktion zeigt deutlich *in vivo*, dass die Regulation der HMG-CoA-Reduktase durch die AMPK in *Drosophila* konserviert ist.

Es besteht jedoch ein gravierender Unterschied zwischen Insekten und Vertebraten: Aufgrund des Fehlens zweier Enzyme können Insekten kein Cholesterin *de novo* synthetisieren. Der unveränderte Cholesterin-Spiegel in *loe* geht damit konform. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist aber die Menge an Cholesterinestern in *loe* alteriert. Es kann daher für die HMG-CoA-Reduktase möglicherweise ein bislang unbekannter Einfluss auf die Hydrolyse von Cholesterinestern oder die Veresterung von Cholesterin postuliert werden.

Die Neurodegeneration in adulten *loe* Fliegen lässt sich durch eine Statin-Behandlung deutlich reduzieren (Abb. 40). Dieser Effekt belegt die Funktion der HMG-CoA-Reduktase im Hinblick auf den *loe*-Phänotyp und damit die Interaktion zwischen *clb* und *loe*.

Es wurde gezeigt, dass Statine dramatisch die Produktion des A β -Peptides unterdrücken können bevor eine Reduktion des Cholesterins detektiert werden kann (Fassbender, 2001 #57). Die APP-Prozessierung wird also offenbar durch andere Intermediate des Cholesterin-Stoffwechsels beeinflusst, z.B. Cholesterinester, wie es in Vertebraten diskutiert wird (Wolozin, 2000 #10). Die Suppression des neurodegenerativen Phänotypes in *loe* durch Statine könnte ebenfalls über die Reduktion von Cholesterin-Derivaten und damit über die Veränderung der APP-Prozessierung geschehen.

Ein anderes Enzym, das im Cholesterinester-Stoffwechsel von Vertebraten eine Rolle spielt, ist die Hormon-sensitive Lipase. Sie hydrolysiert Cholesterinester und wird negativ von der AMPK reguliert (Garton, 1989 #58). Eine Reduzierung oder der Verlust der Aktivität der AMPK in *loe* sollte zu einer Überaktivierung dieser Lipase führen und damit zu einem reduzierten Gehalt an Cholesterinestern. Die Änderungen des Cholesterinester-Spiegels in *loe* könnten ein erster Hinweis auf die Existenz einer solchen Lipase in Neuronen von *Drosophila* sein.

VII. *App1* – *loe*-Interaktion

Wie die *knock out*-Mäuse für das APP aus Vertebraten zeigt auch die *App1*⁻-Null-Mutante nur geringe neurologische Defekte (Müller, 1994 #59, Zheng, 1995 #60, Luo, 1990 #49). Im *loe*-Hintergrund aber kann *App1* eindeutig in Verbindung mit Neurodegeneration gebracht werden. Ist in der *loe*-Mutation die Menge an löslichem APPL-Protein (nach der Prozessierung) reduziert, fehlt sie in *App1*⁻ völlig. Für das nach Prozessierung durch die α -Sekretase sezernierte sAPP α -Fragment ist eine neuroprotektive Funktion beschrieben (Furukawa, 1996 #61). Die drastische Verstärkung der Neurodegeneration und die damit verbundene Reduzierung der Lebensdauer könnte auf das komplette Fehlen dieser neuroprotektiven Funktion durch das Fehlen von APPL in der Doppelmutante (*App1*⁻;*II*;*loe*) im Zusammenhang mit dem neuronalen Zelltod in *loe* zurückzuführen sein.

Von Torroja et al wurde jedoch auch gezeigt, dass APPL eine Funktion bei der Plastizität von Synapsen hat (Torroja, 1999 #62). Ebenso wurde für APPL eine Funktion als Rezeptor für Kinesin I, einem Motorprotein im anterograden Vesikeltransport, gezeigt (Kamal, 2001 #55). Ein AMPK-Komplex mit LOE I als γ -Untereinheit könnte über die Interaktion mit NiPSNAP ebenfalls eine Funktion in einem spezialisierten Vesikeltyp übernehmen (s.o.). Eine veränderte Versorgung von Synapsen bzw. das Fehlen bestimmter Vesikel-Subtypen kann ebenso zum Absterben von Neuronen führen.

Über die Ursache der Verkümmern der Ovarien in der *App1*⁻;*II*;*loe*-Doppelmutante lässt sich nur spekulieren. Es wurde gezeigt, dass APP in Vertebraten nicht nur eine Funktion im axonalen Vesikeltransport hat (Beer, 1995 #85). Der Verlust von funktionellem APPL zusammen mit eventuellen Veränderungen des Sterolgehaltes in der Membranin der *App1*⁻;*II*;*loe*-Doppelmutante ist in den exocytotisch hochaktiven Follikelzellen somit wahrscheinlich der Grund für die Sterilität.

VIII. LOE I, APPL und Sekretasen

Die Prozessierung von APPL ist durch LOE I klar beeinflusst: Die Mutation *loe* reduziert die Produktion der löslichen 130kDa-Form, eine Überexpression steigert diese Prozessierung (Abb. 43).

Diese Prozessierung geschieht durch spezielle Metalloproteasen, nach ihrer Funktion Sekretasen genannt. In Vertebraten sind α -, β - und γ -Sekretasen beschrieben.

In Zellkultur aus Vertebraten ist eine Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität (BACE) durch Veränderungen der Cholesterin- und Cholesterinester-Spiegel im Medium gezeigt, die α -Sekretase ist davon unbeeinflusst (De Strooper, 2000 #51). Die β - und γ -Sekretase-Aktivität scheint in Vertebraten in einem gemeinsamen Plasmamembran-Kompartiment zu lokalisieren (Selkoe, 2001 #50). Die Prozessierung von APP durch die γ -Sekretase kann wiederum nur dann erfolgen, wenn eine Prozessierung durch die α - oder β -Sekretase vorangegangen ist.

In *Drosophila* sind Homologe der α - (*kuz* – *kuzbanian*, (Pan, 1997 #52)) und der γ -Sekretase (*Psn* – *presenilin*, (Nowotny, 2000 #53)) bekannt. Eine β -Sekretase ist in *Drosophila* nicht kloniert. Nichtsdestotrotz enthalten die Genvoraussagen der *Drosophila*-Sequenzierprojekte (GadFly, s. C. I.5.c) mehrere Metalloproteasen (zu welchen alle Sekretasen gehören).

Von R. Reifegerste konnte gezeigt werden, dass ein Homogenat aus *Drosophila*-Köpfen APP aus Vertebraten prozessieren kann. Diese Prozessierung unterscheidet sich jedoch von der Prozessierung durch BACE, der β -Sekretase aus Vertebraten, und von der Prozessierung durch die α -Sekretase. Die Schnittstelle dieser endogenen Sekretase liegt etwa 10-15AS von der BACE-Schnittstelle entfernt (persönliche Mitteilung, Daten unveröffentlicht, s. Abb. 52A). Es muss also eine weitere endogene Sekretase in *Drosophila* existieren. Man könnte diese (hinsichtlich ihrer Aktivität) vierte Sekretase als ' δ '-Sekretase bezeichnen (D. Kretzschmar, persönliche Mitteilung).

In den vorliegenden Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Presenilin nicht von LOE I beeinflusst wird. Weder die Prozessierung von NOTCH durch PSN noch die APPL-Prozessierung durch PSN sind durch die *loe*-Mutation oder (im Fall von APPL) durch eine Überexpression von *loeI* zu verändern.

Die vermutliche α -Sekretase in *Drosophila* KUZ scheint in ihrer Aktivität ebensowenig von LOE I abhängig zu sein, wie die Experimente zur APPL-Prozessierung in *loe* und *kuz* zeigen. Wie in Abb. 45 gezeigt, beeinflusst *loe* nicht die Aktivität von KUZ bei der Prozessierung von NOTCH. Pan et al haben gezeigt, dass in dem Nullallel von *kuz* keine Prozessierung von NOTCH mehr stattfindet (Pan, 1997 #52). Hätte *loe* einen Einfluss auf KUZ, müsste sich das in einer Veränderung der Prozessierung von NOTCH niederschlagen.

Es wurde bislang auch noch nicht gezeigt, dass KUZ überhaupt eine Rolle in der APPL-Prozessierung spielt. Die *gain of function*-Aktivität des *ku ζ* Allels *ku ζ ³⁶⁵³* deutet jedoch auf eine mögliche Funktion von KUZ bei der APPL-Prozessierung hin.

Dass die Reduzierung der endogenen APPL-Prozessierung durch *loe* in Abb. 46 nicht sehr deutlich zu sehen ist, liegt vermutlich daran, dass diese Reduzierung durch die *gain of function* Prozessierung in *ku ζ* zum Teil maskiert wird, da sich die Prozessierungen der Sekretasen ausser der γ -Sekretase ausschliessen (Selkoe, 2001 #50). Desweiteren ist in diesen Versuchen aufgrund der Letalität von *ku ζ* die Mutation nur heterozygot, was zur Folge hat, dass die normale endogene Prozessierung immer im Hintergrund vorhanden ist.

Um Eigenschaften einer β -ähnlichen Sekretase untersuchen zu können, wurde stellvertretend für eine ' β '-Sekretase aus *Drosophila* die β -Sekretase BACE aus Vertebraten verwendet. Die Prozessierungsstelle von BACE in APPL unterscheidet sich klar von der der endogenen Sekretase in *Drosophila*, wie anhand der größenveränderten Prozessierungsprodukte in Abb. 47 zu sehen ist.

Die Aktivität von BACE lässt sich klar durch *loe* blockieren (Abb. 47). Eine Überaktivierung, wie in der endogenen APPL-Prozessierung bei *loeI*-Überexpression zu beobachten (Abb. 43 und Abb. 47), lässt sich nicht klar belegen, jedoch ist das Verschwinden der unprozessierten 145kDa-APPL-Bande als eine Überlagerung von gesteigerter BACE-Aktivität und gesteigerter Aktivität der endogenen Sekretase zu interpretieren. Der Effekt auf die endogene ' δ '-Sekretase allein ist in Abb. 43 zu sehen: Die 145kDa-Form wird deutlich vermindert, bleibt aber detektierbar. Die Überaktivierung der ' δ '-Sekretase durch *loeI* scheint stärker zu sein als die von BACE und daher findet diese Prozessierung u.U. bevorzugt statt.

Aufgrund der ermittelten Differenzen der Fragmentgrößen der APPL-Prozessierung durch BACE und die ' δ '-Sekretase lässt sich folgende Verteilung der Sekretase-Schnittstellen in dAPPL postulieren. Wie von Torroja et al gezeigt, ist im Bereich von AS 758-791 in APPL die Schnittstelle der Sekretase enthalten, die die lösliche 130kDa-Form von APPL erzeugt (Torroja, 1999 #62). Deletiert man diesen Bereich, ist die Prozessierung von APPL unterbunden (Konstrukt *Appl^{SD}* in Torroja et al, 1999, s. Abb. 52B). Die Transmembrandomäne wird von Torroja et al auf die AS 787-836 festgelegt (Torroja, 1999 #62), die tatsächlich membrandurchspannenden AS sind 812-834 (Transmembrandomänenvoraussage auf www.expasy.ch). Die γ -Schnittstelle liegt vermutlich am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne von APPL (Torroja, 1999 #62).

Das Produkt der APPL-Prozessierung durch BACE hat ein molekulares Gewicht von ca. 135kDa und unterscheidet sich damit von dem endogenen Prozessierungsprodukt (130kDa). Die BACE-Schnittstelle und die ' δ '-Schnittstelle müssen somit in einer Distanz von 35-40 AS liegen, denn das wiederum entspricht der Gewichts Differenz von ca. 5kDa. Diese Distanz lässt sich zumindest in der

Größenordnung zwischen der vermutlichen BACE- und der 'δ'-Sekretase-Schnittstelle finden (Abb. 52B). Die in Abb. 52 eingezeichnete BACE-Schnittstelle wurde aufgrund von Turner et al bestimmten Konsensus (Turner, 2001 #67) und in Abgleich mit der BACE-Schnittstelle in hAPP bestimmt (unterstrichene AS in Abb. 52A+B).

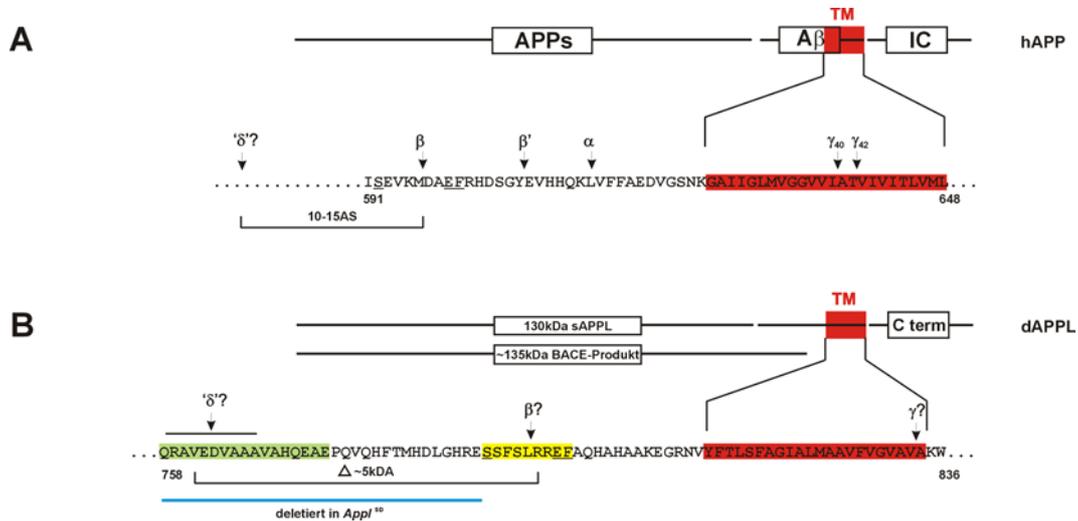


Abb. 52: Die Positionen der Sekretase Prozessierungsstellen in hAPP und dAPPL.

A. Die Sekretaseschnittstellen in hAPP, verändert nach De Strooper (De Strooper, 2000 #51).

B. Die vermutlichen Positionen der Sekretaseschnittstellen in dAPPL

Im Bereich von AS 758-791 in APPL ist die Schnittstelle der Sekretase enthalten, die die lösliche 130kDa-Form von APPL erzeugt (Torroja, 1999 #62). Die BACE-Schnittstelle und die 'δ'-Schnittstelle in APPL müssen in einer Distanz liegen, der AS eines Gewichtes von ca. 5kDa entsprechen. Das sind ungefähr 35-40 AS, diese Distanz lässt sich zumindest in der Größenordnung zwischen der vermutlichen BACE- und der 'δ'-Sekretase-Schnittstelle finden (Abb. 52B). Die in Abb. 52 eingezeichnete BACE-Schnittstelle wurde aufgrund von Turner et al bestimmten Konsensus (Turner, 2001 #67) und in Abgleich mit der BACE-Schnittstelle in hAPP bestimmt (unterstrichene AS in Abb. 52A+B)

In Vertebraten wurde gezeigt, dass Statine dramatisch die Produktion des Aβ-Peptides unterdrücken können bevor eine Reduktion des Cholesterins detektiert werden kann (Fassbender, 2001 #57). Das lässt eine Beeinflussung der β-Sekretase durch andere Intermediate des Cholesterinstoffwechsels vermuten (Wolozin, 2000 #10), z.B. Cholesterinester. Die vermutete 'δ'-Sekretase in *Drosophila* könnte ebenfalls in ihrer Aktivität vom Cholesterinester-Spiegel abhängen, der in *loe* auf 40% gesenkt ist (s. C. VI.3).

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

Die endogene Prozessierung des APPL-Proteins ist eindeutig durch *loeI* beeinflusst.

Eine Inhibition von Presenilin ist nicht die Ursache dieser Beeinflussung.

Ein Effekt von LOE I auf die Aktivität von KUZ, der vermuteten α-Sekretase in *Drosophila*, kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die β -Sekretase aus Vertebraten BACE wird in ihrer Aktivität durch die *loe*-Mutation negativ beeinflusst.

Eine Sekretase, die in ihrer Aktivität der β -Sekretase BACE ähnelt, könnte Ziel des Einflusses von LOE I sein. Da sie eine von den anderen Sekretasen unterscheidbare Prozessierungsstelle erkennt, kann sie als ' δ '-Sekretase bezeichnet werden.

Mediator dieser Beeinflussung könnte der Cholesterinester-Spiegel sein, den in Neuronen ein AMPK-Komplex mit LOE I als γ -Untereinheit über die HMG-CoA-Reduktase reguliert.

Der Einfluss von LOE I im AMPK-Komplex auf BACE und die postulierte δ -Sekretase ist somit wahrscheinlich indirekt.

E. Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen des Menschen sind eines der Hauptfelder molekularer neurobiologischer Grundlagenforschung. Um generell molekulare, komplizierte Vorgänge *in vivo* untersuchen zu können, nutzt man seit geraumer Zeit Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster*.

In der vorliegenden Arbeit wird die *Drosophila*-Neurodegenerationsmutante *loe* (*löchrig*) beschrieben, die als Modell für die Rolle des Cholesterinhaushalts im Bezug auf Neurodegeneration herangezogen werden kann.

Die Fliegen dieser Mutante zeigen stark progressive, altersabhängige Degeneration von Neuronen, dabei unterlaufen diese Nervenzellen einen nekrotischen Zelltod.

Verantwortlich für diese Mutation ist die Insertion eines P-Elementes in einem Intron des *Drosophila*- γ -5'-AMP-aktivierten Proteinkinase- (AMPK)-Gens. Die verschiedenen Spleißprodukte des *loe* Gens kodieren für die regulatorische γ -Untereinheit des AMPK-Komplexes, der , aktiviert durch 5'AMP, energieintensive Prozesse negativ reguliert.

Die Spleißform *loeI* ist durch die P-Element-Insertion betroffen, Anteile des P-Elementes werden in das *loeI*-Transkript hineingespleißt. Eine neuronale Expression von *loeI* im *loe*-Hintergrund führt zur Revertierung des *loe*-Phänotypes. Mit der Expression anderer Spleißformen kann dieser Effekt nicht erzielt werden.

Das LOE I-Protein birgt in seinem N-Terminus eine Reihe möglicher Interaktionstellen mit anderen Proteinen, die den AMPK-Komplex in einen Kontext mit den Proteinen der APP (*Amyloid Precursor Proteins*) –Familie stellen oder z. B. Interaktionen mit dem Cytoskelett herstellen können. Eine molekulare Interaktion mit NiPSNAP, einem Protein, dass vermutlich eine Rolle im Vesikelverkehr spielt, konnte nachgewiesen werden.

Ein direktes humanes Homolog von LOE I ist nicht bekannt, wohlgleich es im Menschen drei AMPK- γ -Untereinheiten gibt, von denen zwei ähnliche Funktionen übernehmen könnten wie LOE I.

Die *loe*-Mutante interagiert genetisch mit der Mutante *clb* – *columbus*, die einen Defekt im Gen der HMG-CoA-Reduktase trägt. Dieses Enzym ist das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese. Die Art der Interaktion belegt eine negative Regulierung der HMG-CoA-Reduktase durch die AMPK. So schwächt die *clb*-Mutation den neurodegenerativen *loe*-Phänotyp ab, eine Überexpression von *clb* verstärkt diesen. Eine Verminderung der Neurodegeneration kann auch mit Medikamenten erreicht werden: Statine, potente Hemmer der HMG-COA-Reduktase, reprimieren deutlich den *loe*-Phänotyp. In *loe* ist der Cholesterinester-Spiegel auf 40% abgesenkt.

Eine weitere genetische Interaktion von *loe* konnte nachgewiesen werden: Die Mutante für das *Drosophila*-Homolog von APP (*Appl*) verstärkt den neurodegenerativen Phänotyp in *loe* stark, wogegen die *Appl*-Mutante selbst keine neurodegenerativen Defekte aufweist. Darüberhinaus zeigt die Doppelmutante Defekte, die keine der Einzelmутanten aufweist: Sterilität oder eine extrem kurze Lebensdauer von nur 3-4 Tagen.

Diese Interaktion ließ sich auf molekularer Ebene charakterisieren. Die proteolytische Prozessierung von APPL durch Sekretasen ist in *loe* alteriert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die *loe*-Mutation die β -Sekretase aus Vertebraten (BACE) und eine bisher noch nicht beschriebene endogene Sekretase aus *Drosophila* negativ beeinflusst werden. Ein AMPK-Komplex mit LOE I als γ -Untereinheit scheint über den Cholesterinester-Spiegel die Aktivität einer speziellen Untergruppe der Sekretasen zu beeinflussen. Die Missfunktion dieser Sekretasen ist ein kritischer Punkt in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit.

Die *loe*-Mutation wirft neues Licht auf die bekannten Verbindungen zwischen Cholesterinstoffwechsel, Vesikelverkehr und Prozessierung von APP(L). Mit den großen Möglichkeiten, die die *Drosophila*-Genetik bietet, stellt diese neue Mutante ein weiteres Werkzeug zur Charakterisierung von Therapie-Ansätzen für die Alzheimer-Krankheit dar.

Die vorliegende Arbeit belegt um ein weiteres Mal, dass *Drosophila* ein potentes Modellsystem zur Untersuchung humaner, neurodegenerativer Erkrankungen wie *Chorea Huntington*, Parkinson oder der Alzheimer Krankheit ist.

SUMMARY

Human neurodegenerative diseases are the main topic of basic molecular neurobiological research. To investigate general detailed mechanisms *in vivo* one uses genetic model organisms like *Caenorhabditis elegans* or *Drosophila melanogaster* for quite a long while.

This thesis describes the *Drosophila* neurodegeneration mutant *löchrig* (*loe*), which can be used as a model for cholesterol metabolism in respect to neurodegeneration.

Mutant *loe* flies show strong and progressive age-dependent neurodegeneration with necrotic cell death of neurons.

The P-element inserted in an intron of the gene coding for the *Drosophila* 5'-AMP activated protein kinase (AMPK) complex γ -subunit, is responsible for the mutation in *loe*. The various splice forms of the *loe* gene code for different γ -subunits, which are the regulatory subunits of the AMPK complex consisting of three heterodomains.

The splice form *loeI* is affected by the P-element insertion, parts of the P-element are spliced into the *loeI* transcript in the *loe* mutant. The neuronal expression of one copy of *loeI* in the mutant background reverts the neurodegenerative phenotype which can not be achieved by expression of one of the other splice forms.

The LOE I protein contains in its N-terminus several putative interaction motifs and domains. These could get a LOE I-containing AMPK complex in context with the APP (*amyloid precursor protein*) or the cytoskeleton. An interaction with NiPSNAP – a protein with a putative function in vesicular transport – has been proved molecularly.

A human homolog of LOE I is not yet known, although there are three different isoforms of a AMPK γ subunit described in humans.

The *loe* mutant interacts genetically with the *columbus* (*clb*) mutant, *clb* encodes for the HMG-CoA reductase, the key enzyme in cholesterol biosynthesis. This interaction verifies a negative regulation of the HMG-CoA reductase by the AMPK complex in *Drosophila*, because the *clb* mutation suppresses the *loe* phenotype and an overexpression of *clb* enhances the neurodegeneration. A suppression of the neurodegenerative phenotype can also be achieved by a statin treatment of *loe* flies. Statins are potent inhibitors of the HMG-CoA reductase.

Another genetic interaction exists between *loe* and the *AppI* mutant. *AppI*^d, the null mutant of the *Drosophila* APP homolog, enhances strongly the neurodegenerative phenotype of *loe*, whereas the *AppI* mutant itself shows no neuronal defects. In addition the double mutant shows defects which none of the single mutants show: sterility of females and a dramatic shortened lifespan of only 3-4 days.

This interaction could be characterized on the molecular level: The proteolytic processing of APP(L) by secretases is altered in the *loe* mutant. Both the BACE secretase from vertebrates and a so far uncharacterized endogenous secretase in *Drosophila* are negatively influenced by the *loe* mutation. An AMPK complex containing LOE I as the γ -subunit seems to regulate the activity of a subgroup of the secretases via the cholesterol level. The malfunction of secretases is a crucial point in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

The *loe* mutation gives new insights in the already known links between cholesterol homeostasis, vesicular transport, and processing of APP(L). Together with the extensive tools of *Drosophila* genetics this new mutant will offer new possibilities to characterize putative therapies to cure Alzheimer's disease.

This thesis once again presents *Drosophila* as a potent model system for the research on human neurodegenerative diseases like Huntington's, Parkinson's, or Alzheimer's disease.

F. Anhang

```

10      20      30      40      50      60
LOEI   MATNCFIEQPVKQQLANAPVMGVQEDKAQEPKELPDEPAKQPDGQPYQH FAGEDSFEC
HAMPKY M++-----VM+++K-----
MGS-----AVMDTKKK-----
10

70      80      90      100     110     120
LOEI   AFESTMDDLEQGVLDGYESDSEASANDQITDSASSGSLGQLAQOQREERLRGLPGLHG
HAMPKY -----D+S G+ G + +Q+++ LR +H-----VH-----
-----DVSSPGGSGGKKNASQKRRSLR-----
20      30

130     140     150     160     170     180
LOEI   QHIDSEMLKCMPRSNSFDHSSSGSSDDEDDPDDDDDDQVHHSGLSLSGKFKVKVDLYS
HAMPKY -----+P +SE +-----P D D-----L SGK-----
IPDLSSFAM-----PLLDGD-----LEGSGK-----
40      50

190     200     210     220     230     240
LOEI   GHORPGYLLPPYIERRLSQCKEEDDEDEGDRITLGGGSSSTGESTKSEKASKAPPRPPT
HAMPKY -----H+-----R+++-----+ +G GS S G +++-----
-HSS-----RKVD-----SPFGPSPSKGFFSRG-----
60      70      80

250     260     270     280     290     300
LOEI   PQDEASKEKFKDLERLRQFMHKIDRINTRNIEESEAPPPPPPPPIPATILPKALKAL
HAMPKY -----P P P P+ A + PK+-----PQPRPSSPMSAPVRPKT-----
90

310     320     330     340     350     360
LOEI   LHTQEPVAPPSRPSVPGPPSPAPTSSVIVAKETVPVVTPEPVSPPLPTEPPLIIGKFK
HAMPKY -----SP +P + P S +E+P P +P+ +S +G E+-----FSGIFR
-----SPGSPKTVFPFSY-----QESP-PRSPRMS-----
100     110     120

370     380     390     400     410     420
LOEI   VTLAQETPELRVEAQKLSKLNASSNAHTISFPSSFGYSSVQGLFSQRYGSRNRPFTAAPH
HAMPKY -----+ + +P-----+SN I S GG-----SPGGI-----
SSSKESP-----NSNPAT-----
130     140

430     440     450     460     470     480
LOEI   MSKOFFEPSLVEIRTPAQSNVALNTTGLANSNHQSLTCDTNSLANKPRTPSERELDEIWI
HAMPKY -----+FF S +I+GL+++ P TP++ +-----V
-RFFSRSR-----KTSGLSS-----PSTPTQ-----
150     160

490     500     510     520     530     540
LOEI   RRQDGLSGTAAPGAPGAPLPLLLQQQQQQRVPVSLGGASTMPRLLRSESSASTTSPSRQL
HAMPKY -----+D-----+PL + +++ +R-----L+++ AS++ P+-----
TKQH-----TFPLESYKHEPER-----LENRIYASSPPDT-----
170     180     190     200

550     560     570     580     590     600
LOEI   TNSGSVSVSVSDDEQDGSILGGAGRMPGSRPSSAPAEPNAKAAYKMEKEQRRQEKEQ
HAMPKY -----G P+S S P+++-----GQRFPCSSFSQ-PTRP-----
210

610     620     630     640     650     660
LOEI   SRREKEARKLERETARRNEREAAKLEKINRHSEKISRSTERMAMAGVSRSGSLERRRSG
HAMPKY -----

670     680     690     700     710     720
LOEI   EDSFVLNQSTVHGIASPNRRPTIFDVFRPRAKSDAKRQEKHLLDPSSADSSATSSSTYSV
HAMPKY -----P-----+ASP++-----PS+A-----
-----LASPTHYA-----PSKA-----
220

730     740     750     760     770     780
LOEI   SGGTGPATSSAAGGAGGAAAAGQGAAGGAGGLMNSMKVAMQNFHRQHPAVTITSADGT
HAMPKY -----AA AA+ G A +G+++++-----
-----AALAAALGPA-EAGMLEKLE-----
230     240

790     800     810     820     830     840
LOEI   QSTAKSKYKDGSAHPHQSDAQYHTVTAVRPNSSQRSMTKVMDLFRHRSSSVVSEADK
HAMPKY -----

850     860     870     880     890     900
LOEI   RKARAAHQQLAVQSAHMRRASADLEKRRASVGAAGRGLRGDGTLDPHHAAILFRDPSRG
HAMPKY -----F+D-----FED-----
250

910     920     930     940     950     960
LOEI   LPVADPFLEKVNLSDLLEEDSQIFVKFFRFHKCYDLIPTSAKLVVFDLQLLVKKAFFALV
HAMPKY -----E V E+++S ++++F+R HKCYD++PTS+KLVVFDL L VKKAF+ALV

```

```

hAMPKy -----EAV-----EDSESGVYMRFMRSKCYDIVPTSSKLVVFDTTLQVKKAFFALV
                                260      270      280      290

                                970      980      990      1000      1010
LOEI  YNGVRAAPLWDSEKQQFVGMLTTITDFIKILQMYKSPNASMEQLEEHKLDTWRSV-LHNQ
hAMPKy NGVRAAPLW+SKKQ+FVGMLTTITDFINIL+ YKSP +++ +LEEHK++TWR + L++
ANGVRAAPLWESKKQSFVGMLTTITDFINILHRYKSPMVQIYELEEHKIETWRELYLQET
                                300      310      320      330      340      350

                                1020      1030      1040      1050      1060      1070
LOEI  VMPLVSIQPDASLYDAIKILIHRSRIHRLPVIDPATGNVLYILTHKRILRFLFLYINELPK
hAMPKy PLV+I+PDASL+DA+ LI+++IHRLPVIDP +GN+LYILTHKRIL+FL L+++++PK
FKPLVNISPDASLFDVAVSLIKNIHRLPVIDPISGNALYILTHKRILKFLQLFMSDMPK
                                360      370      380      390      400      410

                                1080      1090      1100      1110      1120      1130
LOEI  PAYMQKSLRELKIGTYNNIETADETTSIITALKKFVERRVSALPLVDSGRLVDIYAKFD
hAMPKy PA+M+++L EL IGTY+NI T II AL+ FVERR+SALP+VD +G++VDIY+KFD
PAFMKQNLDELGIGTYHNIAFIHPDTPIIKALNIFVERRISALPVVDESQVVDIYKFD
                                420      430      440      450      460      470

                                1140      1150      1160      1170      1180      1190
LOEI  VINLAAEKTYNLDVSLRKANEHRNEWFEQVQKCNLDESLYTIMERIVRAEVHRLVVDVE
hAMPKy VINLAAEKTYN+LD+++ +A +HR+++FEGV KCN E L IT++RIVRAEVHRLVVDVE
VINLAAEKTYNLDITVTQALQHRSQYFEGVVKCNKLEILETIVDRIVRAEVHRLVVDVE
                                480      490      500      510      520      530

                                1200      1210      1220      1230      1240      1250
LOEI  NRKVIIGIISLSDILLYLVLVLRPSGEGVGGSESSLRASDPVLLRQVAVVEIPATAAAATTTT
hAMPKy +++GIISLSDIL L+L P+G
ADSIVGIIISLSDILQALILTPAG-----
                                540      550      560

                                1260      1270      1280      1290      1300      1310
LOEI  PPRSPSAGSGNRSLIEDIPEEETAPARSDDADSDNKSASEDKANNQHDQTTTAAATANG
hAMPKy -----

                                1320      1330      1340      1350      1360      1370
LOEI  DSNNSPVEVSFADEAQEEEAADQVERSNCDDDDQPALAEIERKNASMDDEDDEDMSSAVS
hAMPKy A+++E+++
-----AKQKETE-----

                                1380      1390      1400
LOEI  AASALGQSLTPAAQEMALVSE
hAMPKy +E
-----TE

```

Abb. 53: alignment zwischen LOE I und hAMPK 2

Die Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle [ST]_x[DE] (¹⁷⁰SGK¹⁷³ bezogen auf LOE I) ist in grün, die MAP2-Kinase Interaktionsstelle [P_xTP] (⁴⁶⁶PRTP⁴⁷⁰ bezogen auf LOE I) ist in rot eingezeichnet. Erklärungen der AS-Konsensi, s Abb. 14, C. I.5.b).

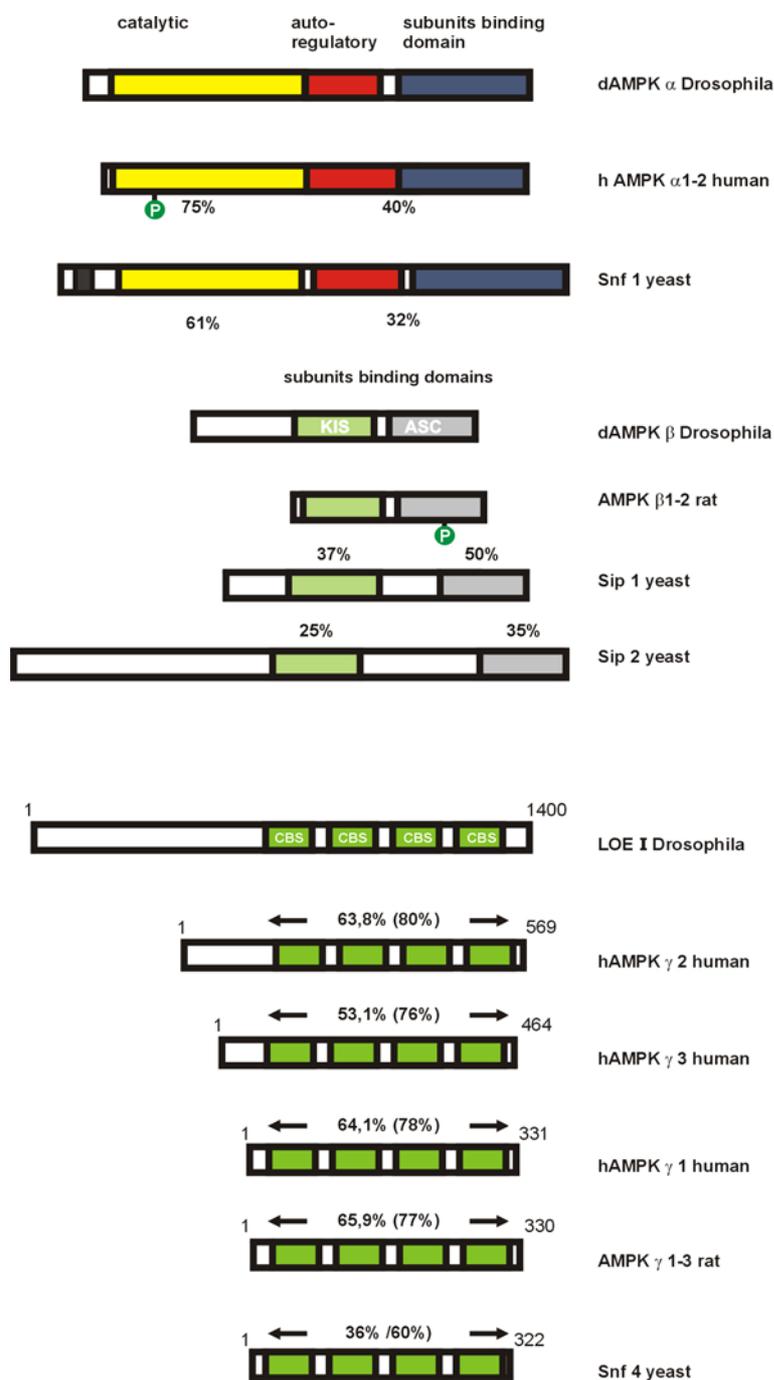


Abb. 54: Die Untereinheiten der AMPK im Vergleich zwischen den Spezies
 modifiziert nach Hardie, 1998 und Kemp, 1999

Protein	Datenbank <i>accession numbers</i>
h α AMPK1	AAD43027.1
h α AMPK2	CAC17574.1
rat α AMPK	AAC52355.1
h β AMPK1	AAC98897.1
rat β AMPK1	AAC52579.1
h γ AMPK1	AAC50495.1
h γ AMPK2	AJ2489976
h γ AMPK3	AJ249977
rat γ AMPK1	AAC52580.1
dSNF4/d γ AMPK	AAC95306.1

Tab. 7: Genbank-Nummern der beschriebenen und verglichenen Proteineweitere: www.ncbi.nlm.nih.gov, www.expasy.org

G. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell der α - und β -Prozessierung von APP in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung.....	6
Abb. 2: Neurodegenerationstypen in Drosophila-Mutanten	9
Abb. 3: Semidünnschnitte durch das Gehirn von loe -Fliegen in verschiedenen Entwicklungsstadien.....	10
Abb. 4: EM Aufnahmen aus dem adulten Gehirn von loe-Fliegen.....	11
Abb. 5: Zusammenfassung der molekularen Analyse des loe Genlocus (Tschaepe, 1998 #12).....	13
Abb. 6: Relative Position der λ -Klone zu den Transkriptvarianten	29
Abb. 7: Karte des λ -Klons 1B22.....	29
Abb. 8: Northern Blot geprobt mit einer für die CBS-Domänen spezifischen Sonde.	30
Abb. 9: Northern Blot geprobt mit einer für loeI spezifischen Sonde.....	30
Abb. 10: Die Varianten loeI - loeIX.....	31
Abb. 11: Die in silico Klonierung des 5'-Bereiches von loeI – 'virtual RACE'	33
Abb. 12: Die Genprodukte der loe-Transkriptvarianten.....	34
Abb. 13: Die Homologien zwischen LOE I und der AMPK- γ aus Vertebraten	35
Abb. 14: Eventuell funktionell bedeutende Motive im N-Terminus von LOE I.....	37
Abb. 15: Die GadFly-Genvoraussage für die AMPK- γ -Untereinheit (SNF4 γ) in Drosophila.	38
Abb. 16: Der AMPK-Komplex im inaktiven und aktiven Zustand.....	39
Abb. 17: Das Gen der dAMPK- α	40
Abb. 18: Die Homologie der AMPK- α zwischen Vertebraten und Drosophila und die funktionellen Domänen	41
Abb. 19: Das Gen der dAMPK- β	42
Abb. 20: Die Homologien der AMPK- β zwischen Vertebraten und Drosophila und die funktionellen Domänen	43
Abb. 21: Northern-Blot-Hybridisierungen zur Charakterisierung des loe Phänotypes auf molekularer Ebene.	45
Abb. 22: Die Transformations-Konstrukte von loeI und loeII.....	46
Abb. 23: Rescue-Experimente mit loeI- und loeII-Konstrukten.....	47
Abb. 24: Das Konstrukt zur Expression einer konstitutiv aktiven α -AMPK.....	48
Abb. 25: Western Blot zur Charakterisierung des Antikörpers anti-LOE I GP	50
Abb. 26: Western-Blot zum Vergleich der Immunoreaktivität der drei gegen LOE III erhaltenen Antisera	51
Abb. 27: Immunhistologische Färbung für anti-LOE III-R1-AK an einem Gehirn-Horizontalschnitt	52
Abb. 28: Die als Epitope gewählten Peptide in ihrer Lage relativ zu den Exons von loeI und loeIII	53
Abb. 29: Die Proteinexpressionskonstrukte in pQE-Vektoren des QiaExpressionist-Systems	54
Abb. 30: Expression von pQE32-loe-CBS in E. coli; Vergleich der Aufschlußarten	55
Abb. 31: Expression von pQE32-loe-I-NtermII und pQE82-loe-NtermI in E. coli	56
Abb. 32: Expression von pQE70-loe-I-Nterm in E. coli.....	57
Abb. 33: Das LOE I-Protein in der Entwicklung im Vergleich Wildtyp und loe	58
Abb. 34: Stärkere Denaturierung kann LOE I aus den Aggregaten herauslösen.....	59
Abb. 35: Immunhistologische Färbung für anti-LOE I-R1-AK an Gehirn-Horizontalschnitten	60
Abb. 36: Rekombinationen nach dem HEI-Prinzip	61
Abb. 37: Karte der genomischen Region von loe und die Rekombinationsereignisse.....	63
Abb. 38: Konstrukte in den Vektoren pAS-2-1 und pSos für die yeast two hybrid- Screens.....	65
Abb. 39: Die genetische Interaktion zwischen loe und clb.....	67
Abb. 40: Vergleich des Vakuolisierungsgrades in loe-Fliegen mit und ohne Mevinacor [®] -Behandlung	69
Abb. 41: Die Lipidzusammensetzung von Gehirnextrakten in loe verglichen mit dem Wildtyp	70
Abb. 42: Der histologische Phänotyp der Appl ^d -loe-Doppelmutante.....	72
Abb. 43: Beeinflussung der Prozessierung von endogenem APPL-Protein durch loeI.....	73
Abb. 44: Die Beeinflussung der Appl-Prozessierung durch Überexpression von presenilin in Abhängigkeit von loeI.....	74
Abb. 45: Die Prozessierung von NOTCH in loe.....	75
Abb. 46: Der Einfluss von kuz auf die Prozessierung von APPL.....	76
Abb. 47: Die Prozessierung von APPL durch BACE in Abhängigkeit von loeI.....	77
Abb. 48: Zusammenfassung der beschriebenen Regulationen durch den AMPK-Komplex	81
Abb. 49: Der AMPK-Komplex im inaktiven und aktiven Zustand.....	82
Abb. 50: Die Homologie zwischen hWASp1 und LOE I im Bereich der Profilin-Interaktionsstelle	86
Abb. 51: Zusammenfassung möglicher Interaktionsmotive von LOE I im AMPK-Komplex	87
Abb. 52: Die Positionen der Sekretase Prozessierungsstellen in hAPP und dAPPL.....	99
Abb. 53: alignment zwischen LOE I und h γ AMPK 2.....	106
Abb. 54: Die Untereinheiten der AMPK im Vergleich zwischen den Spezies	107

H. Verzeichnis der Abkürzungen

5-AMP	5-AdenosinMonoPhosphat
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	desoxyCytosin TrisPhosphat, das α -Phosphat enthält das Isotop Phosphor ³²
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
abs.	absolut
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
AK	Antikörper
AMPK	5AMP-aktivierte Protein Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
BACE	β -site APP cleaving enzyme
BDGP	Berkley <i>Drosophila</i> Genome Project
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
BSE	Bovine Spongiforme Encephalopathy
cAMP	cyclischesAMP(= 3-AMP)
cDNA	complementary DNA
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol
CJD	Creutzfeld-Jacob-Disease
cpm	counts per minute
Cy5	Indocarbocyanin
DC-2	<i>Drosophila</i> cAMP abhängige Proteinkinase 2
DNA	DesoxyriboNucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ER	Endoplasmatisches Retikulum
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
kb	Kilobasen(paare)
konz.	konzentriert
<i>loe</i>	löchrig
LOE	das Protein des <i>loe</i> -Gens
mRNA	messenger RNA
NiPSNAP	<i>NitrophenylPhosphatase-SNAP 25-like protein</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
ORF	open reading frame
PCR	PolymeraseChainReaction
PDZ	PSD-95/DlgA/ZO-1-domain
PEG	PolyEthylenGlycol
pfu	plaque forming units
PTB	<i>phospho tyrosine-binding</i>
RNA	RiboNucleic Acid
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
ÜN	über Nacht
UTR	untranslated region
u.U.	unter Umständen
WT	Wildtyp/wildtypisch

I. Bibliographie

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.

Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR. 2001. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103:373-383.

Arkhipova IR. 1995. Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. *Genetics* 139:1359-1369.

Athenstaedt K, Daum G. 1997. Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179:7611-7616.

Beck K, Brodsky B. 1998. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the α -helical coiled coil. *J Struct Biol* 122:17-29.

Beer J, Masters CL, Beyreuther K. 1995. Cells from peripheral tissues that exhibit high APP expression are characterized by their high membrane fusion activity. *Neurodegeneration* 4:51-59.

Bennett DA, Cochran EJ, Saper CB, Leverenz JB, Gilley DW, Wilson RS. 1993. Pathological changes in frontal cortex from biopsy to autopsy in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 14:589-596.

Bieker JJ. 2001. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 276:34355-34358.

- Bonini NM. 1999. A genetic model for human polyglutamine-repeat disease in *Drosophila melanogaster*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1057-1060.
- Borg JP, Yang Y, De Taddeo-Borg M, Margolis B, Turner RS. 1998. The X11 α protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces A β 40 and A β 42 secretion. *J Biol Chem* 273:14761-14766.
- Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11:82-88.
- Cao X, Sudhof TC. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J* 346 Pt 3:659-669.
- Clontech. 1998. The Matchmaker 2 user manual.
- Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA. 1998. Functional domains of the α 1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:35347-35354.
- De Strooper B, Annaert W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113:1857-1870.
- Ermekova KS, Zambrano N, Linn H, Minopoli G, Gertler F, Russo T, Sudol M. 1997. The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J Biol Chem* 272:32869-32877.
- Evangelista M, Pruyne D, Amberg DC, Boone C, Bretscher A. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* 4:32-41.
- Fassbender K, Masters C, Beyreuther K. 2001. Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften* 88:261-267.
- Feany MB, Bender WW. 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404:394-398.
- Fortini ME, Bonini NM. 2000. Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends Genet* 16:161-167. _00001939 _00001939.

- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67:1882-1896.
- Gao Y, Pimplikar SW. 2001. The γ -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14979-14984.
- Garton AJ, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ, Yeaman SJ. 1989. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem* 179:249-254.
- Gertler FB, Chiu CY, Richter-Mann L, Chin DJ. 1988. Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Cell Biol* 8:2713-2721.
- Gorlich D. 1998. Transport into and out of the cell nucleus. *Embo J* 17:2721-2727.
- Gunawardena S, Goldstein LS. 2001. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 32:389-401.
- Hall DH, Gu G, Garcia-Anoveros J, Gong L, Chalfie M, Driscoll M. 1997. Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17:1033-1045.
- Hammerschmied. 1999. Weiterführende Charakterisierung der Neurodegenerationsmutante löchrig (loe) in *Drosophila melanogaster*. In *Dev. Biology*. Regensburg, Regensburg.
- Hardie DG, Carling D, Carlson M. 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67:821-855.
- Heisenberg M, Heusipp M, Wanke C. 1995. Structural plasticity in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 15:1951-1960.
- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. 2001. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing β -secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414:643-648.
- Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, Goldstein LS. 2000. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28:449-459.

- Kay BK, Williamson MP, Sudol M. 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* 14:231-241.
- Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA. 1999. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 24:22-25. 21_00001340.
- Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ. 2001. The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276:40288-40292.
- Kimura KI, Truman JW. 1990. Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 10:403-401.
- Knauer MF, Orlando RA, Glabe CG. 1996. Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* 740:6-14.
- Kopan R, Goate A. 2000. A common enzyme connects notch signaling and Alzheimer's disease. *Genes Dev* 14:2799-2806.
- Kretzschmar D, Pflugfelder GO. 2002. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. *Brain Res Bull* 57:121-131.
- Leissring MA, Murphy MP, Mead TR, Akbari Y, Sugarman MC, Jannatipour M, Anliker B, Muller U, Saftig P, De Strooper B, Wolfe MS, Golde TE, LaFerla FM. 2002. A physiologic signaling role for the γ -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4697-4702.
- Luo LQ, Martin-Morris LE, White K. 1990. Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849-3861.
- Martin DW, Sachs JR. 2000. Ligands presumed to label high affinity and low affinity ATP binding sites do not interact in an $(\alpha \beta)_2$ diprotomer in duck nasal gland Na^+, K^+ -ATPase, nor Do the sites coexist in native enzyme. *J Biol Chem* 275:24512-24517.
- Mattaj JW, Englmeier L. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67:265-306.

- Mitchelhill KI, Michell BJ, House CM, Stapleton D, Dyck J, Gamble J, Ullrich C, Witters LA, Kemp BE. 1997. Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase β 1 subunit. *J Biol Chem* 272:24475-24479.
- Mount SM, Burks C, Hertz G, Stormo GD, White O, Fields C. 1992. Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 20:4255-4262.
- Müller U, Cristina N, Li ZW, Wolfer DP, Lipp HP, Rulicke T, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C. 1994. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β -amyloid precursor protein gene. *Cell* 79:755-765.
- Nikaido T, Austin J, Trueb L, Hutchison J, Rinehart R, Stuckenbrok H, Miles B. 1970. Isolation and preliminary characterization of Alzheimer plaques from presenile and senile dementia. *Trans Am Neurol Assoc* 95:47-50.
- Nowotny P, Gorski SM, Han SW, Philips K, Ray WJ, Nowotny V, Jones CJ, Clark RF, Cagan RL, Goate AM. 2000. Posttranslational modification and plasma membrane localization of the *Drosophila melanogaster* presenilin. *Mol Cell Neurosci* 15:88-98.
- Ohsawa I, Takamura C, Kohsaka S. 2001. Fibulin-1 binds the amino-terminal head of β -amyloid precursor protein and modulates its physiological function. *J Neurochem* 76:1411-1420.
- Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.
- Pan D, Rubin GM. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271-280.
- Preston CR, Engels WR. 1996. P-element-induced male recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* 144:1611-1622.
- QiaGen. 2001. The QiaExpressionist.
- Raeber AJ, Muramoto T, Kornberg TB, Prusiner SB. 1995. Expression and targeting of Syrian hamster prion protein induced by heat shock in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* 51:317-327.
- Raff MC. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.

- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700.
- Rosen DR, Martin-Morris L, Luo LQ, White K. 1989. A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human β -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2478-2482.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vosshall LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Lewis S. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287:2204-2215.
- Schmitz A, Tikkanen R, Kirfel G, Herzog V. 2002. The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochem Cell Biol* 117:171-180.
- Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.
- Seroussi E, Pan HQ, Kedra D, Roe BA, Dumanski JP. 1998. Characterization of the human NIPSNAP1 gene from 22q12: a member of a novel gene family. *Gene* 212:13-20.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6460-6464.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-1063.
- Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449.
- Steller H, Grether ME. 1994. Programmed cell death in *Drosophila*. *Neuron* 13:1269-1274.
- Stratagene. 2000. The CytoTrap instruction manual.
- Sulston JE, Horvitz HR. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56:110-156.

- Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park JM, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. 2001. A β amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett* 299:169-172.
- Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K. 1999. Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 9:489-492.
- Tschaepe. 1998. Molekulare und genetische Analyse von Löchrig (loe) - einer neuen Neurodegenerationsmutante in *Drosophila melanogaster*. In *Dev. Biology*. Regensburg, Regensburg.
- Turner RT, 3rd, Koelsch G, Hong L, Castanheira P, Ermolieff J, Ghosh AK, Tang J, Castanheira P, Ghosh A. 2001. Subsite specificity of memapsin 2 (β -secretase): implications for inhibitor design. *Biochemistry* 40:10001-10006.
- Van Doren M, Broihier HT, Moore LA, Lehmann R. 1998. HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* 396:466-469.
- Wear MA, Schafer DA, Cooper JA. 2000. Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Curr Biol* 10:R891-895.
- Wolozin B, Kellman W, Rousseau P, Celesia GG, Siegel G. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439-1443.
- Wyllie AH, Bowen ID, Lockshin RA. 1981. Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis. Chapman&Hall, New York. 9-34 pp.
- Yoshida EN, Benkel BF, Fong Y, Hickey DA. 1999. Sequence and phylogenetic analysis of the SNF4/AMPK γ subunit gene from *Drosophila melanogaster*. *Genome* 42:1077-1087.
- Zambrano N, Bruni P, Minopoli G, Mosca R, Molino D, Russo C, Schettini G, Sudol M, Russo T. 2001. The β -amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene. *J Biol Chem* 276:19787-19792.

Danksagung

In aller erster Linie möchte ich mich bei Doris Kretzschmar bedanken, die mir an vielen Tiefpunkten dieses Projektes durch ihr Wissen und ihre Ideen neue Wege gewiesen als auch an Tiefpunkten unseres gemeinsamen Arbeitens in der Universitätsrealität durch ihren Optimismus immer wieder neue Kraft und Hoffnung gegeben hat.

Bei Prof. Heisenberg und Gert Pflugfelder möchte ich mich für die freundliche und bereitwillige Aufnahme von Doris und mir als 'Gestrandete' hier am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie in Würzburg bedanken. Es gab mir die Gelegenheit, meine Arbeit in einem angenehmen und fairen Klima zu beenden. Allen am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie in Regensburg Dank für die Beherbergung in den ersten zwei Jahren der Arbeit.

Stellvertretend für die *Ernst Schering Research Foundation* Frau Dr. Lessl und Frau Breimair meinen lieben Dank für die finanzielle Unterstützung in den letzten zwei Jahren und die Gelegenheit, bei den Treffen der ESRF-Fellows neue Sichtweisen auf die Akademie und das Dasein eines Jungwissenschaftlers zu erlangen und nicht zuletzt neue Freunde zu gewinnen.

Meinen Eltern und unserer Familie, ohne deren Liebe und umfassende Unterstützung ich nie hätte soweit kommen können: Habt alle lieben Dank!

Allen meinen lieben Freunden, die mir immer wieder mit Zuneigung, Zuspruch oder Kritik geholfen haben, die Dinge um meine Arbeit aus einem anderen Blickwinkel zu sehen oder mich einfach nur abzulenken, eine dicke Umarmung. Alex, Dir Dank für alle erheiternden *down loads!*

Bisher ungenannt allen Dank, die durch ihre alltägliche Hilfsbereitschaft mir die Arbeit erleichtert haben.

Nicht unerwähnt sollen Alltags-versüßende *social events* wie das sommerliche 'einen-pressen' mit Basse, Martin, Martin & Co in Würzburg, sowie Ralf's Eck in Regensburg bleiben.

(Mit Doris und Alex [und allen anderen Neurodegenerationsforschern] hoffe ich, daß uns die Neurodegeneration nicht eher zu fassen kriegt, als wir sie! Hallali!)

