

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Alexander Löwer
aus Tübingen

Tag der mündlichen Prüfung:

**Die regulierte Intramembranproteolyse des
Amyloid Precursor Proteins in *Drosophila melanogaster***

Gutachter: Prof. Dr. Renato Paro
Prof. Dr. Dr. h. c. Konrad Beyreuther

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg unter Leitung von Prof. Dr. Renato Paro erstellt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Renato Paro für die Bereitstellung des Projektes und für seine Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit. Bei Prof. Dr. Konrad Beyreuther möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die gute Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe bedanken.

Gunter Merdes möchte ich herzlich für seine Betreuung danken. Seine vielen Ideen und die lebhaften Diskussionen mit ihm haben diese Arbeit geprägt. Vielen Dank auch an Michaela Bilic, meine „Alzheimer“-Kollegin, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und den Spaß während unserer Doktorarbeit. Und vielen Dank an David Kutenkeuler für seine Mitarbeit. Besonders möchte ich mich bei Melanie Müller bedanken, es war eine Freude und eine große Hilfe, mit ihr zusammenzuarbeiten.

Natürlich geht ein großes Dankeschön an alle Mitglieder des Paro Labors für die hervorragende Atmosphäre und für die ständige Hilfsbereitschaft! Vielen Dank Sabine, Marc, Stefan, Nara, Ana, Heidi, Sylvia, Andrea, Christian, Tariq, Leonie, Gero, Christian, Ian, Matthias, Cedric, Gerhard, Inhua. Britta, vielen Dank für die Freundschaft, die vielen Gespräche, Buchtips, Squashpartien und die Spanisch-Hausaufgaben (..mmh?).

Herzlichen Dank auch an alle Mitglieder des Beyreuther Labors für ihre Hilfe. Mein besonderer Dank gilt Peter Soba für die freundschaftliche Zusammenarbeit, für die vielen Diskussionen und Ratschläge!

Britta Koch, Sabine Schmitt und Gunter Merdes möchte ich für die Korrektur dieser Arbeit, vor allem für das Aufspüren der vielen verschluckten Buchstaben, danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern, für ihre ständige Unterstützung bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Sabine, you are the first thing and the last thing on my mind...

Zusammenfassung

In unserer alternden Gesellschaft stellen neurodegenerative Krankheiten eine der größten Herausforderungen für die medizinische Forschung dar. Um effektive Therapieansätze entwickeln zu können, müssen die zellulären Mechanismen der Pathogenese verstanden werden. Der entscheidende Schritt in der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung ist die Produktion des A β -Peptids durch proteolytische Spaltung aus dem Vorläuferprotein APP. In den letzten Jahren konnten die verantwortlichen Proteasen identifiziert werden. Jedoch ist noch unklar, wie diese Proteine reguliert werden, vor allem im Kontext eines intakten Gewebes. In der vorliegenden Arbeit wurde der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* verwendet, um diese Mechanismen weiter aufzuklären.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Möglichkeiten eines genetischen Screens ausgenutzt, um durch Überexpression neue Gene zu finden, die die Prozessierung von APP beeinflussen. Da die Prozessierung von APP der Prozessierung des Rezeptors Notch sehr ähnlich ist, wurden für diesen Screen P-Element Insertionen verwendet, die bekanntermaßen den Signalweg von Notch modifizieren. Diese Vorauswahl hat es erlaubt, trotz einer geringen Zahl getesteter Gene neun Regulatoren der APP Prozessierung zu identifizieren. Zwei dieser Gene wurden molekularbiologisch charakterisiert. Die Kinase Hops/Tlk induziert die vollständige Degradation von APP, ohne dass sich proteolytische Fragmente anreichern. Obwohl gezeigt werden konnte, dass dieser Effekt spezifisch für APP ist, muss der zu Grunde liegende Mechanismus noch weiter aufgeklärt werden. Das Protein dBeach1 führt durch Veränderung der subzellulären Lokalisation von APP zur Akkumulation des α -geschnittenen Fragments. Dafür muss das für die Endozytose verantwortliche NPTY-Motiv in der intrazellulären Domäne von APP vorhanden sein. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation des Vorläuferproteins von entscheidender Bedeutung für die Prozessierung ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit ging der Frage nach, wie *in-vivo* die Freisetzung der intrazellulären Domäne durch Intramembranproteolyse reguliert wird. Durch Verwendung eines GFP-basierten *in-vivo* Reportersystems konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der γ -Sekretase vermittelten Prozessierung von APP abhängig vom Zelltyp ist. In der larvalen Augenimaginalscheibe ist sie auf neuronale Zellen beschränkt. Diese Beschränkung beruht auf direkter Regulation der γ -Sekretase. Durch den Vergleich verschiedener Substrate konnte gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu einer gängigen Hypothese sowohl von der Länge der extrazellulären Domäne, als auch von der Aminosäuresequenz abhängt, ob ein Typ-I Membranprotein von der γ -Sekretase umgesetzt werden kann. Die *in-vivo* Rekonstitution der γ -Sekretase ergab Hinweise auf das Vorhandensein unterschiedlicher Proteasekomplexe mit distinkten Eigenschaften.

Die Identifizierung neuer Regulatoren der APP-Prozessierung bietet nun die Möglichkeit, nach neuen pharmakologischen Angriffspunkten zu suchen. Schon länger wird versucht, Inhibitoren der γ -Sekretase als Therapeutika einzusetzen, doch bisher führte der negative Einfluss auf andere Substrate der Protease zu schweren Nebenwirkungen. Sollten sich jedoch die Aktivitäten, die für die Prozessierung der einzelnen Proteine verantwortlich sind, voneinander trennen lassen, würde sich neue Hoffnung ergeben, die Produktion von A β ohne die Beeinträchtigung lebenswichtiger Signalwege inhibieren zu können.

Summary

Neurodegenerative diseases are one of the major challenges for medical research in our ageing society. For the development of therapeutic treatments, it is crucial to understand the cellular mechanisms underlying the pathogenic events. The central step in the pathogenesis of Alzheimer's disease is the production of the amyloidogenic A β peptide by proteolytic processing of the amyloid precursor protein. Although the responsible proteases have been identified in recent years, little is known about their regulation, especially in the context of an intact tissue. To elucidate these mechanisms, *Drosophila melanogaster* was used as a model organism.

In the first part of this thesis, a genetic screen was done to find new genes that upon overexpression alter the processing of APP. Because of the similarities between the processing of APP and the receptor Notch, P-elements were used that are known to interfere with this signaling pathway. This preselection allowed the identification of nine regulators of the APP processing. Two of these genes were molecularly characterized within this thesis. The kinase Hops/Tlk induces the complete degradation without accumulation of proteolytic fragments. It could be shown that this effect is specific for APP, but the molecular mechanism behind this needs to be studied in greater detail. The protein dBeach1 changes the subcellular localization of APP, which leads to the accumulation of a C-terminal fragment starting at the α -site. For this effect, the NPTY-motif, a signal for endocytosis, is needed in the intracellular domain of APP. Further experiments showed that the subcellular localization of the precursor protein is an important regulator of the proteolytic processing.

In the second part of the thesis, the question was addressed how the γ -secretase mediated release of the intracellular domain is regulated *in-vivo*. By using a GFP-based *in-vivo* reporter system it was found that the efficiency of APP processing depends on the cell type. In the larval eye imaginal disc, the intracellular domain is only released in neuronal cells. This restriction is caused by regulated γ -secretase activity. The comparison of different substrates showed that in contrast to the current hypothesis, both the length of the extracellular domain and the amino acid sequence of a type-I transmembrane protein determine if it is cleaved by the protease complex. The reconstitution of the γ -secretase *in-vivo* provided evidence for the existence of a heterogeneous family of complexes with distinct biological functions.

The identification of novel regulators of the APP processing opens up new possibilities for the identification of pharmacological targets. For a long time, γ -secretase inhibitors have been tested as therapeutics for Alzheimer's disease. So far, the benefit of lowering A β production was always accompanied by the deleterious effects of simultaneously blocking essential signaling pathways. However, if it is possible to separate the activities responsible for the processing of each substrate, there will be new prospects of blocking the production of the amyloidogenic peptide without adverse side effects.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Alzheimersche Erkrankung	1
1.1.1	„Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“	1
1.1.2	Die Amyloid-Hypothese	2
1.1.3	Die physiologische Funktion von APP und seinen Paralogen	2
1.1.4	Die Prozessierung von APP	3
1.1.5	Proteasen der ADAM-Familie sind α -Sekretasen	4
1.1.6	Das „ β -Site Cleaving Enzyme“ (BACE1) ist eine Aspartyl-Protease	6
1.1.7	Ein Proteinkomplex ist verantwortlich für die γ -Sekretaseaktivität.	6
1.2	Der γ-Sekretase Komplex	6
1.2.1	Der γ -Sekretase Komplex besteht aus Presenilin, Nicastrin, Aph1 und Pen2	6
1.2.2	Der Zusammenbau des γ -Sekretase Komplexes	8
1.2.3	γ -Sekretase prozessiert zahlreiche Typ-I Transmembranproteine	9
1.2.4	Regulierte Intramembranproteolyse	10
1.2.5	FAD-Mutanten verändern die Spezifität der γ -Sekretase	12
1.3	Drosophila als Modellsystem der Alzheimerschen Erkrankung	13
1.3.1	Modellierung neurodegenerativer Erkrankung in <i>Drosophila</i>	13
1.3.2	Techniken zur Manipulation der Genexpression	14
1.3.3	Ein <i>in-vivo</i> Reportersystem zur Visualisierung der „Regulierten Intramembranprozessierung“	15
1.4	Ziele der Arbeit	17
2	Ergebnisse	18
2.1	Identifizierung neuer Regulatoren der APP Prozessierung in Drosophila	18
2.1.1	Genetischer Screen zur Identifizierung von Genen mit Einfluss auf die APP Prozessierung	18
2.1.2	Die Kinase Tlk kontrolliert den Metabolismus von APP	27
2.1.3	dBeach1 beeinflusst die Prozessierung von APP und ändert dessen subzelluläre Lokalisation	32
2.2	Räumliche und zeitliche Regulation der γ-Sekretase Aktivität	45
2.2.1	Prozessierung von APP und Notch in <i>Drosophila melanogaster</i>	45
2.2.2	Analyse der charakteristischen Eigenschaften von γ -Sekretase Substraten	55
2.2.3	Modulierung der γ -Sekretase Aktivität	66
3	Diskussion	74
3.1	Neue Regulatoren der APP Prozessierung	74
3.1.1	Die Vorauswahl der untersuchten EP-Elemente	74
3.1.2	Elf EP-Elemente beeinflussen die Prozessierung von APP in <i>Drosophila</i>	75
3.1.3	Die Kinase Hops/Tlk induziert die Degradation von APP	77
3.1.4	dBeach1 beeinflusst die Prozessierung durch Veränderung der subzellulären Lokalisation von APP	78
3.1.5	Die Lokalisation von APP reguliert die Prozessierung	80
3.2	Zeitliche und räumliche Regulation der γ-Sekretase	82
3.2.1	Das <i>in-vivo</i> Reportersystem visualisiert spezifisch γ -Sekretase vermittelte Prozessierung	82
3.2.2	Zelltyp-Spezifität der APP Prozessierung	84
3.2.3	Welche Eigenschaften bestimmen die Erkennung durch den γ -Sekretasekomplex?	86
3.2.4	Wie wird die Spezifität der γ -Sekretase reguliert?	89
3.3	Ausblick	93
4	Material	94
4.1	Bakterienstämme	94
4.2	Fliegenstämme	94
4.2.1	Wildtyp und Balancer	94

4.2.2	Gal4-Treiberlinien	94
4.2.3	UAS-Linien	94
4.2.4	EP-Elemente	95
4.2.5	FAD-Psn-Linien	96
4.2.6	Mutanten und RNAi	96
4.2.7	Reportersystem	96
4.3	Antikörper	98
4.4	Lösungen	99
4.4.1	Nährmedien	99
4.4.2	Antibiotika (Stammlösungen)	99
4.4.3	Selektionsmedien	100
4.4.4	Größenmarker	100
4.4.5	Sonstige Lösungen	100
4.5	Fliegenhaltung	100
4.6	Enzyme	100
4.7	Geräte	101
4.7.1	Mikroskopie	101
4.7.2	Mikroinjektion	101
4.7.3	Agarose-Gelelektrophorese	101
4.7.4	Elektrophorese und Westerntransfer	101
5	Methoden	102
5.1	Molekularbiologische Methoden	102
5.1.1	Reinigung von DNA-Fragmente	102
5.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	102
5.1.3	Restriktionsverdau	102
5.1.4	Dephosphorylierung linearisierter Plasmide	102
5.1.5	Ligation	103
5.1.6	Plasmid-Isolierung durch Minipräp	103
5.1.7	Plasmid-Isolierung durch Midipräp	103
5.1.8	Sequenzierung von Plasmiden	103
5.1.9	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	103
5.1.10	Kolonie-PCR	104
5.1.11	Herstellung elektrokompenter XL1-blue Zellen	104
5.1.12	Herstellung elektrokompenter YZ2000 Zellen	104
5.1.13	Herstellung chemisch-kompenter BL21 Zellen	105
5.1.14	Elektroporation	105
5.1.15	Transformation chemisch-kompenter BL21 Zellen	105
5.1.16	ET-Cloning	105
5.1.17	Isolierung von RNA	106
5.1.18	RT-PCR	106
5.1.19	Northern Blot	107
5.2	Proteinbiochemische Methoden	108
5.2.1	Herstellung von Proteinextrakten adulter Köpfe	108
5.2.2	Herstellung von Proteinextrakten larvaler Imaginalscheiben	108
5.2.3	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkulturzellen	108
5.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western-Transfer	109
5.2.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	110
5.2.6	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	111
5.2.7	Immunisierung von Kaninchen	113
5.2.8	Affinitätsreinigung der Antikörper	113
5.3	Drosophila-spezifische Techniken	114
5.3.1	P-Element vermittelte Keimbahntransformation	114
5.3.2	Etablierung transformierter homozygoter <i>Drosophila</i> -Linien	115
5.3.3	Kartierung der Insertion	115
5.3.4	PCR von einzelnen Fliegen	116
5.3.5	Mutagenese von EP(2)2299	116

5.3.6	Immunfärbung von larvalen Geweben _____	117
5.4	Klonierungsstrategien _____	118
5.4.1	Expressionsvektoren _____	118
5.4.2	P-Element-Vektoren _____	118
5.4.3	Reportersystem _____	119
5.5	Oligonukleotide _____	120
5.5.1	Klonierungen _____	120
5.5.2	RT-PCR _____	121
5.5.3	Northern Blot _____	121
5.5.4	Sequenzierungen _____	121
6	Referenzen _____	122
7	Eigene Veröffentlichungen _____	134
8	Abkürzungen _____	135
9	Vektorkarten _____	137

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimersche Erkrankung

1.1.1 „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“

Unter diesem Titel beschrieb der Arzt Alois Alzheimer zu Beginn des vorigen Jahrhunderts erstmals den Fall einer Patientin, die unter voranschreitendem Verlust des Gedächtnisses und der geistigen Fähigkeiten, sowie unter schwerer Persönlichkeitsstörung litt (Alzheimer 1907). Heute sind bereits zwei Prozent der Bevölkerung in den Industriestaaten von dieser nach ihm benannten neurodegenerativen Erkrankung betroffen (<http://www.alz.org>). Da hohes Alter der bedeutendste Faktor in der Entstehung der Krankheit ist, gehen Schätzungen davon aus, dass die Zahl der Betroffenen in den nächsten Jahren dramatisch steigen wird.

Die klinische Symptomatik der Krankheit lässt sich mit den pathologischen Merkmalen verknüpfen: Durch Degeneration der Synapsen und neuronalen Zelltod schrumpfen die am Lernen und Erinnern beteiligten Bereiche des Gehirns um bis zu 20% (Mattson 2004; Selkoe 2004). In den betroffenen Bereichen fallen zwei charakteristische Strukturen auf, die amyloiden Plaques und Neurofibrillenbündel. Die intrazellulären Neurofibrillenbündel bestehen aus hyperphosphoryliertem Tau, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein. Sie treten in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und auch nach traumatischen Schädigungen des Gehirns in Erscheinung. Erst die Kombination aus Neurofibrillenbündeln und amyloiden Plaques definiert die Alzheimersche Erkrankung. Der Hauptbestandteil dieser extrazellulären Proteinablagerungen ist das 40-42 Aminosäuren (AS) lange Peptid A β , das zu 8-10 nm langen, unlöslichen Fibrillen aggregiert ist (Glenner et al. 1984; Masters et al. 1985). Dieses Peptid entsteht durch proteolytische Prozessierung aus dem „Amyloid Precursor Protein“ APP (Kang et al. 1987; Weidemann et al. 1989; Haass et al. 1992).

Obwohl die meisten Fälle der Alzheimerschen Erkrankung sporadisch auftreten, sind auch familiär vererbte Formen bekannt („Familial Alzheimer’s Disease“, FAD). Diese autosomal dominanten Mutationen führen bereits im Alter von unter fünfzig Jahren zum Auftreten der Symptome. In allen bisher bekannten Familien war eines von drei Genen betroffen: das Vorläuferprotein APP, Presenilin 1 oder 2 (PS1 oder 2). Alle Mutationen haben gemeinsam, dass sie zur erhöhten Produktion der 42 AS langen Form des A β -Peptids führen (Suzuki et al. 1994; Scheuner et al. 1996). Die zwei zusätzlichen hydrophoben Aminosäurereste erhöhen im Vergleich zu A β 40 die Neigung zur Aggregation und damit die pathogene Eigenschaften des Peptids.

1.1.2 Die Amyloid-Hypothese

Die Ergebnisse der genetischen und molekularbiologischen Studien führten zur Formulierung der Amyloid-Hypothese über die Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung (Hardy et al. 2002): Zu Beginn der pathogenen Ereignisse steht eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Produktion und Abbau des A β -Peptids. Im Fall der familiär vererbten Formen der Krankheit lässt sich dies auf die Mutationen in APP, PS1 oder PS2 zurückführen. In den sporadisch auftretenden Fällen spielen wahrscheinlich altersabhängige Vorgänge wie oxidativer Stress, Störungen des Energiestoffwechsels oder Veränderungen im Ionen-Haushalt eine Rolle. Das A β -Peptid beginnt dann zu oligomerisieren und es bilden sich diffuse Plaques. Zahlreiche Studien belegen, dass diese oligomeren Formen von A β die primären toxischen Agenzien darstellen, die zu Veränderungen in der synaptischen Aktivität führen. Zusätzlich induzieren die diffusen Ablagerungen des Peptides Entzündungsreaktionen in den betroffenen Bereichen des Gehirns. Zusammen mit der toxischen Wirkung von A β führt dies zu fortschreitenden synaptischen und neuritischen Schädigungen. In einer Kaskade von negativen Auswirkungen kommt es zur Störung weiterer zellulärer Prozesse, zum Beispiel im Ionenhaushalt und in der Steuerung von Kinasen und Phosphatasen. Unter anderem zieht dies die Hyperphosphorylierung von Tau nach sich, so dass Neurofibrillenbündel entstehen. Die Summe dieser Schädigungen führt zum Verlust der neuronalen Funktion und dem Absterben der betroffenen Zellen, wodurch letztendlich die Demenz der erkrankten Personen verursacht wird.

Obwohl die Amyloid-Hypothese nicht unumstritten ist, stellt sie momentan doch die beste Erklärung für die Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung dar. Auf ihrer Basis konnten in den letzten Jahren vielversprechende Therapieansätze entwickelt werden (Citron 2004).

1.1.3 Die physiologische Funktion von APP und seinen Paralogen

Der vorherige Abschnitt macht die zentrale Rolle des A β -Peptid in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung deutlich. Es entsteht durch die komplexe Prozessierung des Vorläuferproteins APP. APP ist ein ubiquitär exprimiertes, glykosyliertes Typ-I Transmembranprotein (Kang et al. 1987; Weidemann et al. 1989). Es ist evolutionär hoch konserviert, so dass auch in den Genomen von *Xenopus laevis* (Okado et al. 1992), *Drosophila melanogaster* (Luo et al. 1990) und *Caenorhabditis elegans* (Daigle et al. 1993) entsprechende Homologe identifiziert werden konnten.

Trotz intensiver Forschung ist die physiologische Rolle von APP noch immer nicht vollständig verstanden. Neben möglichen Funktionen während des Wachstum der Neuriten

(Allinquant et al. 1995; Qiu et al. 1995), der Zellmigration (Sabo et al. 2001) und der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (Hayashi et al. 1994; Caille et al. 2004), spielt APP auch eine wichtige Rolle in der neuronalen Zelladhäsion (Breen et al. 1991). Im Labor unseres Kooperationspartners Dr. Beyreuther konnte in eleganten Versuchen gezeigt werden, dass APP sowohl Homo- als auch Heterodimere mit seinen Paralogen Amyloid Precursor Like Protein (APLP) 1 und 2 bildet und dies die Adhäsionseigenschaften der Zellen beeinflusst (Soba et al. 2005). APP hat aber auch einen Einfluss auf die Signaltransduktion während der Entwicklung. So konnte unsere Gruppe zeigen, dass die Proteine der APP Familie während der Entwicklung des peripheren Nervensystems von *Drosophila* den Notch-Signalweg beeinflussen (Merdes et al. 2004).

Die *in-vivo* Studien der physiologischen Rolle von APP werden durch die funktionelle Redundanz der beiden Paraloge APLP 1 und 2 erschwert (Wasco et al. 1992; Slunt et al. 1994). Mäuse, denen ein einzelnes Mitglied dieser APP-Proteinfamilie fehlt, zeigen nur einen leichten Phänotyp (Muller et al. 1994; Zheng et al. 1995) Erst der gleichzeitige Verlust mehrerer Gene führt zu embryonaler Letalität (von Koch et al. 1997; Heber et al. 2000; Herms et al. 2004). Der Phänotyp des dreifachen Knock-outs deutet auf eine Funktion für die Migration und Adhäsion der Neurone hin und zeigt somit die essentielle Rolle dieser Genfamilie für die Entwicklung des Gehirns.

1.1.4 Die Prozessierung von APP

Während die physiologische Funktion von APP noch ungeklärt ist, wurden in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis seiner Prozessierung und damit der Freisetzung von A β gemacht (Selkoe et al. 1996; Haass 2004). Dieses pathogene Peptid wird durch die aufeinander folgende Aktivität zweier Proteasen freigesetzt (Abb. 1): Der erste Schnitt erfolgt in der extrazellulären Domäne an der so genannten β -Schnittstelle (Haass et al. 1992; Seubert et al. 1993). Dadurch wird die lösliche Ektodomäne freigesetzt (sAPP β), der C-Terminus dagegen bleibt in der Membran verankert. Dieser Rest ist nun ein Substrat für die γ -Sekretase, die eine ungewöhnliche Hydrolyse innerhalb der Membran katalysiert, so dass die intrazelluläre Domäne und das A β -Peptid freigesetzt werden (Haass et al. 1992; Weidemann et al. 2002).

Eine weitere extrazelluläre Proteaseaktivität wirkt diesem amyloidogenen Abbauweg entgegen (Abb. 1): Sie führt zur Prozessierung an der α -Schnittstelle innerhalb der A β -Sequenz, wodurch ein etwas längeres N-terminales Fragment (sAPP α) sekretiert wird (Esch et al. 1990). Der entstehende C-terminale Rest wird wiederum von der γ -Sekretase erkannt;

die Aktivität der Proteinkinasen C (PKC), die durch Phospholipide, Diacylglycerol (DAG) oder Phorbolster aktiviert werden (Newton 1995). Stimulation von Zellen mit Phorbolestern führt zur verstärkten Sekretion von sAPP α und gleichzeitiger Inhibition der A β -Produktion (Hung et al. 1993; Slack et al. 1993). Auch Neurotransmitter können durch Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren die PKC aktivieren und dadurch die α -Sekretase stimulieren (Nitsch et al. 1992). Dies zeigt, dass die Prozessierung von APP direkt von neuronaler Aktivität beeinflusst werden kann. Weitere Regulatoren der sAPP α -Sekretion sind zum Beispiel kleine G-Proteine der Rho-Familie (Maillet et al. 2003; Pedrini et al. 2005) oder die „Mitogen-activated protein kinase“ (Mills et al. 1997).

Die Verwendung von spezifischen Inhibitoren zeigte, dass die Prozessierung von APP an der α -Schnittstelle von Metalloproteasen katalysiert wird (Roberts et al. 1994). Dies erlaubte die Identifizierung von drei Mitgliedern der ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) – Proteinfamilie als α -Sekretasen. ADAMs sind Typ I Transmembranproteine, die aus der Zink-bindenden katalytischen, einer cystein-reichen Disintegrin- und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne bestehen (Blobel et al. 1992). Die Proteine werden als Proenzyme synthetisiert und durch Furin aktiviert.

Die Beteiligung von ADAM17/Tumor Necrosis Factor- α Convertase (TACE) an der APP Prozessierung konnte in Knock-out Zellen gezeigt werden (Buxbaum et al. 1998): In diesen Zellen stimulierten Phorbolster keine verstärkte Sekretion von sAPP α mehr. Die konstitutive Prozessierung war jedoch nicht betroffen. Durch Überexpression verschiedener Formen von ADAM10 konnte gezeigt werden, dass auch diese Protease α -Sekretase Aktivität besitzt (Lammich et al. 1999). Der Verlust von ADAM10 führt dagegen zu keiner deutlichen Veränderung der sAPP α -Sekretion in Mäusen (Hartmann et al. 2002). Als weiteres Mitglied dieser Proteasefamilie scheint auch ADAM9 α -Sekretase-Aktivität zu besitzen, obwohl hier ebenfalls teilweise widersprüchliche Studien existieren (Koike et al. 1999; Weskamp et al. 2002).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass es keine einzelne α -Sekretase gibt, sondern dass verschiedene Proteasen im Zusammenspiel APP an der α -Schnittstelle prozessieren (Allinson et al. 2003). Diese Sichtweise wird durch RNAi-Studien gestützt, in denen die verringerte Expression der drei erwähnten ADAMs alleine nur einen geringen Einfluss auf die Prozessierung von APP hatten. Erst die gleichzeitige RNAi gegen alle drei Proteasen führte zum Verlust der α -Sekretase Aktivität (Asai et al. 2003).

1.1.6 Das „ β -Site Cleaving Enzyme“ (BACE1) ist eine Aspartyl-Protease

Die Entstehung des pathogenen A β -Peptids beginnt mit der extrazellulären Spaltung von APP an der β -Schnittstelle. Durch verschiedene Ansätze konnte das „ β -Site APP Cleaving Enzyme“ (BACE1) identifiziert werden (Hussain et al. 1999; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999). BACE1 ist eine membranständige Aspartylprotease, die eine eigene Untergruppe der Pepsin Familie definiert. Durch den Knock-out des Gens in Mäusen konnte eindeutig gezeigt werden, dass BACE1 alleine für die β -Sekretase Aktivität verantwortlich ist (Cai et al. 2001; Luo et al. 2001). Es existiert zwar ein Paralog von BACE1 in Säugetieren (BACE2); dieses wird aber kaum neuronal exprimiert und schneidet APP nicht an der β -, sondern nahe der α -Schnittstelle (Farzan et al. 2000).

BACE1 wird ebenfalls als Proenzym synthetisiert und nach Prozessierung zur Plasmamembran transportiert. Dort ist es mit Lipid-Mikrodomänen („rafts“) assoziiert, in denen auch die Prozessierung von APP stattfinden kann (Ehehalt et al. 2003). Von dort aus kann BACE in endosomale Kompartimente internalisiert werden (Huse et al. 2000). Obwohl neben APP noch zwei weitere Substrate von BACE identifiziert wurden (Kitazume et al. 2001; Lichtenthaler et al. 2003), ist die biologische Funktion dieser Protease unklar, da der Verlust des Proteins keinen Phänotyp induziert.

1.1.7 Ein Proteinkomplex ist verantwortlich für die γ -Sekretaseaktivität.

Die γ -Sekretase katalysiert eine äußerst ungewöhnliche Reaktion: eine Hydrolyse innerhalb der hydrophoben Umgebung der Membran. Lange Zeit war völlig unklar, welche Art von Protease für diesen Teil der Prozessierung verantwortlich ist. Da die Identifizierung des Proteinkomplexes, der die gesuchte γ -Sekretase bildet, einen großen Fortschritt in der Erforschung der Alzheimerschen Erkrankung darstellt, wird er im nächsten Abschnitt ausführlich beschrieben.

1.2 Der γ -Sekretase Komplex

1.2.1 Der γ -Sekretase Komplex besteht aus Presenilin, Nicastrin, Aph1 und Pen2

In den letzten Jahren konnte durch die Kombination von biochemischen und genetischen Methoden gezeigt werden, dass ein Proteinkomplex aus Presenilin, Nicastrin, Aph1 und Pen2 für die γ -Sekretaseaktivität verantwortlich ist (Abb. 2 A, Übersichtsartikel: Periz et al. 2004). Presenilin ist ein Membranprotein mit acht Transmembrandomänen (TM), kleinen N- und C-terminalen intrazellulären Domänen und einer großen cytoplasmatischen Schleife zwischen

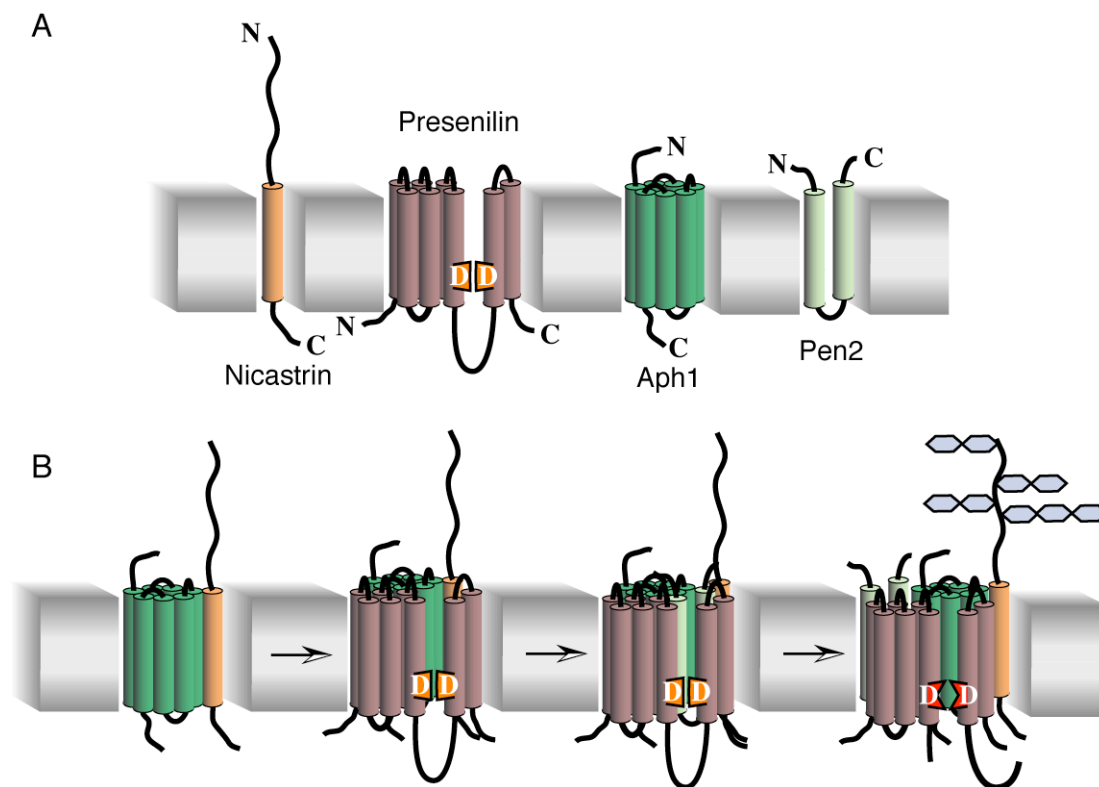


Abb. 2 Der γ -Sekretasekomplex. A) Schematische Darstellung der vier Proteine Nicastrin, Presenilin, Aph1 und Pen2, die zusammen den γ -Sekretasekomplex bilden. B) Der Zusammenbau des Proteasekomplexes läuft in geordneter Reihenfolge ab: Zuerst bilden Aph1 und Nicastrin einen Subkomplex, an den Presenilin bindet. Dadurch wird das Presenilin-Holoprotein stabilisiert. Erst die Bindung von Pen2 veranlasst die endoproteolytische Spaltung und die Maturierung des Komplexes. Ob alle vier Proteine auch Bestandteil der aktiven Protease sind, ist noch nicht vollständig geklärt.

TM 6 und 7 (Doan et al. 1996; Li et al. 1996). Nach einer endoproteolytischen Spaltung in dieser cytoplasmatischen Schleife bildet es ein Heterodimer aus dem aminoterminalen (NTF) und dem carboxyterminalen (CTF) Fragment. Seitdem entdeckt wurde, dass Mutationen in PS1 und PS2 familiäre Formen der Alzheimerschen Krankheit auslösen können, wurden diese Proteine mit der γ -Sekretase in Verbindung gebracht. Durch verschiedene Studien konnte schließlich gezeigt werden, dass sie das aktive Zentrum des Proteasekomplexes bilden: Erstens führen Mutationen in zwei konservierten Aspartyl-Resten zum Verlust der γ -Sekretaseaktivität (Wolfe et al. 1999). Zweitens binden photoaktivierbare Inhibitoren der Protease spezifisch an Presenilin (Esler et al. 2000; Li et al. 2000). Außerdem wurden schwache Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zu den bakteriellen Typ-4 Prepilin Proteasen und den Signalpeptidpeptidasen gefunden, die nahe legen, dass Presenilin zusammen mit diesen Proteinen eine neue Klasse von Aspartylproteasen bildet (Steiner et al. 2000; Weihofen et al. 2002).

Dennoch konnte Presenilin nicht der einzige Bestandteil der γ -Sekretase sein, da verschiedene biochemische Methoden gezeigt haben, dass die Protease eine Masse von 250-2000 kDa hat

(Übersichtsartikel: Esler et al. 2001). Durch genetische Interaktion und biochemische Reinigung wurde Nicastrin (Nct) als weiterer Bestandteil des γ -Sekretasekomplexes identifiziert (Goutte et al. 2000; Yu et al. 2000). Dieses glykosylierte und sialysierte Typ-I Transmembranprotein interagiert sowohl mit Presenilin als auch mit dem Substrat APP. Genetische Screens in dem Nematoden *C. elegans* erlaubten schließlich die Identifikation der zwei weiteren Komponenten des Komplexes: Aph1 und Pen2 (Francis et al. 2002; Goutte et al. 2002). Aph1 ist ein Protein mit sieben, Pen2 mit zwei Transmembrandomänen. Beide haben keine Homologien zu bekannten Proteinen.

Die vier beschriebenen Proteine sind für die γ -Sekretaseaktivität notwendig (Übersichtsartikel: Fortini 2002), aber sind sie auch ausreichend? Die Überexpression von Presenilin alleine führt nicht zur einer Steigerung der Proteaseaktivität, sondern das Protein wird rasch degradiert. Daher wurde die These aufgestellt, dass ein limitierender Faktor die Menge an Presenilin kontrolliert, die maturiert und in den Komplex eingebaut wird (Thinakaran et al. 1997). Die Identifizierung der drei Kofaktoren führte zu einer Serie von Studien, die zeigten, dass erst die koordinierte Expression von PS, Nct, Aph1 und Pen2 zur Stabilisierung des Komplexes und zur Maturierung seiner Komponenten führt (Hu et al. 2003; Kimberly et al. 2003; Takasugi et al. 2003). Die verstärkte Expression wurde dabei von erhöhter proteolytischer Aktivität begleitet. In einem eleganten Experiment in *Saccharomyces cerevisiae* konnte schließlich bewiesen werden, dass diese vier Proteine ausreichend sind, um die in diesem Organismus fehlende γ -Sekretaseaktivität wiederherzustellen (Edbauer et al. 2003).

1.2.2 Der Zusammenbau des γ -Sekretase Komplexes

Durch die Expression der vier Komponenten in verschiedenen Kombinationen konnte folgender Ablauf für den Zusammenbau des Komplexes hergeleitet werden (Abb. 2, Übersichtsartikel: Fortini 2002; Edbauer et al. 2003; Hu et al. 2003; Kim et al. 2003; Kimberly et al. 2003; LaVoie et al. 2003; Luo et al. 2003; Takasugi et al. 2003): Zuerst bilden Nicastrin und Aph1 einen stabilen Subkomplex im endoplasmatischen Retikulum. Dieser Subkomplex enthält unreife, nur teilweise glykosylierte Formen von Nicastrin. Daraufhin bindet das Presenilin-Holoprotein an diesen Subkomplex. Dabei scheint Aph1 eine stabilisierende Wirkung auf ungeschnittenes Presenilin zu haben, das ansonsten schnell degradiert wird. Schließlich wird die Reifung des Komplexes durch Bindung von Pen2 abgeschlossen. Dieser Schritt löst die endoproteolytische Spaltung von Presenilin aus und der maturierte Komplex kann durch den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche und in

endosomale Kompartimente gelangen. Dabei wird die Glykosylierung von Nicastrin abgeschlossen.

Die genaue molekulare Funktion der einzelnen Kofaktoren ist noch unklar. Während die Rolle von Aph1 für die Stabilisierung des Presenilin Holoproteins klar zu sein scheint (Niimura et al. 2005), ist umstritten, ob es auch Teil des aktiven Proteasekomplexes ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Aph1 auch die reifen Presenilin Fragmente und maturiertes Nicastrin binden kann (Lee et al. 2004). Auch die präzise Funktion von Pen2 ist noch nicht aufgeklärt; es sind jedoch konservierte Motive bekannt, die sowohl für den Zusammenbau, als auch die proteolytische Aktivität des Komplexes benötigt werden (Hasegawa et al. 2004). Der komplexe Reifungsprozess scheint eine Qualitätskontrolle für den Proteasekomplex darzustellen. So konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von Nicastrin ein Signal in Presenilin verdeckt wird, das ansonsten für den Verbleib im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist (Kaether et al. 2004).

1.2.3 γ -Sekretase prozessiert zahlreiche Typ-I Transmembranproteine

APP ist nicht das einzige Substrat der γ -Sekretase, sondern es wurden mittlerweile zahlreiche Typ-I Membranproteine identifiziert, die ähnlich prozessiert werden (Kopan et al. 2004). Von den bekannten Substraten ist der Signalrezeptor Notch das prominenteste Beispiel (Abb. 3, (Struhl et al. 1998; Ye et al. 1999; Struhl et al. 2001)). Der Notch-Signalweg ist in allen Metazoa für die Steuerung verschiedener Entwicklungsprozesse verantwortlich (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Während für APP die biologische Funktion der γ -Sekretase vermittelten Prozessierung noch immer nicht verstanden ist, konnte eindeutig gezeigt werden, dass sie eine zentrale Rolle in der Signalübermittlung durch Notch spielt (Kidd et al. 1998; Struhl et al. 1998; Schweisguth 2004): Während des Transports durch den sekretorischen Weg wird Notch konstitutiv in der extrazellulären Domäne geschnitten, so dass auf der Oberfläche ein aktives Heterodimer präsentiert wird. Nach Bindung der Liganden Delta oder Serrate/Jagged folgt eine weitere proteolytische Spaltung auf der extrazellulären Seite in der Nähe der Membran (Mumm et al. 2000). Für diese Prozessierung sind ähnlich wie bei APP Proteasen der ADAM-Familie verantwortlich (Brou et al. 2000). Das entstehende C-terminale Fragment ist dann ein Substrat für den γ -Sekretasekomplex, dessen proteolytische Aktivität zur Freisetzung der intrazellulären Domäne (N^{ICD}) führt. Diese gelangt in den Nukleus, wo sie an den Transkriptionsfaktor CSL (C-promoter-binding factor/Suppressor of Hairless/Lag1) bindet. Die Bindung der N^{ICD} wandelt CSL von einem transkriptionellen Repressor zu einem Aktivator (Fryer et al. 2002).

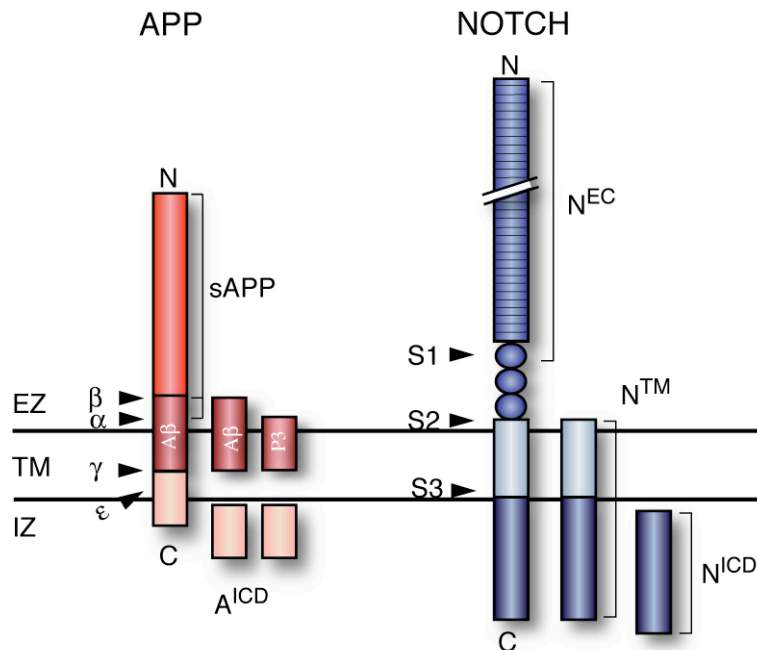


Abb. 3 Vergleich der Prozessierung von APP und Notch. Die Prozessierung des Signalrezeptors Notch ist der Prozessierung von APP sehr ähnlich. Nach der Bindung des Liganden erfolgt die Prozessierung an der S2-Schnittstelle durch Proteasen der ADAM-Familie. Das entstandene CTF wird dann von der γ -Sekretase geschnitten, so dass die intrazelluläre Domäne freigesetzt wird. Auf der Zelloberfläche liegt der Rezeptor als aktives Heterodimer vor, da er im sekretorischen Weg konstitutiv von Furin an der S1-Schnittstelle gespalten wird. Vergleicht man die Prozessierung der beiden Proteine, sind die α - und S2-, bzw. die ϵ - und S3-Schnittstelle sowohl von der Position als auch von den verantwortlichen Proteasen äquivalent.

Weitere identifizierte Substrate der γ -Sekretase sind zum Beispiel APLP1 und 2, die Paraloge von APP, Delta und Jagged, die Notch-Liganden, die Zelladhäsionsmoleküle N- und E-Cadherin und die Rezeptoren ErbB4 und LRP.

1.2.4 Regulierte Intramembranproteolyse

Die Prozessierung von Notch ist ein Musterbeispiel für einen zellulären Prozess, der regulierte Intramembranproteolyse (RIP) genannt wird (Brown et al. 2000). Dieser Mechanismus der Signaltransduktion, der während der Evolution von Bakterien bis zu Säugetieren konserviert blieb, beruht auf der proteolytischen Freisetzung der intrazellulären Domäne von Transmembranrezeptoren, die in den Kern transportiert wird und dort direkt die Expression von Zielgenen beeinflusst. Der Ausgangspunkt der RIP ist jeweils ein erster Schnitt in der extrazellulären oder luminalen Domäne des Rezeptors, wodurch der größte Teil des Proteins sekretiert wird. Der verbleibende Rest stellt dann das Substrat für eine Protease dar, die Peptidbindungen innerhalb der Membran hydrolysieren kann („intramembrane-cleaving protease“, iCLiP), so dass die intrazelluläre Domäne freigesetzt wird.

Eine weiteres gut charakterisiertes Beispiel für RIP ist der Signalweg, der die Steroidsynthese reguliert (Rawson 2002). Bei Steroidmangel wird das Sterol-regulatory-element-binding

protein (SREBP) vom ER in den Golgi-Apparat transportiert, wo es zuerst von der Site-1 Protease in der luminalen Domäne geschnitten wird. Der verbleibende, N-terminale Rest stellt ein Typ-II Membranprotein dar, welches von der Site-2 Protease erkannt und innerhalb der Membran gespalten wird. Daraufhin kann das intrazelluläre Fragment in den Kern gelangen, wo es durch eine Helix-Loop-Helix Domäne an bestimmte Sequenzen (SRE) in den Promotoren von Enzymen des Steroid-Stoffwechsels binden kann.

Die Ähnlichkeit der APP Prozessierung mit der signalverarbeitenden RIP legt die Vermutung nahe, dass auch die A^{ICD} eine Rolle in der Regulation der transkriptionellen Aktivität spielt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass A^{ICD} zusammen mit dem Adapterprotein FE65 und der Histonacetyltransferase Tip60 in Zellkultur die Aktivität eines Reportergens regulieren kann (Cao et al. 2001). Mit dem NF- κ B regulierten Gen KAI1 konnte sogar ein endogenes Ziel dieses Komplexes identifiziert werden (Baek et al. 2002). Allerdings ist noch ungeklärt, ob A^{ICD} ein Bestandteil des aktiven Transkriptionskomplexes im Kern ist, oder seine Wirkung an der Membran durch Veränderung der FE65-Konformation ausübt (Cao et al. 2004).

Wodurch wird die Freisetzung der intrazellulären Domäne während der RIP reguliert? Von großer Bedeutung scheint der erste, extrazelluläre Schnitt zu sein. Im Falle des Notch-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass dieser durch die Bindung des Liganden induziert wird (Mumm et al. 2000). Für die Prozessierung von SREBP scheint der Transport in den Golgiapparat das auslösende Ereignis zu sein. Wodurch die Prozessierung von APP an der α - oder β -Schnittstelle angeregt wird, ist noch unklar. Es wurde jedoch mit F-Spondin ein potentieller Ligand von APP identifiziert, der Einfluss auf die Prozessierung nehmen kann (Ho et al. 2004).

Während also in einigen Fällen gezeigt werden konnte, dass die proteolytische Spaltung in der extrazellulären Juxtamembranregion durch die Bindung von Liganden reguliert wird, ist es noch unklar, wodurch die γ -Sekretase vermittelte Freisetzung der intrazellulären Domäne ausgelöst wird. Es wurde vorgeschlagen, dass die Substraterkennung durch den Proteasekomplex nur von der Länge der extrazellulären Domäne abhängt (Struhl et al. 2000). Dies würde bedeuten, dass jedes Typ-I Transmembranprotein durch Prozessierung in der extrazellulären Domäne zu einem Substrat für die γ -Sekretase würde. Allerdings gibt es auch Studien, die dieser Sichtweise widersprechen (Lieber et al. 2002): In *Drosophila* können zwei Proteasen Notch in der extrazellulären Domäne an einer ähnlichen Position schneiden. Die so erzeugten verkürzten Proteine wurden anschließend jedoch mit unterschiedlicher Effizienz von der γ -Sekretase erkannt und umgesetzt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Notch nach der Liganden-induzierten Spaltung ubiquitiniert und endozytiert werden

muss, bevor die Freisetzung der intrazellulären Domäne stattfinden kann (Gupta-Rossi et al. 2004). Diese Arbeiten deuten darauf hin, dass es auch nach der Abspaltung der extrazellulären Domäne noch regulatorische Schritte geben muss.

1.2.5 FAD-Mutanten verändern die Spezifität der γ -Sekretase

Als die genaue Position der Schnittstelle in den verschiedenen Substraten der γ -Sekretase untersucht wurde, zeigte sich eine unerwartete Eigenschaft dieser Protease: Während für APP ein Schnitt in der Mitte der Transmembrandomäne dokumentiert war, der zur Produktion von A β führt, wird N^{ICD} durch eine proteolytische Spaltung am cytoplasmatischen Ende der Transmembrandomäne freigesetzt. Präzisere Untersuchungen der proteolytischen Fragmente ergaben, dass beide Proteine sowohl in der Mitte (γ -Schnittstelle in APP, S4 in Notch), als auch am Ende der Transmembrandomäne (ϵ -Schnittstelle in APP, S3 in Notch) prozessiert werden (Abb. 4, Okochi et al. 2002; Weidemann et al. 2002). Aber wie soll eine Protease mit einem aktivem Zentrum gleichzeitig oder in kurzem Abstand Peptidbindungen an zwei verschiedenen Stellen spalten? Nachdem die Möglichkeit zweier verschiedener Proteasen ausgeschlossen scheint, ist momentan die beste Erklärung ein katalytischer Mechanismus, der ein Dimer von zwei Presenilinmolekülen im Zentrum des Proteasekomplexes postuliert (Schroeter et al. 2003; Cervantes et al. 2004; Nyborg et al. 2004). In einem solchen Komplex stünden zumindest drei Aspartatreste zu Verfügung, um das aktive Zentrum an verschiedenen Stellen innerhalb der Membran zu bilden. Ein oder mehrere Presenilin-Dimere würden auch gut mit der publizierten Größe des gereinigten γ -Sekretasekomplexes übereinstimmen, obwohl diese stark von den verwendeten Detergenzien abhängt (Li et al. 2000; Steiner et al. 2002; Farmery et al. 2003; Kimberly et al. 2003; Evin et al. 2005).

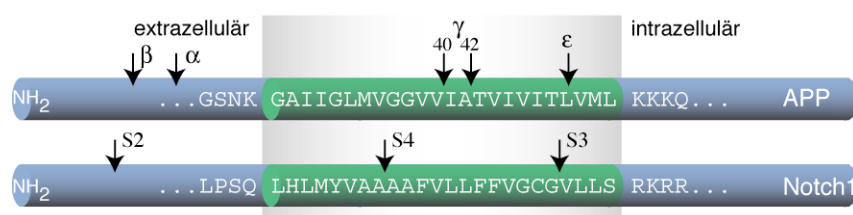


Abb. 4 γ -Sekretase schneidet an zwei verschiedenen Positionen in der Transmembrandomäne. APP und Notch werden sowohl in der Mitte (γ -Schnittstelle bzw. S4), als auch am Ende der Transmembrandomäne (ϵ -Schnittstelle bzw. S3) proteolytisch gespalten. Dabei werden neben der intrazellulären Domäne die kleinen Peptide A β und N β freigesetzt.

Diese Hypothese könnte die Wirkung der meisten FAD-Mutationen in Presenilin erklären: Sie erhöhen die Produktion von A β 42, behindern aber kaum die Freisetzung von A^{ICD} und N^{ICD} (Esler et al. 2001). Beispiele hierfür sind die Mutationen L235P und E280A (Campion et al.

1996; Lemere et al. 1996). Dabei bestimmt die Menge an produziertem A β 42 das durchschnittliche Alter, in dem die Alzheimersche Erkrankung auftritt (Duering et al. 2005). Neben den Mutationen, die nur die Position der Schnittstelle verändern, wurden aber auch solche entdeckt, die die Aktivität der Protease und damit die Freisetzung der intrazellulären Domäne verringern (Song et al. 1999; Moehlmann et al. 2002). Diese führen zu einem besonders frühen Krankheitsbeginn.

1.3 *Drosophila* als Modellsystem der Alzheimerschen Erkrankung

1.3.1 Modellierung neurodegenerativer Erkrankung in *Drosophila*

Die Entdeckung von familiär vererbten Formen neurodegenerativer Krankheiten ermöglichte die Identifikation der an der Pathogenese beteiligten Proteine. Sind die verantwortlichen humanen Gene bekannt, können Modelle der Erkrankungen in genetisch untersuchbaren Modellorganismen erstellt werden, zum Beispiel in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Muqit et al. 2002; Driscoll et al. 2003).

Doch welche Vorteile kann ein *Drosophila*-Modell menschlicher Krankheiten bieten? Zunächst hat die Sequenzierung des menschlichen Genoms gezeigt, dass viele humane Proteine in der Fliege konserviert sind. Unter anderem konnten für 62% der Gene, die an menschlichen Krankheiten beteiligt sind, Homologe in *Drosophila* gefunden werden (Fortini et al. 2000; Rubin et al. 2000). Zahlreiche zell- und molekularbiologische Methoden haben gezeigt, dass die fundamentalen Prinzipien zellulärer Prozesse in beiden Spezies gültig sind. Dies erlaubt es, den größten Vorteil von *Drosophila* für die Erforschung humaner Krankheiten auszunutzen: die leistungsfähigen genetischen Methoden, die über einhundert Jahre biologischer Forschung hervorgebracht haben.

So konnten Studien in *Drosophila* bereits dazu beitragen, bestimmte Aspekte der Alzheimerschen Erkrankung besser zu verstehen. Zum Beispiel wurde die physiologische Rolle der APP-Proteinfamilie an Hand des einzigen *Drosophila* Homologs APPL untersucht (Luo et al. 1990). Der Verlust dieses Gens führt zu verändertem Verhalten der Fliegen, unter anderem zu Defiziten in der Phototaxis. Diese Phänotypen können durch die Expression von humanem APP ausgeglichen werden (Luo et al. 1992). Die Überexpression von APPL verändert die Struktur der neuromuskulären Synapse und behindert den axonalen Transport (Torroja et al. 1999; Torroja et al. 1999; Gunawardena et al. 2001). Interessanterweise scheint nicht nur die physiologische Funktion der APP Familie konserviert zu sein, sondern auch deren komplexe Prozessierung (Torroja et al. 1996).

Als weiterer Ansatz wurde humanes APP in verschiedenen Geweben während der Entwicklung exprimiert (Fossgreen et al. 1998). In dieser Studie wurde beobachtet, dass APP in der Fliege über den nicht-amyloidogenen Weg prozessiert wird. Da sowohl die Proteasen der ADAM-Familie, als auch die Bestandteile der γ -Sekretase im Genom hoch konserviert sind, zeigen diese Ergebnisse, dass *Drosophila* ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Prozessierung von APP darstellt. Interessanter aber war die weitere Beobachtung, dass die Expression in den Flügelepithelien einen „blistered wing“-Phänotyp erzeugte. Dies deutet auf die Interferenz von APP mit der Integrin-vermittelten Zelladhäsion hin und bietet damit einen Hinweis auf die physiologische Funktion dieses Proteins. In weiteren Experimenten wurde durch Expression von APP mit BACE oder durch die direkte Sekretion von A β auch die Toxizität dieses Peptids und die dadurch verursachte Neurodegeneration in der Fliege untersucht (Greeve et al. 2004; Iijima et al. 2004).

1.3.2 Techniken zur Manipulation der Genexpression

Das Modellsystem *Drosophila* bietet ausgefeilte Systeme zur Expression von transgenen Konstrukten (McGuire et al. 2004). Die am häufigsten verwendete Methode ist das duale Gal4-System (Brand et al. 1993): Die erste Komponente dieses Systems bilden Fliegenlinien, die den Transkriptionsfaktor Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle gewebsspezifischer Enhancer exprimieren (Abb. 5 A). Kombiniert man diese Linien mit transgenen Fliegen, die ein P-Element mit dem favorisierten Gen unter der Kontrolle der Gal4-Bindestellen („upstream activating sequences“, UAS) enthalten, wird dieses im entsprechenden Muster exprimiert. In der Vergangenheit wurden bereits eine Vielzahl von Gal4-exprimierenden Linien („Gal4-Treiber“) erzeugt, die die Expression in praktisch jedem Gewebe zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung erlauben.

Eine weitere Anwendung des Gal4-Systems sind genetische Screens, die auf der zufälligen Überexpression von Genen beruhen (Rorth 1996). Hierfür wird ein P-Element erzeugt, das sowohl UAS-Sequenzen, als auch einen Minimalpromoter enthält (Enhancer/Promoter (EP)-Element, Abb. 5 B). Dieses wird mobilisiert, so dass neue Insertionen an zufälligen Stellen des Genoms isoliert werden können. Werden diese nun zu einer Treiberlinie gekreuzt, bindet Gal4 an die UAS-Sequenzen und aktiviert die Expression des benachbarten Gens. So kann durch die ektopische Aktivierung des betroffenen Gens ein Phänotyp erzeugt werden. Durch die Sequenzierung der Insertionsstelle lässt sich dieses Gen leicht identifizieren.

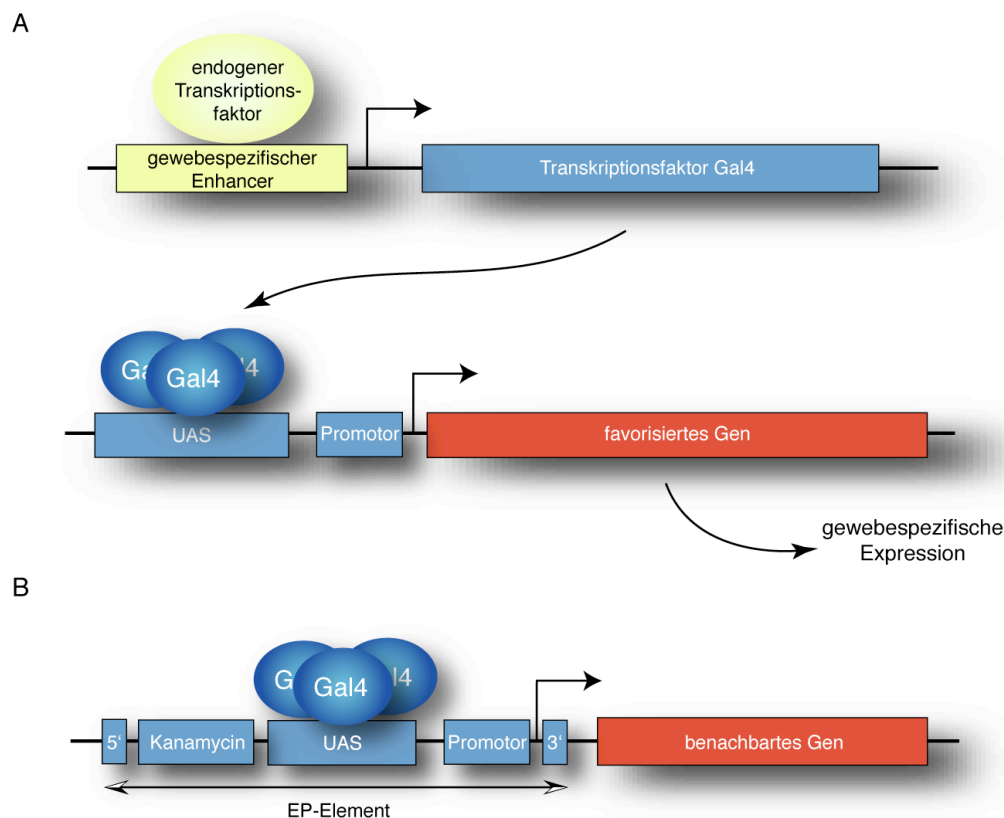


Abb. 5 Das duale Gal4-System. A) Zur gewebespezifischen Expression transgener Konstrukte wurde das duale Gal4-System entwickelt (Brand et al. 1993). Die erste Komponente dieses Systems sind Fliegenlinien, die zeit- und gewebespezifisch den Transkriptionsfaktor Gal4 exprimieren. Diese Linien können mit Fliegen kombiniert werden, die das favorisierte Gen als Transgen unter Kontrolle der Gal4-Bindestellen (UAS) und des Minimalpromoters von HSP70 enthalten. Dies erlaubt die Expression des zu analysierenden Proteins in den entsprechenden Geweben. B) Zur zufälligen Expression von Genen wurde das EP-Element entwickelt. Dieses P-Element enthält Bindestellen für Gal4 und einen Minimalpromoter. Nach der Mobilisierung durch eine Transposasequelle inseriert es zufällig im Genom. Wenn es in den 5' nicht-translatierten Bereich eines Gens springt, kann dieses durch Kreuzen der Insertionslinien mit einem Gal4-Treiber überexprimiert werden. Das Resistenzgen Kanamycin erlaubt die einfache Identifikation der Insertionsstelle durch Plasmid-Rescue.

Diese Techniken erlauben es, Zellen durch Expression bekannter oder unbekannter Gene zu manipulieren. Durch diese gezielten Eingriffe in den Metabolismus lassen sich Rückschlüsse auf die Regulation zellulärer Prozesse ziehen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Experimente *in-vivo* in einem intakten Organismus durchgeführt werden können. Um dabei proteolytische Vorgänge verfolgen zu können, bedarf es einer Methode, diese sichtbar zu machen. Eine Möglichkeit dafür bietet das im nächsten Absatz vorgestellte Reportersystem.

1.3.3 Ein *in-vivo* Reportersystem zur Visualisierung der „Regulierten Intramembranprozessierung“

Obwohl in den letzten Jahren durch die Identifizierung der verantwortlichen Proteasen große Fortschritte im Verständnis der RIP erreicht wurden, ist noch wenig über die genauen Mechanismen der Regulation bekannt. Um diese im Kontext eines intakten Gewebes untersuchen zu können, entwickelten wir in unserem Labor ein GFP-basiertes *in-vivo*

Reportersystem (Loewer 2001): Unter Kontrolle des dualen Gal4-Systems wird eine C-terminale Fusion des zu analysierenden Proteins mit der DNA-bindenden Domäne des bakteriellen Proteins LexA und der transaktivierenden Domäne des viralen Proteins VP16 exprimiert (Abb. 6). Wird dieses Fusionskonstrukt in einer Zelle prozessiert, verliert die intrazelluläre Domäne ihre Membranverankerung und ist frei beweglich. Durch eine eingefügte Kernlokalisationssequenz wird sie in den Nukleus transportiert, wo sie an entsprechende LexA-Operatorsequenzen binden kann, die die Expression eines Reportergens kontrollieren (Abb. 6). Die daraus resultierenden Fluoreszenzsignale visualisieren die Prozessierung des untersuchten Proteins.

Dieses System bietet verschiedene Vorteile gegenüber der Verwendung anderer Methoden zur Untersuchung der Prozessierung: Zunächst verleiht das duale Gal4-System einen hohen Grad an Flexibilität. Durch Kombination mit verschiedenen Treiberlinien lässt sich die Prozes-

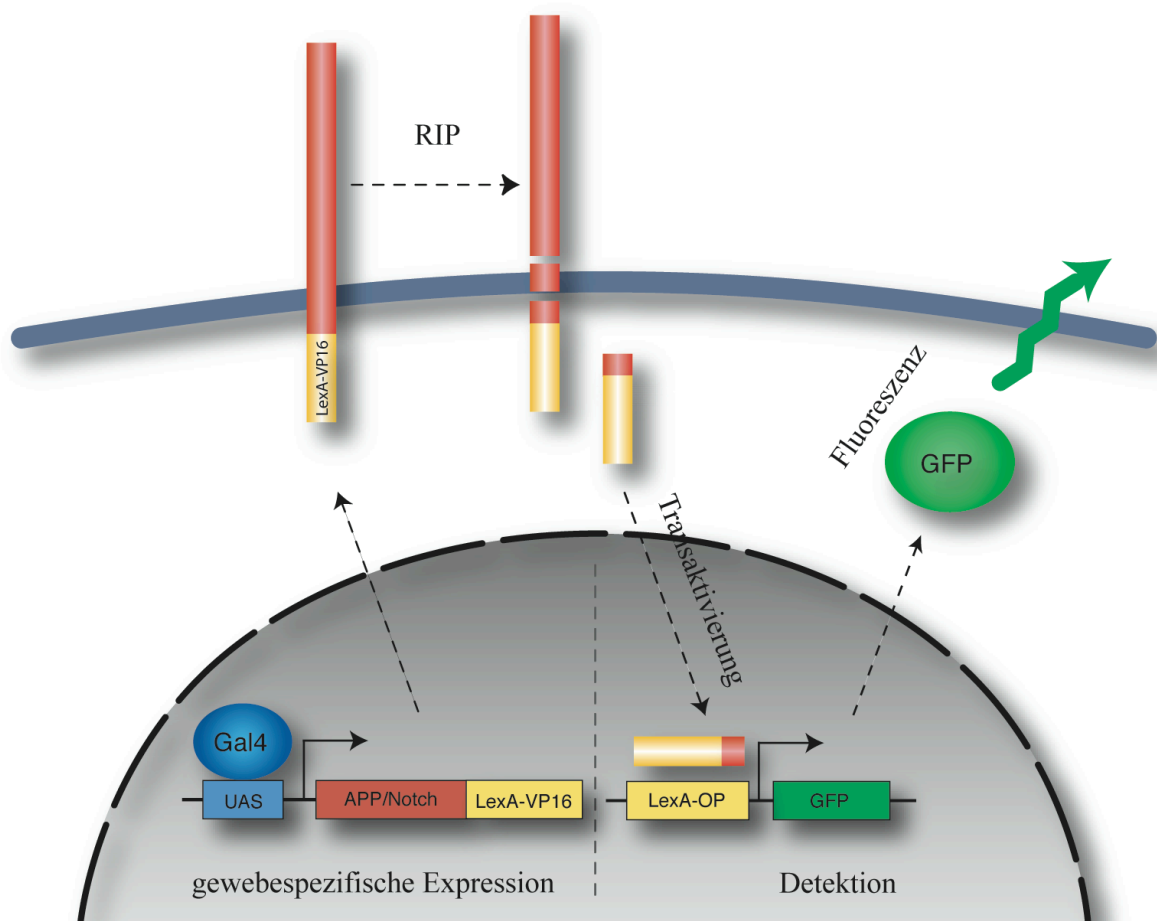


Abb. 6 Modell des *in-vivo* Reportersystems zur Visualisierung der RIP. Das Reportersystem beruht auf der Fusion des zu untersuchenden Proteins mit der DNA-bindenden Domäne von LexA und der transaktivierenden Domäne von VP16. Nach gewebespezifischer Expression erfolgt die Prozessierung, wodurch die intrazelluläre Domäne freigesetzt wird und in den Kern wandert. Dort kann sie an LexA-Operatoren binden, die die Expression eines GFP-Reporters kontrollieren.

sierung in verschiedenen Geweben und damit in verschiedenen Zelltypen untersuchen. Diese Zellen sind abgesehen von der Expression des Fusionskonstruktes unverändert und repräsentieren somit im Gegensatz zu transformierten Zelllinien die wildtypische Situation. Auf diese Art können proliferierende, differenzierende und auch postmitotische adulte Gewebe *in-situ* analysiert werden. Mit verschiedenen Fusionskonstrukten lässt sich die Prozessierung unterschiedlicher Proteine vergleichen und der Einfluss verschiedener Proteindomänen untersuchen. Da während der Transkription des Reportergens eine Verstärkung des Signals stattfindet, sollte eine geringe Menge der freigesetzten Domäne ausreichen, um die proteolytische Spaltung zu visualisieren. Durch die vorhandenen Mutationen und die Möglichkeit, beliebige Gene durch RNAi auszuschalten, lässt sich die Spezifität dieser Signale für die Prozessierung durch die untersuchten Proteasen verifizieren.

1.4 Ziele der Arbeit

Die Prozessierung von APP und die daraus folgende Produktion des A β -Peptids ist ein Schlüsselschritt in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung. Es ist daher von großer Bedeutung für das Verständnis der Krankheit, nicht nur die dafür verantwortlichen Proteasen zu identifizieren, sondern auch die Mechanismen zu entschlüsseln, durch die ihre Aktivität reguliert wird. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, diese zellulären Vorgänge mit Hilfe des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* besser zu verstehen. Dieses Ziel wird mit zwei unterschiedlichen Ansätzen verfolgt:

Im ersten Teil werden genetische Methoden verwendet, um neue Regulatoren der APP Prozessierung zu identifizieren. Mit Hilfe von EP-Elementen wird der Einfluss dieser Gene auf die Prozessierung von APP analysiert. Auf Grund der ähnlichen Prozessierung sollen hierfür EP-Elemente verwendet werden, die den Notch-Signalweg beeinflussen. Gelingt die Identifizierung solcher Regulatoren, können diese näher charakterisiert und der Mechanismus ihrer Wirkung analysiert werden.

Im zweiten Teil wird das *in-vivo* Reportersystem verwendet, um die Prozessierung von APP und Notch im Kontext eines intakten Gewebes zu analysieren. Dabei soll untersucht werden, ob es Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zwischen diesen beiden Substraten der RIP gibt. Von besonderem Interesse ist dabei, ob die Prozessierung durch die γ -Sekretase reguliert wird und ob die Effizienz ihrer Prozessierung zelltyp-spezifisch ist. Die Ergebnisse, die mit diesen beiden Proteinen erlangt werden, sollen dann durch Untersuchung anderer Substrate verifiziert werden. Dies erlaubt es, die Voraussetzungen für diese ungewöhnliche proteolytische Spaltung zu definieren.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung neuer Regulatoren der APP Prozessierung in *Drosophila*

2.1.1 Genetischer Screen zur Identifizierung von Genen mit Einfluss auf die APP Prozessierung

2.1.1.1 APP Prozessierung im adulten Auge von *Drosophila*

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass humanes APP in embryonaler *Drosophila* S2 Zellkultur von einer α - und von der γ -Sekretase prozessiert wird (Fossgreen et al. 1998). BACE-Aktivität, die Voraussetzung für die Entstehungen des pathogenen A β -Peptids war dagegen in diesen Zellen nicht vorhanden. Um *Drosophila* als *in-vivo* Modell für die APP Prozessierung zu etablieren, wurde zunächst untersucht, ob APP auch im Kontext eines intakten Gewebes proteolytisch gespalten wird.

Die Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus adulten Köpfen zeigte, dass in diesem Gewebe APP durch eine endogene α -Sekretase geschnitten wird (Abb. 7). In Säugetierzellkultur konnte gezeigt werden, dass α -Sekretase Aktivität von verschiedenen Mitgliedern der ADAM-Familie ausgeübt werden kann. In *Drosophila* ist Kuzbanian, das Homolog zu ADAM10, der beste Kandidat für die beobachtete Aktivität (Rooke et al. 1996). Wurde diese Protease gemeinsam mit APP überexprimiert, kam es zu einer starken Anreicherung des α -geschnittenen CTF's (Abb. 7). Kuzbanian kann also *in-vivo* humanes APP schneiden.

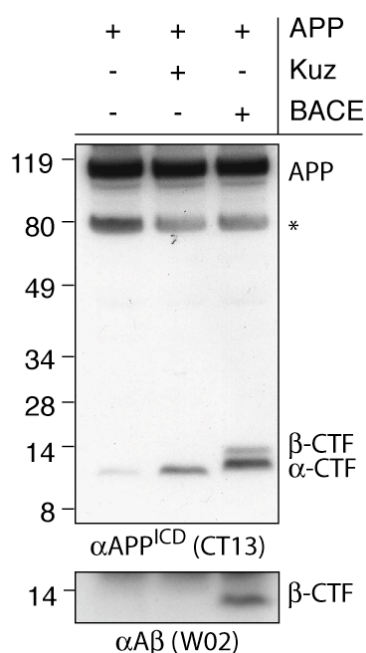


Abb. 7 Humanes APP wird im adulten Auge von *Drosophila melanogaster* prozessiert. APP wurde unter Kontrolle von GMR („Glass Multiple Repeats“) -Gal4 im adulten Auge exprimiert. Proteinextrakte der Köpfe wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western Blot mit den Antikörpern CT13 gegen A^{ICD}, bzw. W02 gegen AS 1-17 der A β -Domäne inkubiert. Eine endogene Protease spaltet APP C-terminal der β -Schnittstelle. Die gemeinsame Überexpression von APP mit Kuzbanian zeigt, dass diese Protease α -Sekretase Aktivität besitzt. Durch Expression von transgenem BACE kann auch der amyloidogene Abbauweg nachgebildet werden. Genotyp der Kreuzungen: APP - GMR-Gal4/+;UAS-APP/+ APP+Kuz - GMR-Gal4/+;UAS-APP/UAS-Kuzbanian APP+BACE - GMR-Gal4/+;UAS-APP/UAS-BACE

Im Gegensatz zur α -Sekretase fehlt im Genom von *Drosophila* ein klares Homolog zu BACE, so dass auch in adulten Köpfen kein β -geschnittenes CTF detektierbar war. Um trotzdem den amyloidogenen Weg der APP Prozessierung nachbilden zu können, wurden in unserem Labor transgene Fliegen erzeugt, die humanes BACE exprimieren. Koexpression mit APP führte zu Bildung eines Fragments, dessen Größe mit dem Produkt der β -Sekretase übereinstimmt. (Abb. 7). Durch einen Antikörper gegen AS 1-17 des A β -Peptids konnte die Identität der Schnittstelle verifiziert werden (Abb. 7, W02). Die γ -Sekretase vermittelte Freisetzung der intrazellulären Domäne lässt sich auf Grund ihrer geringen Stabilität im Western Blot nicht detektieren. Die Aktivität der γ -Sekretase wurde daher im zweiten Teil dieser Arbeit durch ein *in-vivo* Reportersystem untersucht.

2.1.1.2 Prinzip und Durchführung eines Screens zur Identifizierung von Suppressoren des Kuzbanian^{DN}-induzierten Phänotypes

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass der nicht-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung in *Drosophila* konserviert ist. Somit stehen nun die zahlreichen genetischen Methoden dieses Modellorganismus zur Verfügung, um neue Regulationsmechanismen und die daran beteiligten Proteine zu identifizieren. Eine Möglichkeit zur Aufklärung zellulärer Prozesse sind Enhancer-Suppressor-Screens. Sie basieren auf einem induzierten Phänotyp, der durch weitere Mutationen in interagierenden Komponenten verstärkt oder supprimiert wird. Neben der Identifizierung der beteiligten Proteine kann dabei auch eine hierarchische Einordnung durch Epistasie-Experimente erfolgen (Rogge et al. 1991).

Um einen solchen Screen zur Identifizierung neuer Regulatoren der APP-Prozessierung durchzuführen, wurde durch Expression einer dominant-negativen Form der Protease Kuzbanian ein Augenphänotyp erzeugt (Pan et al. 1997). Normalerweise vermittelt Kuzbanian die Liganden-abhängige Prozessierung von Notch an der S2-Schnittstelle (Abb. 8 A, Lieber et al. 2002). Die Überexpression einer inaktiven Form von Kuzbanian, in welcher die Proteasedomäne fehlt, konkurriert jedoch mit der endogenen Form um die Bindung des Substrates und verhindert so die Freisetzung der intrazellulären Domäne des Signalrezeptors. Dadurch wird ein starker Phänotyp in sich entwickelnden Geweben erzeugt, so auch im Facettenauge der Fliege (Abb. 8 B). Die Expression im Auge hat den Vorteil, dass der Phänotyp gut sichtbar ist und kaum mit der Lebensfähigkeit der Tiere interferiert. Werden nun Gene überexprimiert, die an der Steuerung dieser Vorgänge beteiligt sind, kann der Phänotyp

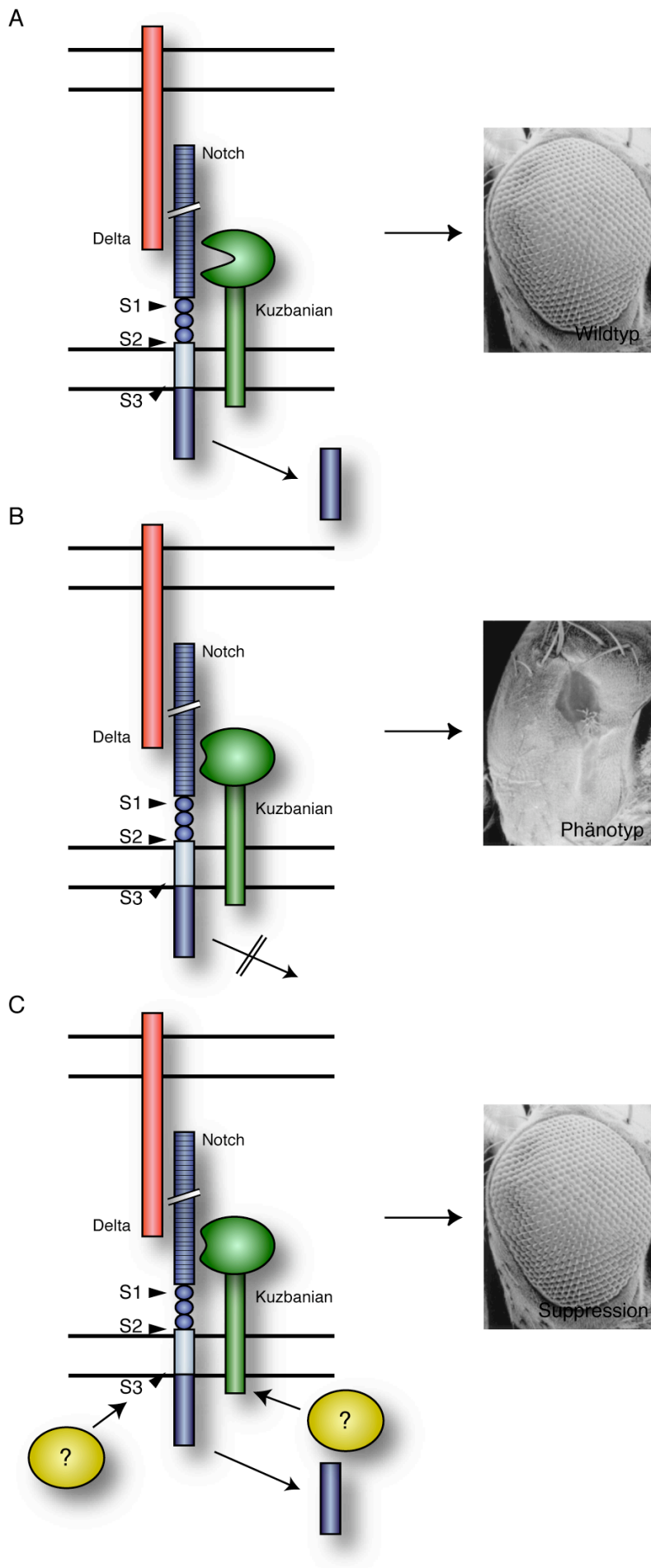


Abb. 8 Schema eines Screens nach Modifikatoren des Kuzbanian^{DN}-Phänotyps. A) Nach der Bindung des Liganden Delta katalysiert Kuzbanian die Spaltung von Notch an der S2-Schnittstelle. Das entstehende Fragment von Notch ist ein Substrat für den γ -Sekretase-Komplex, der die Proteolyse an der S3-Schnittstelle innerhalb der Membran und damit die Freisetzung der N^{ICD} vermittelt. N^{ICD} kann nun in den Kern gelangen und die Transkription von Zielgenen aktivieren, die für die normale Entwicklung des Komplexauges notwendig sind. B) Die Expression einer dominant-negativen Form von Kuzbanian, deren Proteasedomäne deletiert wurde, verhindert die Prozessierung von Notch durch Konkurrenz mit der aktiven Form des Enzyms. Dadurch wird die Freisetzung von N^{ICD} verhindert und die Augenentwicklung massiv gestört. C) Die Entwicklung des Auges kann durch die gleichzeitige Expression von Suppressoren von Kuzbanian^{DN} wieder gerettet werden. Mögliche Ansatzpunkte von Suppressoren wären zum Beispiel extrazelluläre Proteasen, die die Funktion von Kuzbanian übernehmen, oder intrazelluläre Proteasen, die die direkte Freisetzung der N^{ICD} ermöglichen.

supprimiert werden (Abb. 8 C). Eine Möglichkeit der Suppression wäre zum Beispiel die Aktivierung einer anderen Protease, die den Verlust von Kuzbanian ausgleichen kann. Ebenfalls denkbar wäre ein direkter Einfluss auf die Freisetzung der intrazellulären Domäne zum Beispiel durch Stimulierung des γ -Sekretase Komplexes oder einer intrazellulären Protease. Da sich Notch- und APP-Prozessierung sehr ähnlich sind, liegt es nahe, dass die identifizierten Gene auch einen Einfluss auf APP haben könnten.

Wie kann man nun aber möglichst viele Gene überexprimieren, um Regulatoren der Prozessierung zu identifizieren? In *Drosophila* besteht die Möglichkeit, über EP-Elemente die Expression benachbarter Transkriptionseinheiten zu induzieren (Rorth 1996). Diese Möglichkeit wurde bereits von zahlreichen Gruppen genutzt, um neue Komponenten bekannter Signalwege oder Regulatoren von Entwicklungsprozesse zu finden. In einer dieser Arbeiten wurde eine Reihe von EP-Elementen identifiziert, die die Entwicklung der externen sensorischen Organe von *Drosophila* beeinflussen, einem Prozess, der abhängig von Notch ist (Abdelilah-Seyfried et al. 2000). Des Weiteren wurde in unserem Labor ein EP-Element-vermittelter Screen nach Suppressoren des APP-induzierten Flügelphänotyps durchgeführt (Bilic 2005). Da diese EP-Elemente einer Vorauswahl von Komponenten des Notch Signalweges bzw. Interaktoren von APP entsprechen, wurden sie an Stelle von neu erzeugten Insertionen für den beschriebenen Screen verwendet. Insgesamt wurden 363 Linien zu Fliegen gekreuzt, die Kuzbanian^{DN} unter Kontrolle von GMR-Gal4 in allen Zellen des Auges exprimieren. Die Kreuzungen wurden sowohl bei 25°C als auch bei 28°C durchgeführt, da die Stärke des induzierten Phänotyps bei steigender Temperatur zunimmt. Während bei 25°C nur die Augenstruktur betroffen ist (Abb. 8 B), führt die Expression von Kuzbanian^{DN} bei 28°C zu Letalität. Der Großteil der EP-Elemente führte zur einer Verstärkung des Augenphänotyps bis hin zur Letalität (Tab. 1). Einige Linien zeigten keine Veränderung oder eine schwache Verbesserung der Augenstruktur. Herausragend waren aber zwei Linien, die den Phänotyp deutlich supprimierten: EP(X)1408 und EP(2)2299 (Abb. 9). EP(X)1408 führte dabei zu einer

Tab. 1 Zusammenfassung des Screens nach Suppressoren des Kuzbanian^{DN}-Phänotyps.

Interaktion	Anzahl der Linien
Kein Effekt	54
Verstärkung	153
Letalität	132
Schwache Suppression	22
Starke Suppression	2

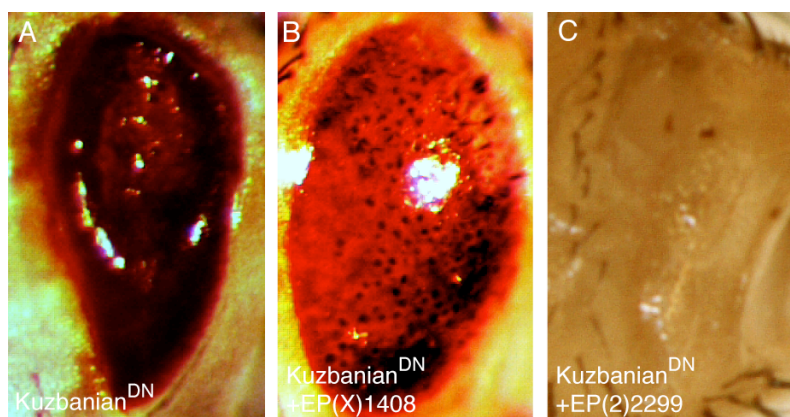


Abb. 9 EP(X)1408 und EP(2)2299 supprimieren den Kuzbanian^{DN}-Phänotyp. A) Die Expression von Kuzbanian^{DN} führt zu einem sehr kleinen Auge ohne Ommatidienstruktur. B) Die gleichzeitige Expression von EP(X)1408 mildert diesen Augenphänotyp ab, so dass dieses größer wird und wieder einige Strukturen erkennbar sind. C) EP(2)2299 führt zwar zu einer Verschlechterung der Augenmorphologie, ermöglicht aber das Überleben der Fliegen bei höheren Temperaturen. Genotyp der Kreuzungen: A) +;+;UAS-Kuz^{DN} GMR-Gal4/+ B) EP(X)1408;+;UAS-Kuz^{DN} GMR-Gal4/+ C) +;EP(2)2299/+;UAS-Kuz^{DN} GMR-Gal4/+

Normalisierung der Augenmorphologie und zu einer Erhöhung der Überlebensrate, während EP(2)2299 zwar eine weitere Verstärkung des Augenphänotyps induzierte, aber gleichzeitig die Lebensfähigkeit bei 28°C wiederherstellte (Tab. 2).

Durch den beschriebenen Screen nach Suppressoren des Kuzbanian^{DN}-Phänotyps wurden somit zwei Gene identifiziert, die die Funktion des Notch-Signalwegs teilweise wiederherstellen konnten. Nun stellt sich die Frage, ob diese beiden Gene auch wie vermutet einen Einfluss auf die Prozessierung von APP haben.

Tab. 2 EP(X)1408 und EP(2)2299 supprimieren den Kuzbanian^{DN}-Phänotyp. Überlebensrate der Kreuzungen mit und ohne den Suppressoren EP(X)1408 und EP(2)2299. Die Überlebensrate wurde aus dem Verhältniss von Kuz^{DN}-exprimierenden Nachkommen zu denen mit dem Balancer TM,Sb berechnet. Die Kreuzungen wurden bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt und jeweils >200 Nachkommen ausgezählt. Genotyp der Kreuzungen: UAS-Kuz^{DN} GMR-Gal4/TM,Sb x EP(X)1408/Y (nur Weibchen) UAS-Kuz^{DN} GMR-Gal4/TM,Sb x EP(2)2299 (alle Nachkommen).

	Kuzbanian^{DN}	Kuzbanian^{DN}+EP(X)1408
Überlebensrate 25°C	35%	75%
Überlebensrate 28°C	0%	50%
	Kuzbanian^{DN}	Kuzbanian^{DN}+EP(2)2299
Überlebensrate 25°C	34%	34%
Überlebensrate 28°C	0%	34%

2.1.1.3 Neue Regulatoren der APP-Prozessierung

Im Labor von Anette Preiss (Hohenheim) wurde ein ähnlicher Screen nach Komponenten des Notch-Signalwegs durchgeführt: Die 2293 EP-Linien der Rørth-Kollektion (Rorth et al. 1998) wurden zu Fliegen gekreuzt, die den Repressor *Hairless* überexprimieren. Dies verhindert die

Aktivierung von Notch Zielgenen, wodurch einen Augenphänotyp entsteht. In diesem Screen wurden 43 weitere EP-Elemente identifiziert, deren benachbarten Gene an der Signalverarbeitung durch den Notchrezeptor beteiligt sind. Diese EP-Linien wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt, so dass wir ihren Einfluss auf die APP Prozessierung zusammen mit den zwei oben erwähnten Linien testen konnten.

Dazu wurden diese Linien zu virginellen Weibchen gekreuzt, die humanes APP unter der Kontrolle von GMR-Gal4 exprimieren. In den Nachkommen wurde die APP Prozessierung durch Western Blot Analyse mit dem Wildtyp verglichen. Sowohl die beiden Linien EP(X)1408 und EP(2)2299, als auch neun weitere Linien aus dem Screen von Anette Preiss zeigten dabei ein verändertes Muster der proteolytischen Fragmente (Abb. 10).

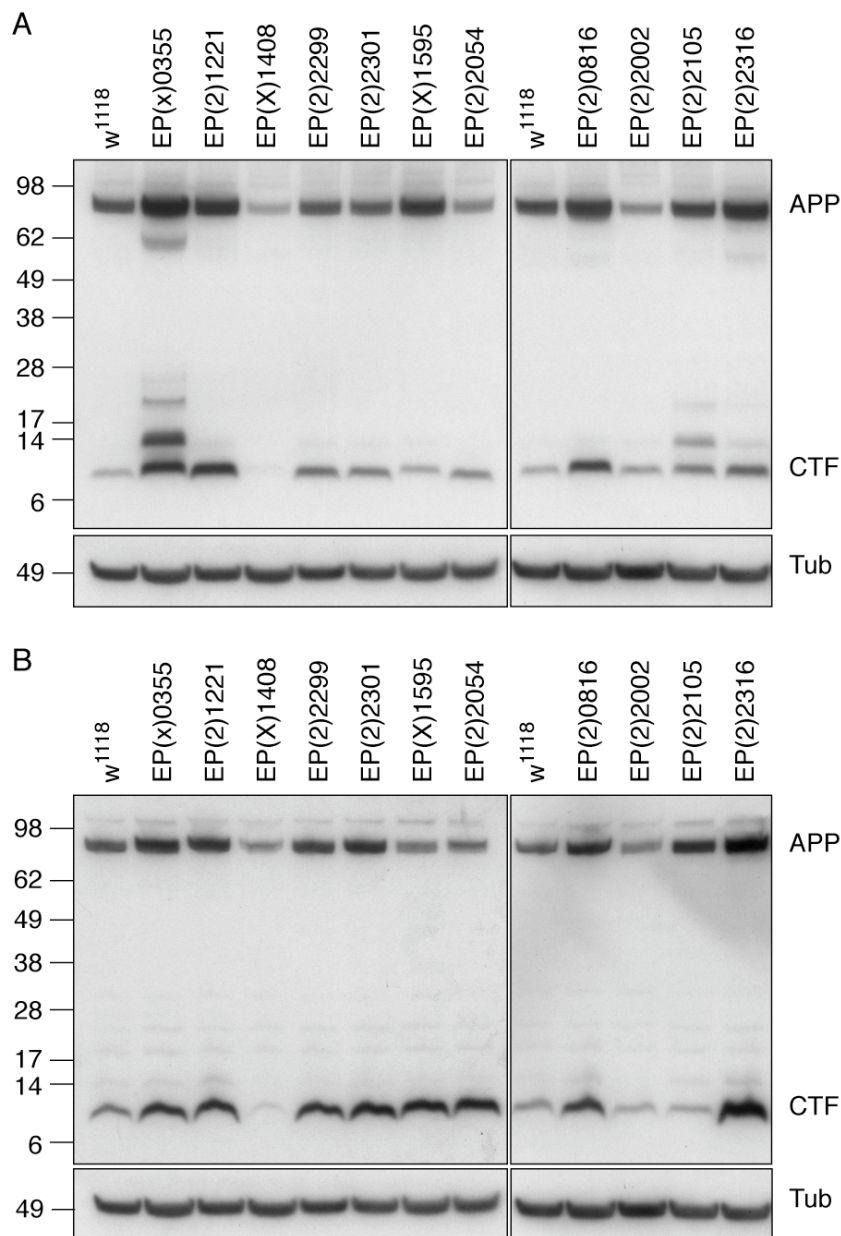


Abb. 10 Neue Regulatoren der APP Prozessierung. Es konnten elf EP-Elemente identifiziert werden, deren benachbarte Gene einen Einfluss auf die APP Prozessierung ausüben. Die EP-Elemente wurden zu Fliegen gekreuzt, die APP unter der Kontrolle von GMR-Gal4 exprimieren. Proteinextrakte aus Köpfen wurden durch Western Blot mit dem Anti-körper CT13 gegen die A^{ICD} analysiert. Als Ladekontrolle wurde derselbe Blot mit Tubulin-Antikörpern inkubiert. Die Fliegen waren entweder unter 12h (A) oder 1 Woche alt (B). Genotyp der Kreuzung: GMR-Gal4;UAS-APP x EP-Element. Bei X-chromosomalen Insertionen wurden nur Weibchen verwendet.

Der Effekt auf die APP Prozessierung ließ sich in verschiedene Kategorien einteilen. Die meisten EP-Elemente führten zur Akkumulation des CTF bei unveränderter oder ebenfalls erhöhter Menge des Proteins voller Länge (Kategorie A, Abb. 11). EP(2)2054 wurde in die Kategorie A' eingeordnet, da dieses EP-Element neben der Akkumulation des CTF gleichzeitig eine starke Reduktion der Menge des Volllängenproteins induzierte (Abb. 11).

Die Akkumulation des CTF kann verschiedene Ursachen haben. Eine gleichzeitig reduzierte Menge des Vorläuferproteins deutet daraufhin, dass die extrazellulären Proteasen direkt stimuliert werden. Ist die Menge des Proteins voller Länge nicht verändert, kann auch die Stabilität des CTF erhöht sein. Dies ließe sich zum Beispiel durch geringeren γ -Sekretase vermittelten Abbau erklären. Steigt die Menge des Proteins voller Länge zusammen mit dem CTF an, stellt das einen Hinweis auf eine Veränderung des APP Metabolismus insgesamt dar.

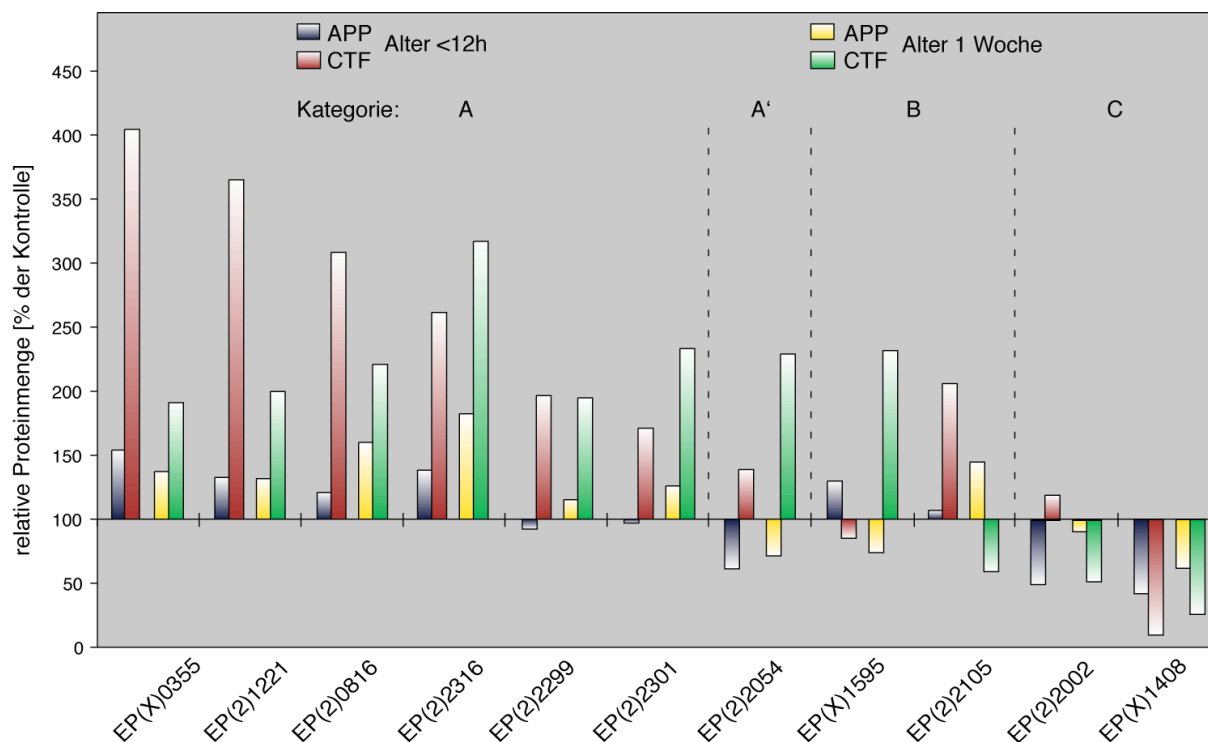


Abb. 11 Die identifizierten EP-Elemente haben unterschiedlichen Einfluss auf die APP Prozessierung.

Quantifizierung der Western Blot Analyse (Abb. 10) durch Densitometrie. In den Diagrammen ist die relative Menge des Proteins voller Länge (blau/gelb) und des CTF (rot/grün) im Vergleich zur Kontrolle w^{1118} dargestellt. Die Normalisierung der Proteinmengen erfolgte an Hand des Tubulin Signal. Für EP(X)0355 und EP(2)2105 wurde nur das CTF berücksichtigt, das auch im Wildtyp erzeugt wird. Die Menge aller CTF zusammen beträgt 877% (EP(X)0355) bzw. 376% (EP(2)2105) der Kontrollmenge. Der Effekt auf die APP-Prozessierung wurde in vier Kategorien eingeteilt. Kategorie A: Akkumulation des CTF bei unveränderter oder erhöhter Menge des Proteins voller Länge. Kategorie A': Akkumulation des CTF bei reduzierter Menge des Proteins voller Länge. Kategorie B: Altersabhängige Veränderung der APP-Prozessierung. Kategorie C: Reduzierte Menge des Proteins voller Länge und/oder des CTF.

Interessant ist, dass der Einfluss einiger EP-Elemente auf APP abhängig vom Alter der Fliegen ist (Abb. 10 B, Abb. 11, Kategorie B). So führt zum Beispiel EP(X)1595 in frisch geschlüpften Fliegen zu einer leichten Anreicherung des Proteins voller Länge, während die Menge des CTF etwas abnahm. Im Gegensatz dazu wurde in älteren Fliegen eine deutliche Akkumulation des CTF und eine Abnahme des Vorläuferproteins erkennbar. Der Effekt von EP(2)2105 verhält sich genau entgegengesetzt: Während es in jungen Fliegen zu einer verstärkten Prozessierung kommt, wobei sogar ein weiteres CTF höheren Molekulargewichts entsteht (Abb. 10 A), war in älteren Tieren deutlich weniger CTF vorhanden als in der Kontrolle (Abb. 11). Dies wurde von der Akkumulation des Proteins voller Länge begleitet.

Die EP-Elemente der Kategorie C zeigten dagegen einen anderen Effekt (Abb. 11): Sie führten zu einer reduzierten Menge sowohl des CTF als auch des Proteins voller Länge. So induzierte zum Beispiel EP(X)1408 den kompletten Verlust von APP, ohne dass sich proteolytische Fragmente anreicherten. Dies kann durch einen alternativen Abbauweg zum Beispiel über Lysosomen oder das Proteasom erklärt werden.

In Tabelle 3 ist eine Übersicht über alle EP-Elemente, die regulierten Gene und deren putative Funktion gezeigt. Zwei der neu identifizierten Regulatoren der APP Prozessierung, EP(X)1408 und EP(2)2299 werden in den nächsten Abschnitten näher charakterisiert.

Tab. 3 Übersicht über die identifizierten Regulatoren der APP Prozessierung. Die identifizierten EP-Elemente wurden in vier Kategorien entsprechend der Veränderung der APP – Prozessierung eingeordnet. Kategorie A: Akkumulation des CTF bei unveränderter oder erhöhter Menge des Proteins voller Länge. Kategorie A': Akkumulation des CTF bei reduzierter Menge des Proteins voller Länge. Kategorie B: Altersabhängige Veränderung der APP-Prozessierung. Kategorie C: Reduzierte Menge des Proteins voller Länge und/oder des CTF. Für jedes EP-Element sind die Gene in der Umgebung der Insertionsstelle angegeben. Für einige EP-Elemente lässt sich jedoch nicht eindeutig feststellen, welches Gen reguliert wird. Die EP-Elemente EP(2)1221 und EP(2)0816 bzw. EP(2)2299 und EP(2301) sind in den selben Lokus inseriert. Die veröffentlichten oder vorhergesagten Funktionen der jeweiligen Gene wurden der Datenbank FlyBase (www.flybase.org) entnommen. Sind weitere P-Element Insertionen in dem genomischen Lokus bekannt, sind diese ebenfalls angegeben.

	EP-Element	Gen	Funktion	andere P-Elemente
Kategorie A	EP(X)0355	<i>Dsp1</i>	HMG-Protein, DNA-Bindung, Gensilencing	
		<i>small wing</i>	PLC γ	EP(X)1651
	EP(2)1221 EP(2)0816	mir275	microRNA	EP(2)787 EP(2)2369 (andere Orientierung)
		mir305	microRNA	l(2)k08201 uvm.
		CG5261	Acetyl-CoA Biosynthese, Glykolyse	
	EP(2)2316	keine Genannotation näher als 40 kBp		EP(2)1229 EP(2)3558 (andere Orientierung)
		CG30465 (andere Orientierung)	?	l(2)SH0133 uvm.
EP(2)2299 EP(2)2301	siehe 2.1.3	siehe 2.1.3	l(2)SH0148	
A'	EP(2)2054	CG6701	RNA-Helicase	p(SUPorP)KG00917
B	EP(X)1595	<i>bendless?</i> (andere Orientierung)	Ubiquitin-Ligase, Wegfindung des Axons	EP(X)1651 BG02487
	EP(2)2105	CG33558	Aktin-Bindung, Organisation des Aktin-Zytoskelett	
C	EP(2)2002	Mef2	Transkriptionsfaktor	
	EP(X)1408	siehe 2.1.2	siehe 2.1.2	l(1)G0054

2.1.2 Die Kinase Tlk kontrolliert den Metabolismus von APP

2.1.2.1 EP(X)1408 induziert eine starke Reduktion der APP Proteinmenge

EP(X)1408 führt zum Verlust von APP voller Länge ohne dass sich Abbauprodukte anreichern (Abb. 10). Dieser Effekt wurde verifiziert, quantifiziert und die Spezifität für APP nachgewiesen (Abb. 12). Dazu wurden EP(X)1408 erneut mit Fliegen gekreuzt, die humanes APP unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimieren. Von dieser Kreuzung wurden Proteinextrakte hergestellt und die Proteinmenge von APP durch Western Blot mit der entsprechenden Kontrolle verglichen (Abb. 12 A). Die Quantifizierung dieser Daten durch Densitometrie ergab, dass die detektierbare Menge an APP auf ungefähr 20% der Kontrollmenge abnimmt (Abb. 12 C). Aber ist dieser Effekt spezifisch für APP oder interferiert EP(X)1408 generell mit der Expression durch das duale Gal4-System? Um dies zu testen, wurde EP(X)1408 mit einer Linie gekreuzt, die das bakterielle LacZ-Protein unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. Der entsprechende Western Blot (Abb. 12 B) und die

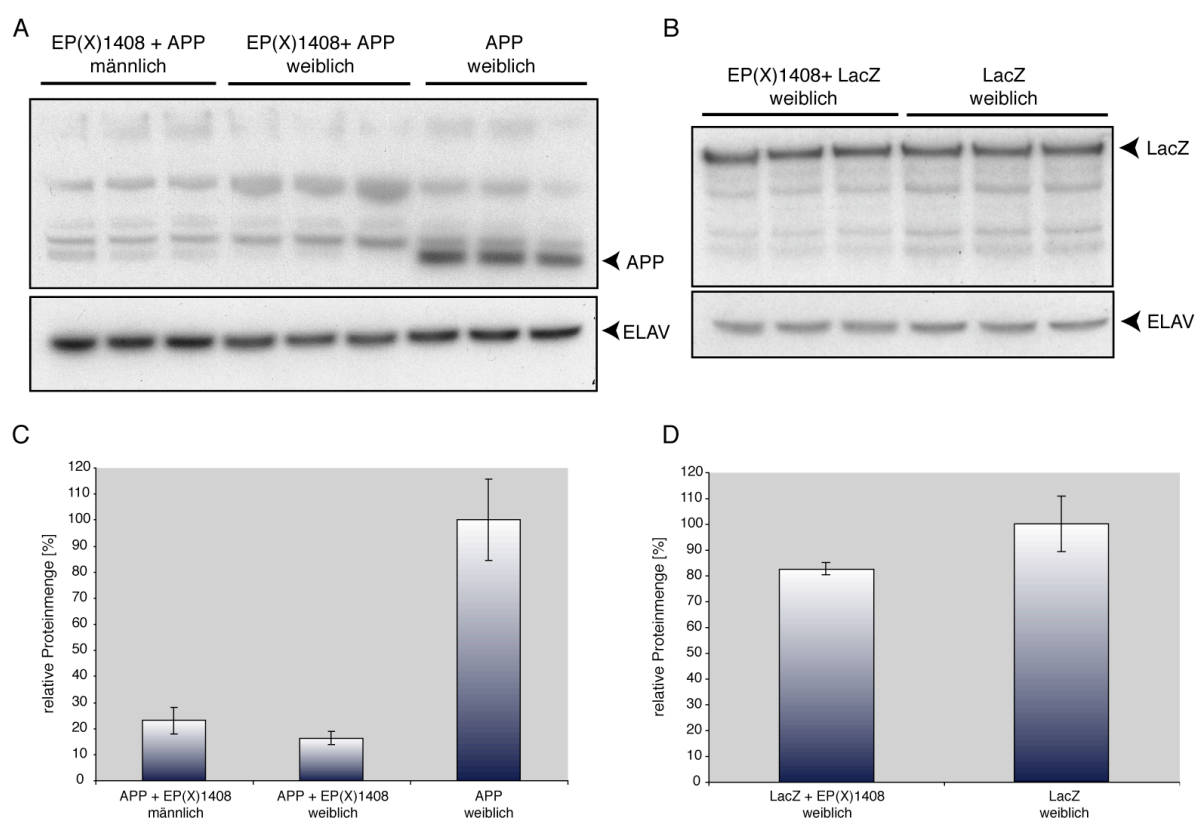


Abb. 12 EP(X)1408 induziert spezifisch die Reduktion der APP Menge. A) APP wurde alleine oder zusammen mit EP(X)1408 unter der Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. Durch Western Blot Analyse mit dem Antikörper 22C11 gegen die Ektodomäne von APP wurde die Proteinmenge bestimmt. Als Ladekontrolle wurde derselbe Blot mit Antikörpern gegen das neuronale Protein ELAV inkubiert. Männchen und Weibchen wurden getrennt behandelt B) Um die Spezifität des beobachteten Effekts auf APP zu testen, wurde LacZ alleine oder zusammen mit EP(X)1408 unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. Der entsprechende Western Blot wurde ebenfalls mit 22C11 analysiert. C) und D) zeigt die Quantifizierung der jeweiligen Western Blots durch Densitometrie.

Quantifizierung dieser Daten (Abb. 12 D) zeigte, dass es zwar auch für LacZ zu einer geringen Absenkung kam, jedoch waren im Gegensatz zu APP noch immer 80% der Kontrollmenge vorhanden. Eine mögliche Erklärung dieser leichten Absenkung ist, dass Gal4 sowohl an die UAS Bindestellen vor dem *LacZ*-Gen, als auch an EP(X)1408 binden kann und so die Expression von LacZ im Vergleich zur Kontrolle abnimmt. Da LacZ im Gegensatz zu APP ein cytosolisches Protein ist, wurde als weitere Kontrolle der Effekt von EP(X)1408 auf ein unspezifisches Membranprotein, eine inaktive Form des Notch-Rezeptors, untersucht. Doch auch hier konnte keine mit APP vergleichbare Absenkung des Proteinlevels festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Experimenten geht hervor, dass der von EP(X)1408 induzierte Abbau von APP spezifisch für dieses Protein ist. Da die Degradation ohne erkennbare Abbauprodukte vollzogen wird, wurde das EP-Element *Hokuspokus* (*Hops^{EP}*) benannt. Es stellt sich nun die Frage, welches Gen von *Hops^{EP}* überexprimiert wird und welche molekularen Mechanismen für den Effekt auf APP verantwortlich sind.

2.1.2.2 EP(X)1408 reguliert das Gen *Tousled-like Kinase/Hokuspokus*

EP-Elemente inserieren häufig in die 5'-untranslatierten Bereiche von Genen und ermöglichen so deren Überexpression. Da sich durch Sequenzierung der benachbarten Genomsequenz die Insertionsstelle dieser Transposons leicht bestimmen lässt, kann das betroffene Gen normalerweise eindeutig identifiziert werden. *Hops^{EP}* ist jedoch in einem Bereich des X-Chromosoms inseriert, in dessen unmittelbarer Umgebung kein Gen vorhergesagt ist. Da aber in der Nähe weiterer EP-Elemente bekannt sind, die ebenfalls den Phänotyp von *Kuzbanian^{DN}* supprimieren, muss die Wirkung durch Überexpression eines der weiter entfernt liegenden Gene hervorgerufen werden.

Der beste Kandidat war eine Serin/Threonin-Kinase aus der Familie der „Tousled-like Kinases“ (Tlk). Abbildung 13 A und B zeigen schematisch die Struktur dieses Gens bzw. Proteins. Das Expressionsmuster während der Entwicklung wurde durch Northern Blot Analyse verschiedener Stadien untersucht (Abb. 13 C). Die Kinase wird zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert, auffällig ist dabei eine sehr starke maternale Komponente. Es lassen sich 4 verschiedene Spleißformen unterscheiden: In den meisten Entwicklungsstadien werden zwei RNA-Spezies von 6,3 und 6,7 kBp Länge exprimiert. In einigen Stadien, vor allem in adulten Köpfen, ist eine weitere Form von 6,9 kBp Länge vorhanden. In 0-4h alten Embryonen ist zusätzlich noch eine 11,4 kBp lange RNA detektierbar, die wahrscheinlich einem ungespleißten Vorläufer entspricht.

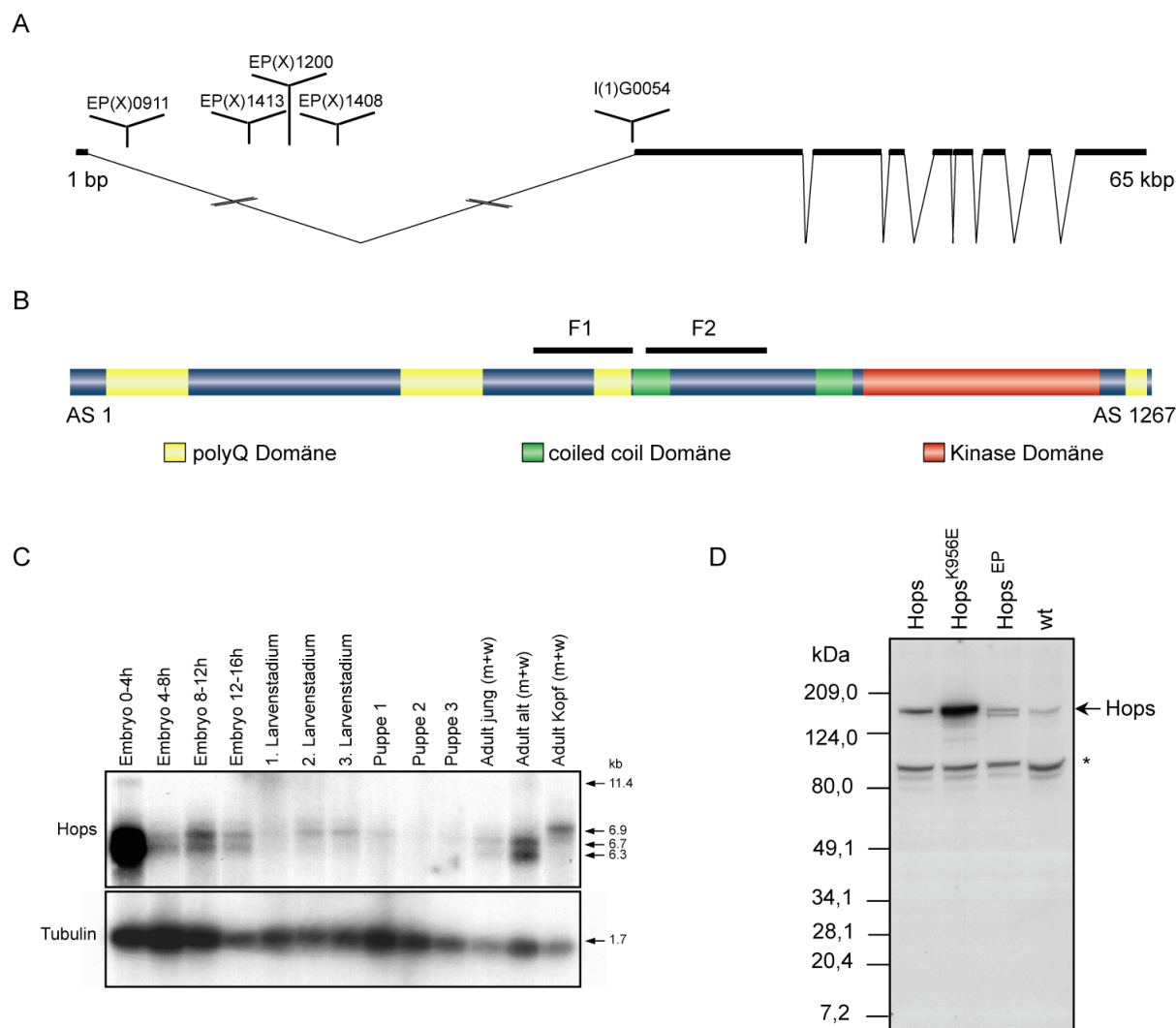


Abb. 13 Charakterisierung des Gens *Tlk/Hokuspokus*. A) Schema der Genstruktur von *Tlk* und der bekannten P-Element Insertionen. B) Schema der vorhergesagten Proteinstruktur. Neben der hochkonservierten Serin/Threonin-Kinasedomäne aus der *Tlk*-Familie enthält das Protein noch zwei coiled-coil Domänen und mehrere Polyglutamin-reiche Domänen. Die Vorhersagen der Domänen wurden mit dem Programm SMART erstellt (Schultz et al. 1998). Die mit F1 und F2 bezeichneten Bereiche des Proteins wurden zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers verwendet. C) Northern Blot Analyse der Expression von *Tlk/Hops* während der Entwicklung. Das Gen wird in allen Entwicklungsstadien exprimiert, besonders ausgeprägt ist die maternale Komponente. Es konnten vier alternative Spleißformen detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde der selbe Blot mit einer Sonde gegen Tubulin inkubiert. D) Das entsprechende Protein wurde durch Western Blot mit dem Antikörper gegen die Fragmente F1 und F2 analysiert. Der Antikörper erkennt neben der überexprimierten Kinase (*UAS-Hops* und *UAS-Hops*^{K956E}) auch das endogene Protein (wt). Die Expression von *Hops*^{EP} führt zur Produktion einer leicht verkürzten Form des Proteins. Der Stern kennzeichnet eine Kreuzreaktion des Antikörpers.

Zur weiteren Charakterisierung der Kinase auf Proteinebene wurden polyklonale Antikörper gegen zwei Fragmente des Proteins erzeugt (Abb. 13 B). Diese Antikörper erkennen im Western Blot von Extrakten wildtypischer Fliegen eine Proteinbande oberhalb des 124 kDa Markers, die dem theoretischen Molekulargewicht von 136,7 kDa entspricht (Abb. 13 D). Wird die Transkription von *Hops*^{EP} mit GMR-Gal4 induziert, entsteht eine zusätzliche Bande von etwas geringerer Größe. Dies ist bereits ein Indiz dafür, dass die Kinase tatsächlich von

dem EP-Element überexprimiert wird und daher für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist. Um dies endgültig zu beweisen, wurden transgene Fliegen erzeugt, die direkt die cDNA der Kinase unter Kontrolle von UAS-Bindestellen exprimieren (UAS-*Hops*). Zur Kontrolle wurden transgene Linie mit einer Variante der Kinase hergestellt, deren ATP-Bindestelle innerhalb der Kinase-Domäne mutiert wurde (UAS-*Hops*^{K956E}). An der verwandten Kinase *Tousled* (*Arabidopsis thaliana*) konnte gezeigt werden, dass eine entsprechende Mutation zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität führt (Roe et al. 1997). Nach Expression dieser beiden Konstrukte mit GMR-GAL4 konnte, wie erwartet, im Western Blot eine Verstärkung der im Wildtyp detektierten Proteinbande beobachtet werden (Abb. 13 D).

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass *Hops*^{EP} die Expression der Serin/Threonin-Kinase *Tousled-like Kinase/Hokuspokus* induziert und dieses Enzym wahrscheinlich für den beobachteten Effekt auf das Proteinlevel von APP verantwortlich ist.

2.1.2.3 Die Kinase-Aktivität von Tlk hat nur während eines bestimmten Zeitpunktes Einfluss auf den APP Metabolismus

Um zu untersuchen, ob die Serin/Threonin-Kinase Tlk/Hops für den Abbau von APP verantwortlich ist, wurden sowohl die aktive als auch die mutierte cDNA zusammen mit APP unter Kontrolle von GMR-Gal4 überexprimiert und die Proteinmenge durch Western Blot Analyse bestimmt (Abb. 14 A und B). Die Resultate des Versuchs zeigen eindeutig, dass Hops/Tlk tatsächlich das gesuchte Protein ist. Die Reduktion der APP Proteinmenge ist sogar deutlich stärker ausgeprägt als die durch das EP-Element induzierte. Dies kann leicht durch die erhöhte Expression der cDNA erklärt werden (Abb. 13 D). Weiterhin ist erkennbar, dass die Kinaseaktivität für den beobachteten Effekt notwendig ist. Die Expression der mutierten Form führt sogar zu einer Akkumulation des Proteins voller Länge (Abb. 14 A und B) und des CTF (Abb. 14 C). Dies könnte durch eine dominant-negative Wirkung der inaktiven Kinase auf die endogenen Kinase verursacht werden: Da lediglich die enzymatische Aktivität, nicht aber die restlichen Domänen des Proteins verändert wurden, kompetitiert die Mutante mit der endogenen Kinase um die Substratbindung und verhindert so die Phosphorylierung der Zielproteine.

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Aktivität der Kinase in adulten Köpfen zur Destabilisierung von APP führt. Um diesen Prozess molekular näher untersuchen zu können, wurde APP zusammen mit Hops und Hops^{K956E} in *Drosophila* Zellkultur transient exprimiert.

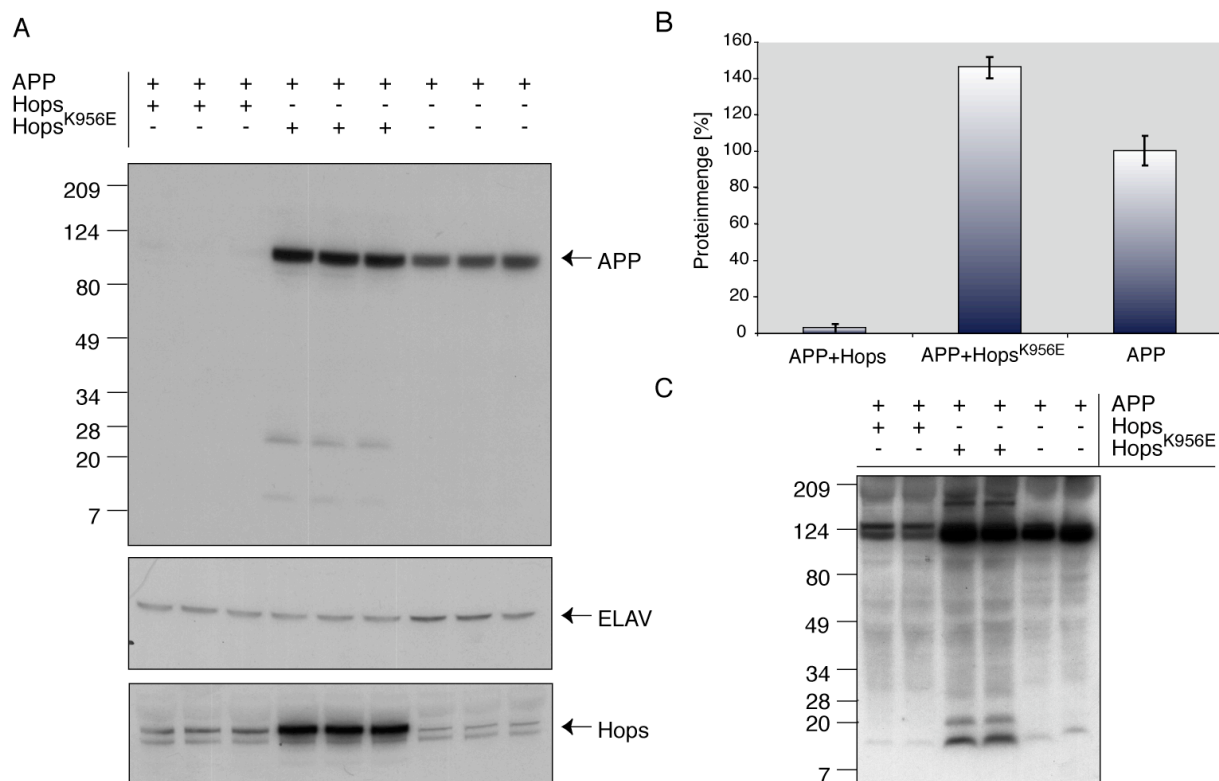


Abb. 14 Die Aktivität der Kinase Hops/Tlk führt zum Verlust von APP. A) Fliegen, die APP unter der Kontrolle von GMR-Gal4 exprimieren, wurden mit transgenen Linien für Hops und Hops^{K956E} gekreuzt und durch Western Blot mit dem Antikörper 22C11 analysiert. Als Ladekontrollen wurden α ELAV-Antikörper verwendet, die Expression der beiden transgenen Konstrukte wurde mit α FLAG-Antikörpern überprüft. Die Expression der aktiven Kinase führt zur Degradation von APP, die der inaktiven Form zur dessen Akkumulation. B) Quantifizierung der Daten durch Densitometrie. C) Die Entstehung von CTF bei gleichzeitiger Expression von APP und Hops bzw. Hops^{K956E} wurde mit dem Antikörper CT13 analysiert. Die inaktive Kinase führt nicht nur zu einer Akkumulation des Proteins voller Länge, sondern auch zur vermehrten Bildung oder erhöhten Stabilität von CTF. Genotyp der Kreuzungen: APP - GMR-Gal4/+;UAS-APP/+ APP+Hops - GMR-Gal4/UAS-Hops;UAS-APP/+ APP+Hops^{K956E} - GMR-Gal4/ UAS-Hops^{K956E};UAS-APP/+

Überraschenderweise konnte in diesem System kein Effekt auf das Proteinlevel von APP festgestellt werden (Abb. 15 A). Dies legte die Vermutung nahe, dass die Aktivität der Kinase nur in bestimmten Zellen oder zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung einen Einfluss auf APP ausübt. Um dies zu untersuchen, wurde die Menge an APP in larvalen Imaginalscheiben mit und ohne Expression von Hops durch Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 15 B zu erkennen, zeigt die Kinase zu diesem Zeitpunkt noch keine Wirkung. Auch in der immunhistochemischen Färbung von APP war kein Unterschied erkennbar (Abb. 15 C). Erst zu einem gewissen Zeitpunkt während der pupalen Entwicklung scheint sich die Wirkung der Kinase auf die Stabilität von APP auszuwirken. Diese Abhängigkeit von dem Entwicklungszustand des Gewebes legt eine indirekte Wirkung von Hops auf APP nahe: Erst wenn die Expression eines vermittelnden Faktors beginnt, führt dessen Phosphorylierung zur Degradation von APP.

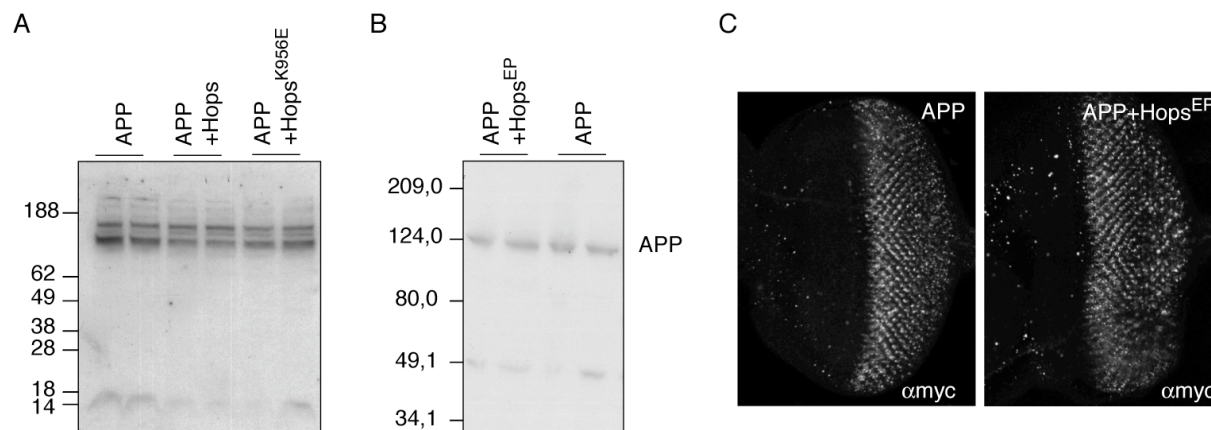


Abb. 15 Der Effekt von Hops ist auf einen bestimmten Zeitpunkt während der Entwicklung beschränkt.

A) APP und Hops, bzw. die inaktive Form Hops^{K956E} wurden in S2-Zellkultur kotransfiziert und die Menge von APP durch Western Blot mit dem Antikörper CT13 bestimmt. Die Expression von Hops führt zwar zu einer leichten Reduktion von APP, ist aber nicht mit dem Effekt in adulten Köpfen vergleichbar. So können zum Beispiel immer noch CTF detektiert werden. Auch die inaktive Form Hops^{K956E} induziert nicht wie erwartet die Akkumulation von APP, sondern ebenfalls eine leichte Reduktion der Proteinmenge. B) Western Blot von den larvalen Augenimaginalscheiben von je 15 weiblichen Larven, die APP alleine oder zusammen mit EP(X)1408 exprimieren. APP wurde mit dem Antikörper 22C11 detektiert. Es konnte keine Veränderungen der Proteinmenge beobachtet werden. C) Immunfärbung larvaler Augenimaginalscheiben der selben Kreuzung mit α myc-Antikörpern. Wiederum konnte kein wesentlicher Unterschied erkannt werden. Da Hops^{EP} einen leichten Augenphänotyp induziert, erscheint die Färbung unregelmäßiger als bei Expression von APP alleine. Genotyp der Kreuzungen: APP - +;GMR-Gal4/+;UAS-APP/+ APP+Hops^{EP} - EP(X)1408/+;GMR-Gal4/+;UAS-APP/+

2.1.3 dBeach1 beeinflusst die Prozessierung von APP und ändert dessen subzelluläre Lokalisation

2.1.3.1 EP(2)2299 führt zur Akkumulation von CTF

Im Gegensatz zu *Hokuspokus* induziert das zweite EP-Element, das im Verlauf dieser Arbeit näher charakterisiert wurde, keine Degradation von APP, sondern eine Akkumulation des CTF bei gleichzeitiger leichter Reduktion des Proteins voller Länge. Da die Überexpression der Sekretasen BACE und Kuzbanian ähnliche Wirkung auf APP zeigte, wurden die entsprechenden Kreuzungen auf einem Western Blot verglichen (Abb. 16). Dieses Experiment zeigte, dass EP(2)2299 die Akkumulation desselben Fragments induziert, das auch durch Überexpression von Kuzbanian erzeugt wird.

2.1.3.2 EP(2)2299 kontrolliert das Gen *dBeach1*

EP(2)2299 ist im ersten Intron des Gens *dBeach1* vor dem Startcodon inseriert (Abb. 17 A). *dBeach1* codiert ein Protein mit drei konservierten Domänen: einer Beach Domäne, einer WD40 Domäne und einem FYVE Finger (Abb. 17 B). Die Beach Domäne ist eine hochkonservierte Domäne von ungefähr 300 AS Länge. Sie ist meist Bestandteil sehr großer

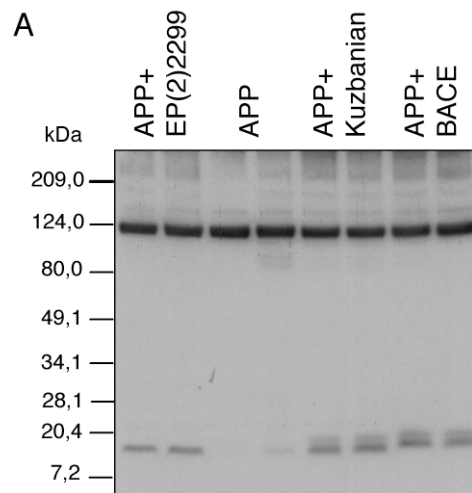


Abb. 16 EP(2)2299 induziert die Akkumulation von CTF. APP wurde unter der Kontrolle von GMR-Gal4 alleine oder zusammen mit EP(2)2299, Kuzbanian oder BACE in adulten Augen exprimiert. Proteinextrakte wurden durch Western Blot mit den Antikörpern CT13 analysiert. Wie bereits gezeigt, führt die Expression der beiden Sekretasen zur Akkumulation der entsprechenden CTF. Wird APP zusammen mit dBeach1 exprimiert, akkumuliert in ähnlicher Weise das α -geschnittene CTF. Genotyp der Kreuzungen: APP+EP(2)2299 - GMR-Gal4/EP(2)2299;UAS-APP/+ APP - GMR-Gal4/+;UAS-APP/+ APP+Kuz - GMR-Gal4/+;UAS-APP/UAS-Kuzbanian APP+BACE - GMR-Gal4/UAS-BACE; UAS-APP/+

Proteine (>2000 AS), die eine Rolle in vesikulärem Transport, Membrandynamik oder Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion spielen (Jogl et al. 2002). Ihre molekulare Funktion ist jedoch unbekannt. In allen bisher bekannten Fällen befindet sich die Beach Domäne direkt vor einer WD40 Domäne am C-Terminus des Proteins. Dieses Motiv vermittelt Protein-Protein Interaktionen und ist Bestandteil einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine (Smith et al. 1999). Die FYVE Domäne besteht aus mehreren Cysteinen, die zwei Zink-Ionen komplexieren. Sie ist in verschiedenen Proteinen vorhanden, die Funktionen in Vesikeltransport, Signaltransduktion oder Regulation des Zytoskeletts haben können (Stenmark et al. 1999; Stenmark et al. 2002). Die FYVE Domäne bindet normalerweise an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P), das vor allem in der Membran von Endosomen angereichert ist, und bestimmt dadurch die subzelluläre Lokalisation des Proteins.

Um die Funktion von *dBeach1* näher zu verstehen, wurde zuerst die Expression während der Entwicklung durch Northern Blot Analyse untersucht (Abb. 17 C). Die entsprechende mRNA von ca. 10 kbp Länge konnte, wenn auch nur schwach, in den meisten Stadien nachgewiesen werden. Interessanterweise scheint die Expression in adulten Köpfen verstärkt zu sein. Alternative Spleißformen konnten nicht detektiert werden.

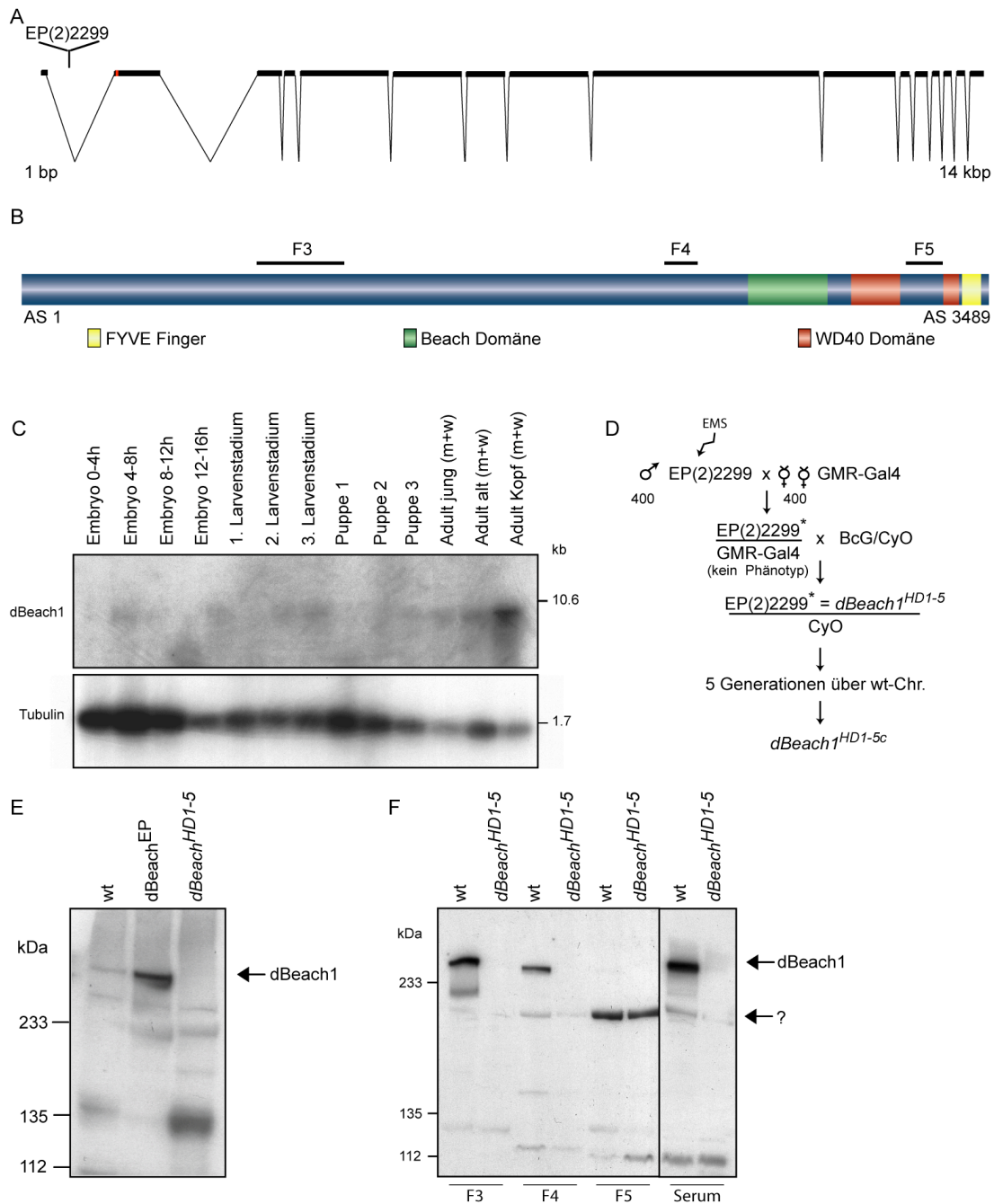


Abb. 17 Charakterisierung des Gens *dBeach1*. A) Schema des genomischen Lokus. B) Schema der vorhergesagten Proteinstruktur. SMART sagt eine Beach-Domäne, eine WD40-Domäne und ein FYVE-Finger voraus. Die mit F3, F4 und F5 gekennzeichneten Bereiche wurden zur Herstellung eines Antiserums verwendet. C) Expressionsprofil von *dBeach1* während der Entwicklung. Die 10,6 kbp lange mRNA konnte in fast allen Stadien der Entwicklung detektiert werden, scheint aber im adulten Kopf angereichert zu sein. Eine maternale Komponente war nicht erkennbar. D) Kreuzungsschema zur Erzeugung der Mutante *dBeach1^{HD1-5c}*. E) Western Blot Analyse von *dBeach1*. Wildtypische Fliegen wurden mit der Mutante *dBeach1^{HD1-5}* und Fliegen verglichen, die *dBeach1^{EP}* mit GMR-Gal4 exprimieren. Der Western Blot wurde mit dem polyklonalen Antiserum inkubiert. Es erkennt im Wildtyp eine Bande oberhalb der größten Markerbande, die bei Expression des EP-Elements verstärkt wird und in der Mutante nicht detektierbar ist. Diese Bande entspricht also dem 370 kDa Protein *dBeach1*. Genotyp der Fliegen: wt - w¹¹¹⁸ Beach^{EP} - EP(2)2299/GMR-Gal4 - Beach^{HD1-5}. F) Analyse der Mutante mit den aufgereinigten Antikörpern α Beach1-F3, α Beach1-F4 und α Beach1-F5. Zum Vergleich wurde das unbehandelte Serum verwendet. Die Antikörper gegen F3 und F4 erkennen das wildtypische Protein, aber keine verkürzten Fragmente in der Mutante. Der gegen F5 gerichtete Antikörper erkennt nur eine unspezifische Bande, die in Mutante und Wildtyp gleichermaßen vorhanden ist. Da keine verkürzten Proteine in der Mutante erkannt werden, muss ein Stoppkodon vor den Epitopen von α Beach1-F3 entstanden sein. ? markiert eine unspezifische Bande.

Neben der Überexpression stellen Mutationen eine weitere Möglichkeit dar, die biologische Funktion eines Proteins aufzuklären. Um eine entsprechende Mutante zu erzeugen, wurden Männchen der Linie EP(2)2299 durch EMS mutagenisiert. In der folgenden Kreuzung mit dem Gal4-Treiber GMR wurden die Nachkommen identifiziert, die keinen Phänotyp mehr zeigten (Abb. 17 D). Das Fehlen des Phänotyps trotz Überexpression deutet daraufhin, dass eine Mutation das mit dem EP-Element assoziierte Gen funktionslos gemacht hat. Durch diese Methode konnte die Mutante *dBeach1^{HDI-5c}* erzeugt werden. Sie ist lebensfähig, fertil und zeigt keine äußerlichen Phänotypen. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur wird die Linie EP(2)2299 in den folgenden Abschnitten *dBeach1^{EP}* benannt.

Als weiteres Werkzeug zur Untersuchung von *dBeach1* wurden polyklonale Antikörper gegen drei Fragmente des Proteins erzeugt (F3, F4 und F5, Abb. 17 B). Die Immunisierung eines Kaninchens ergab ein Serum, das im Western Blot eine Bande oberhalb des höchsten Markerproteins (233 kDa) erkennt, die durch EP-Element induzierte Expression deutlich verstärkt wird (Abb. 17 E). Dies zeigt, dass die Antikörper das 370 kDa große Protein *dBeach1* spezifisch erkennen. In der erzeugten Mutante ist die prominente Bande verschwunden, es scheint also ein vorzeitiges Stopkodon erzeugt worden zu sein, das zu einer verkürzten Form des Proteins führt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die verschiedenen Antikörper gegen die drei Fragmente durch Affinitätschromatographie separiert und gereinigt. Western Blot Analyse von Extrakten des Wildtyps und der Mutante ergab, dass keiner der Antikörper ein zusätzliches Fragment detektiert (Abb. 17 F). Daraus kann geschlossen werden, dass das Stopkodon N-terminal des Epitops von F3 entstanden sein muss. Des Weiteren zeigte diese Analyse, dass vor allem die Epitope F3 und F4 von den erzeugten Antikörpern detektiert werden, während die Antikörper, die mit dem Fragment F5 gereinigt wurden, im Wildtyp und der Mutante nur eine unspezifische Bande erkennen (Abb. 17 F).

2.1.3.3 *dBeach1* verändert die subzelluläre Lokalisation von APP

Die Domänenstruktur, im Besonderen die Beach-Domäne, legt nahe, dass *dBeach1* an der Regulation von intrazellulären Transportprozessen beteiligt ist. Der beobachtete Effekt auf die Prozessierung von APP könnte daher durch eine veränderte subzelluläre Lokalisierung verursacht werden. Um dies zu untersuchen, wurde humanes APP alleine und zusammen mit *dBeach1* in den Speicheldrüsen von *Drosophila* überexprimiert. Die larvale Speicheldrüse stellt ein röhrenförmiges, polarisiertes Epithel da, dessen apikale Seite einen sekretorischen Kanal umschließt (Bradley et al. 2001). Die Zellen dieses Epithels eignen sich auf Grund ihrer

Größe besonders zur Analyse der subzellulären Lokalisierung von Transmembranproteinen. Nach Expression in diesem Gewebe kann APP an der basalen Seite der Zellen detektiert werden, vor allem an den Verbindungen zwischen den Zellen (Abb. 18 A). Die basolaterale Lokalisierung in einem polarisierten Epithel entspricht den publizierten Studien in vergleichbaren Säugetierzellen (Haass et al. 1995).

Wurde nun gleichzeitig dBeach1 exprimiert, veränderte sich das beobachtete Signal: APP konnte nicht mehr an den Zellgrenzen detektiert werden, sondern war diffus an oder unmittelbar unter der Zelloberfläche in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert (Abb. 18 B). Diese veränderte Lokalisierung wurde nicht durch Veränderungen in der Zellmorphologie hervorgerufen, wie die Visualisierung der Zellumrisse mit Antikörpern gegen Spectrin verdeutlicht (Abb. 18 C und D).

Die intrazelluläre Domäne von APP enthält verschiedene Aminosäure-Motive (Abb. 19 A), die unter anderem einen großen Einfluss auf den intrazellulären Transport haben (Kerr et al. 2005). Das kurze Motiv QYTSI direkt nach der Transmembrandomäne (BASS) vermittelt die basolaterale Sortierung in polarisierten Zellen (Haass et al. 1995), während trimere G-Proteine

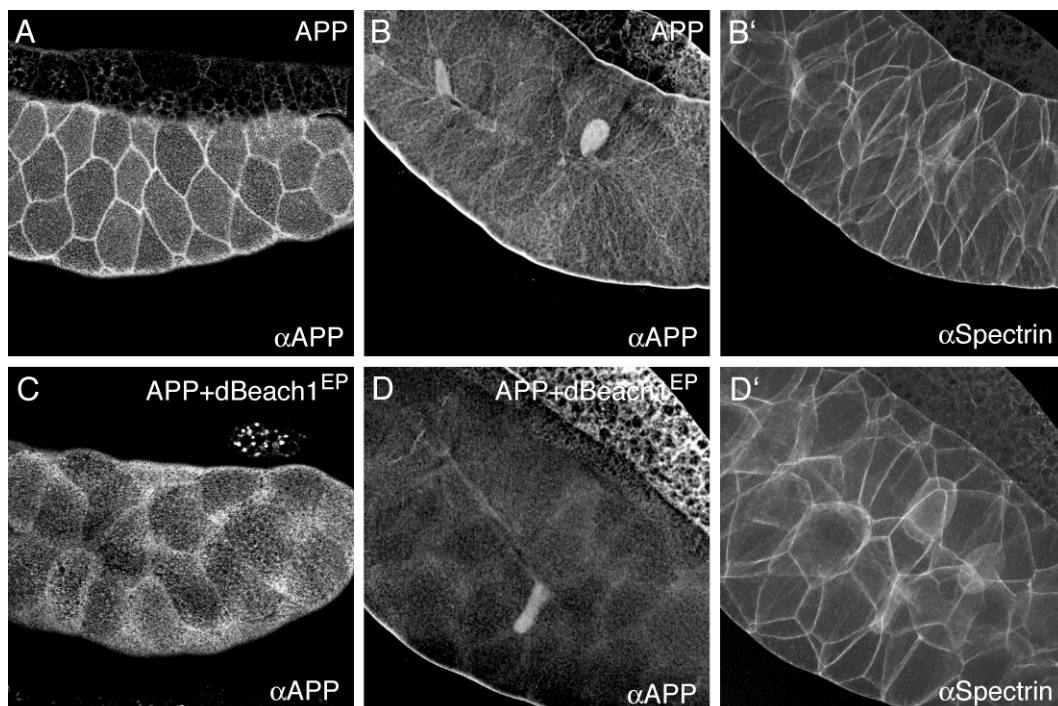


Abb. 18 dBeach1 verändert die Lokalisation von APP in larvalen Speicheldrüsen. A) und C) APP wurde unter der Kontrolle von Gal4^{231.4} alleine oder zusammen mit dBeach1 in den larvalen Speicheldrüsen exprimiert. Die Lokalisierung wurde durch Immunfärbung mit dem Antikörper 4G8 gegen die A β -Region sichtbar gemacht. Die Expression von dBeach1 führte zum Verlust der basolateralen Lokalisation von APP, so dass nur noch diffuse Signale detektierbar waren. Die Abbildungen entsprechen einer optischen Ebene B) und D) Die Verteilung von APP in der gesamten Speicheldrüse ist durch Projektion der einzelnen optischen Ebenen dargestellt. Zur Darstellung der Zellumrandungen wurde das kortikale Aktinnetzwerk mit Antikörpern gegen α Spectrin gefärbt (B') und (D'). Genotyp der Kreuzungen: APP - Gal4^{231.4}/+;UAS-APP/+ | APP+dBeach1^{EP} - Gal4^{231.4}/EP(2)2299;UAS-APP/+

an das überlappende G_o-Signal binden können (Nishimoto et al. 1993). Das benachbarte PEER-Motiv bildet eine geordnete Loop-Struktur, deren Funktion bisher unbekannt ist (Ramelot et al. 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Phosphorylierung von Threonin-688 die Prozessierung von APP beeinflusst (Lee et al. 2003). Schließlich bildet das NPTY-Motiv eine Bindestelle für zahlreiche intrazelluläre Adapterproteine wie zum Beispiel FE65, X11 und Numb. Dadurch wird unter anderem die Endozytose von APP reguliert (Perez et al. 1999). Die verschiedenen intrazellulären Motive sind zur besseren Übersicht in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4 Motive der intrazellulären Domäne von APP

Motiv	Funktion
BASS	basolaterale Sortierung in polarisierten Zellen
G _o	Bindestelle für trimere G-Proteine
PEER	Loop-Struktur, Phosphorylierung von T-688
NPTY	Endozytose, Bindestelle für Adapterproteine

Ist eines dieser Motive für den Effekt von dBeach1 auf APP notwendig? Da in unserem Labor eine Reihe verschiedener transgener Fliegenstämme mit Deletionen in der A^{ICD} zu Verfügung standen (Soba 2004), konnte der Einfluss dieser Motive auf den beobachteten Phänotyp untersucht werden. Die Deletionen wurden zusammen mit dBeach1 im adulten Auge überexprimiert und die Prozessierung durch Western Blot analysiert (Abb. 19 A und B). Die Koexpression von dBeach1 mit den Deletionen ΔBASS, ΔG_o und ΔPEER führte wie bei wildtypischen APP zur Akkumulation des CTF (Abb. 19 B). Wurde dagegen das NPTY-Motiv deletiert, zeigte dBeach1 keine Wirkung mehr auf die Prozessierung. Es konnte lediglich eine gemeinsame Abnahme des CTFs und des Proteins voller Länge festgestellt werden (Abb. 19 B).

Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäurereste des NPTY-Motivs näher zu bestimmen, wurden Tyrosin-682, Asparagin-684 und Tyrosin-687 jeweils gegen Alanin ausgetauscht (Soba 2004). In den entsprechenden Fliegenlinien wurde die Bildung des CTFs mit und ohne dBeach1 analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass lediglich der Austausch Asp-684-Ala die Akkumulation des CTFs verhinderte (Abb. 19 C). Es ist also nur diese eine Aminosäure für den Effekt von dBeach1 notwendig. Da Asparagin-684 eine entscheidende Rolle für die Internalisierung von APP spielt (Perez et al. 1999), verdeutlicht dieses Ergebnis, dass Endo-

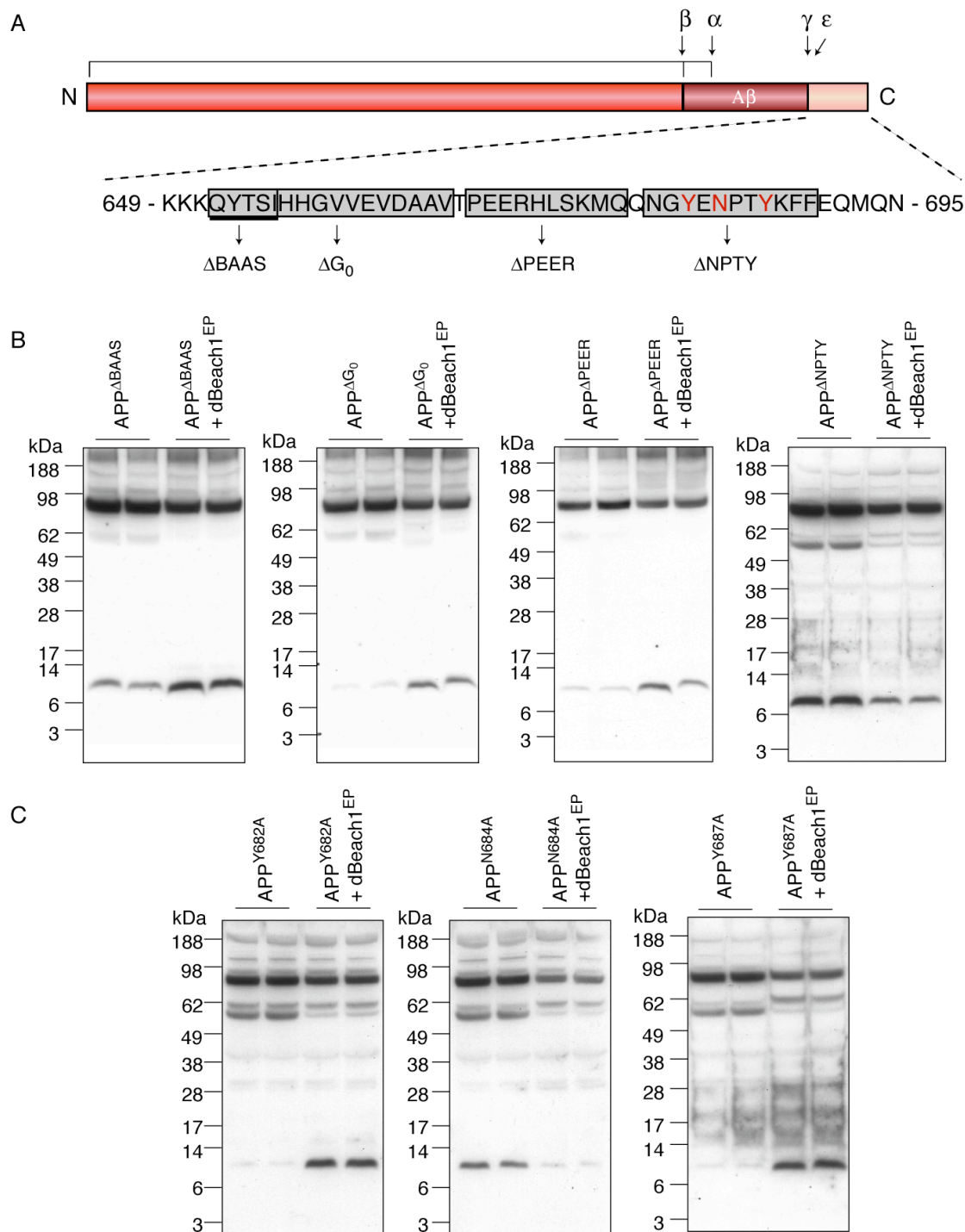


Abb. 19 Das NPTY-Motiv in der intrazellulären Domäne von APP ist für die Wirkung von dBeach1 notwendig. A) Schema der verwendeten intrazellulären Deletionen von APP. B) Die entsprechenden Deletionen von APP wurden alleine oder zusammen mit dBeach1 unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert und nach Western Blot mit den Antikörpern CT13 (Δ BASS, Δ G₀, Δ PEER) bzw. #27576 (Δ NPTY) analysiert. Nur die Deletion des NPTY-Motivs verhindert die dBeach1 induzierte Akkumulation des CTF C) Die Aminosäuren Y682, N684 und Y687 innerhalb des NPTY-Motivs wurden einzeln gegen Alanin ausgetauscht und die entsprechenden transgenen Linien alleine oder zusammen mit dBeach1 im adulten Auge exprimiert. Western Blot Analyse der entsprechenden Proteinextrakte mit dem Antikörper #27576 zeigte, dass die Aminosäure N684 von entscheidender Bedeutung für die Wirkung von dBeach1 ist.

zytose eine essentielle Voraussetzung für die Wirkung von dBeach1 ist. Adapterproteine wie zum Beispiel FE65 oder X11, deren Bindung auch abhängig von Tyrosin-682 ist, scheinen dagegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Borg et al. 1996).

Durch die Analyse der intrazellulären Domäne konnte gezeigt werden, dass das NPTY-Motiv für die dBeach1 induzierte Veränderung der APP Prozessierung benötigt wird (Abb. 19). In Speicheldrüsen wurde beobachtet, dass die Expression von dBeach1 die APP Lokalisierung verändert (Abb. 18). Aus der Hypothese, dass die veränderte Lokalisierung verantwortlich für den Einfluss auf die Prozessierung ist, ergibt sich die Voraussage, dass dBeach1 keine Wirkung auf die subzelluläre Verteilung von APP^{ΔNPTY} in den Speicheldrüsen zeigt. Dies konnte experimentell bestätigt werden: Obwohl die Expression von APP^{ΔNPTY} zu einer veränderten Morphologie der Speicheldrüsen führte, sie waren gedrungener und hatten ungleichmäßigere Umrisse als der Wildtyp, veränderte sich die Lokalisierung des Proteins durch dBeach1 nicht (Abb. 20 A und B). Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass die Expression beider Proteine teilweise zu so starken Veränderungen der Zellstruktur führte, dass kein klares Signal mehr detektierbar war.

dBeach1 führt also durch eine Veränderung in der subzellulären Verteilung von APP zu einer veränderten Prozessierung des Proteins. Dieser Einfluss auf die Lokalisierung setzt das Vorhandensein des NPTY-Motives voraus. Die Ergebnisse legen zwei mögliche Mechanismen zur Erklärung der beobachteten Veränderungen nahe: Erstens könnte dBeach1 direkt an das NPTY-Motiv in der intrazellulären Domäne binden und so den Metabolismus von APP beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass dBeach1 den Transport innerhalb der intrazellulären Kompartimente beeinflusst und daher die Funktion des NPTY-Motives als

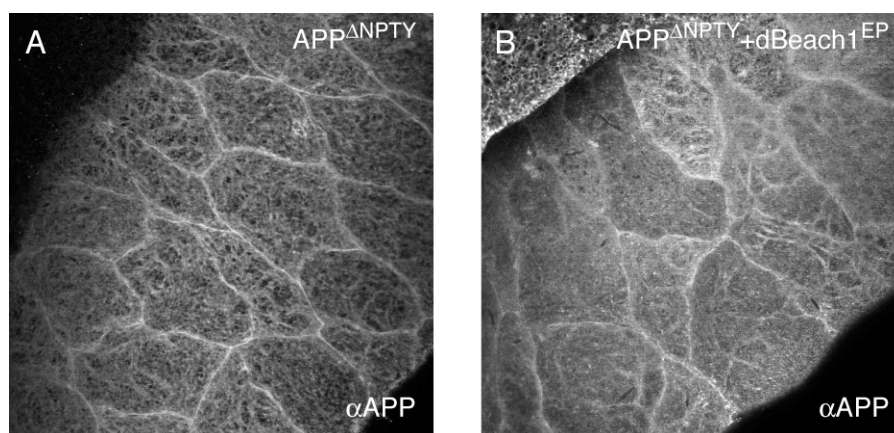


Abb. 20 Die Deletion des NPTY-Motivs verhindert die Relokalisation von APP durch dBeach1. A) und B) APP^{ΔNPTY} wurde unter der Kontrolle von Gal4^{231.4} alleine oder zusammen mit dBeach1 in den larvalen Speicheldrüsen exprimiert. Die Lokalisierung wurde durch eine Immunfärbung mit dem Antikörper 4G8 gegen die A β -Region sichtbar gemacht. Im Gegensatz zu wildtypischen APP verändert sich die Lokalisierung von APP^{ΔNPTY} bei Expression von dBeach1 nicht.

Endozytosesignal benötigt wird. Gegen die direkte Interaktion mit APP spricht das Fehlen einer entsprechenden Bindedomäne. So konnte gezeigt werden, dass vor allem Proteine mit einer Phosphotyrosin-Bindedomäne an NPTY-Motive binden können (Songyang et al. 1995). Auch experimentell konnte in Immunpräzipitationen keine direkte Bindung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es scheint daher wahrscheinlicher, dass dBeach1 durch seine Beach-Domäne und den FYVE-Finger an intrazelluläre Kompartimente binden und den Fluss von Proteinen durch diese steuern kann.

2.1.3.4 Die subzelluläre Lokalisierung von APP beeinflusst generell seine Prozessierung

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts zeigen die Bedeutung der subzellulären Lokalisation für die APP Prozessierung. Diese Ergebnisse decken sich gut mit anderen Studien, in denen gezeigt wurde, dass die verschiedenen Sekretasen in unterschiedlichen Kompartimenten aktiv sind (Capell et al. 2002; Pasternak et al. 2003). Ist dies also ein genereller Mechanismus zur Steuerung der Prozessierung?

Um dies zu untersuchen, wurde APP zusammen mit Proteinen überexprimiert, die an intrazellulären Transportprozessen beteiligt sind. Eine zentrale Rolle in der Steuerung des Vesikelverkehrs nehmen die kleinen GTPasen der Rab-Familie ein (Somsel Rodman et al. 2000). Über ihre isoprenylierte C-terminale Domäne können sie mit Membranen assoziieren und so verschiedenen Schritte von der Bildung der Vesikel bis zur Fusion mit dem Zielkompartiment regulieren. Die bisher bekannten über 60 Mitglieder der Rab-Familie binden an distinkte Kompartimente und vermitteln so deren Identität. Besonders gut untersucht ist die Rolle dieser Proteine in der Kontrolle der Endozytose. Rab5 steuert dabei die Internalisierung von Proteinen und deren Transport zum frühen Endosom durch Clathrin-umhüllte Vesikel. Rab7 ist verantwortlich für den Weitertransport zum späten Endosom oder Lysosom. Andere Rab-Proteine (Rab4 und Rab11) kontrollieren das Recycling zurück zur Plasmamembran.

Die Internalisierung von Proteinen, der primäre Schritt in der Endozytose, wird durch die Bindung von Adapterproteinen eingeleitet. Diese Proteine verknüpfen die Substrate mit der Endozytose-Maschinerie und führen so zu deren Anreicherung in Clathrin-umhüllten Vertiefungen bzw. später in entsprechenden Vesikeln (Schmid 1997). Eines dieser Adapterproteine ist Numb, das als Modifikator des Notch-Signalwegs identifiziert wurde und entweder die Internalisierung von Notch selber (Berdnik et al. 2002) oder des interagierenden Proteins Sampdo (O'Connor-Giles et al. 2003) reguliert. Über seine PTB-Domäne kann Numb auch an das YENPTY-Motiv von APP binden (Roncarati et al. 2002) und daher

möglicherweise dessen Internalisierung modulieren. An das NPTY-Motiv binden weitere Proteine wie zum Beispiel Dab2, ein Mitglied der Disabled-Familie (Yun et al. 2003). Auch dieses Protein kann mit der endozytotischen Maschinerie interagieren und die Internalisierung von Membranproteinen initiieren (Mishra et al. 2002). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Homologe von Numb und Dab2 in *Drosophila* APP binden und dessen Einfluss auf den Notch-Signalweg modulieren (Merdes et al. 2004).

Um einen möglichen Einfluss auf die Prozessierung von APP zu untersuchen, wurden eine dominant-negative Form von Rab5, eine konstitutiv-aktive Form von Rab7 (Entchev et al. 2000), Numb und Disabled (Dab) zusammen mit APP in den adulten Augen von *Drosophila* exprimiert und die Entstehung der CTF durch Western Blot analysiert (Abb. 21). Leider erwies sich die Expression von Rab5^{DN} mit GMR-Gal4 als letal, so dass der Effekt einer blockierten Endozytose auf APP nicht untersucht werden konnte. Verstärkt man jedoch durch Rab7^{QL} den Transport internalisierter Proteine vom frühen Endosom in das späte Endosom/Lysosom, akkumuliert überraschenderweise sowohl das unprozessierte APP als auch das CTF. Dabei werden neben dem hauptsächlichen CTF von ca. 9 kDa zusätzliche Banden größeren und kleineren Molekulargewichts sichtbar. Während das größere CTF wahrscheinlich das Produkt einer bisher unbekanntenen Protease darstellt, die in diesen Kom-

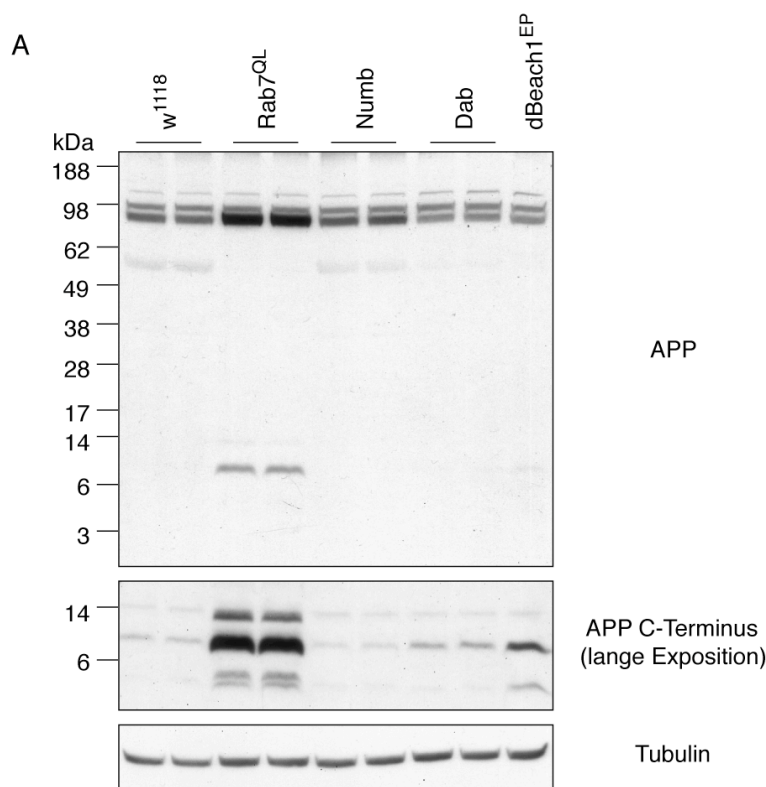


Abb. 21 Die intrazelluläre Lokalisation von APP beeinflusst dessen Prozessierung. APP wurde alleine oder zusammen mit Rab7^{QL}, Numb, Dab oder dBeach1 unter der Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. Der anschließende Western Blot wurde mit den Antikörpern CT13 inkubiert. α Tubulin diente als Ladekontrolle. Der verstärkte Transport von Protein in das späte Endosom/Lysosom, den Rab7^{QL} induziert, führt zur Akkumulation von APP und zur massiven Anreicherung von CTF. Dabei entstehen auch zusätzliche CTF. Die Expression von Numb und Dab hat nur marginale Effekte. Genotyp der Kreuzung: w¹¹¹⁸ - GMR-Gal4 /+; UAS-APP/+ APP+ Rab7^{QL} - GMR-Gal4/ UAS-Rab7^{QL}; UAS-APP/+ APP+Numb - GMR-Gal4/UAS-Numb; UAS-APP/+ APP+Dab - GMR-Gal4/UAS-Dab; UAS-APP/+ APP+dBeach1^{EP} - GMR-Gal4/EP(2)2299; UAS-APP/+

partimenten aktiv ist, könnte die kleinere Bande der von der γ -Sekretase freigesetzten A^{ICD} entsprechen. Dieses überraschende Ergebnis zeigt, dass der Metabolismus von APP durch den Transport in das späte Endosom/Lysosom verändert wird und es im Gegensatz zu der intuitiven Erwartung nicht zu einem Abbau, sondern zu einer Stabilisierung des Proteins voller Länge kommt. Die vorhandenen Ergebnisse können leider nicht abschließend klären, ob die Akkumulation der CTF durch Erhöhung der Gesamtmenge an Protein, durch Stimulierung der entsprechenden Proteasen oder durch verminderte Prozessierung durch die γ -Sekretase verursacht wird. Das Entstehen des oben erwähnten kleineren Fragments und vorläufige Ergebnisse mit dem im zweiten Teil beschriebenen Reportersystem sprechen allerdings gegen die letzte Erklärungsmöglichkeit.

Die Koexpression der beiden Adapterproteine Numb und Dab hat dagegen nur marginalen Einfluss auf die APP Prozessierung (Abb. 21). Während Numb eine leichte Akkumulation des Proteins voller Länge induziert, führt Dab zu einer geringen Zunahme des CTFs. Unter der Annahme, dass die Endozytose von APP zu verstärkter Prozessierung führt, bedeuten diese Ergebnisse folgendes: Dab trägt in geringem Maße zur Internalisierung von APP bei. Numb hingegen kann in diesem Gewebe keine endozytotische Funktion ausüben, so dass es mit der Bindung aktiver Adapterproteine an das NPTY-Motiv kompetitiert. Auf Grund der geringen Effekte beider Proteine müssen mögliche Schlüsse jedoch mit Vorsicht betrachtet werden.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse im Einklang mit publizierten Studien (Perez et al. 1999), dass die Internalisierung von APP in die endosomalen Kompartimente einen entscheidenden Faktor in der Regulation der Prozessierung darstellt.

Da die bisherigen Ergebnisse für dBeach1 eine Funktion in der Kontrolle der APP-Lokalisation zeigten, lag es nahe zu untersuchen, ob auch die anderen neu identifizierten Regulatoren der APP Prozessierung eine ähnliche Wirkung auf intrazelluläre Transportprozesse haben. Dazu wurden diese wiederum zusammen mit APP in den Speicheldrüsenzellen von *Drosophila*-Larven exprimiert (Abb. 22). Leider verursachte die Expression von EP(X)1595 (Abb. 22 C) und EP(2)2054 (nicht gezeigt) dabei jedoch so starke morphologische Veränderungen, dass keine Aussage über die Lokalisation von APP getroffen werden konnte.

Dagegen zeigte ein weiteres EP-Element (EP(2)2316, Abb. 22 F) eine Färbung für APP, die ähnliche Veränderungen in der Lokalisation wie die von dBeach1 induzierten wiedergab: Die Expression von EP(2)2316 führte auch zum Verlust des prominenten Signals an der Grenze zwischen den Zellen, allerdings entsprach die verbliebene Färbung dem wabenförmigen Muster des Wildtyps.

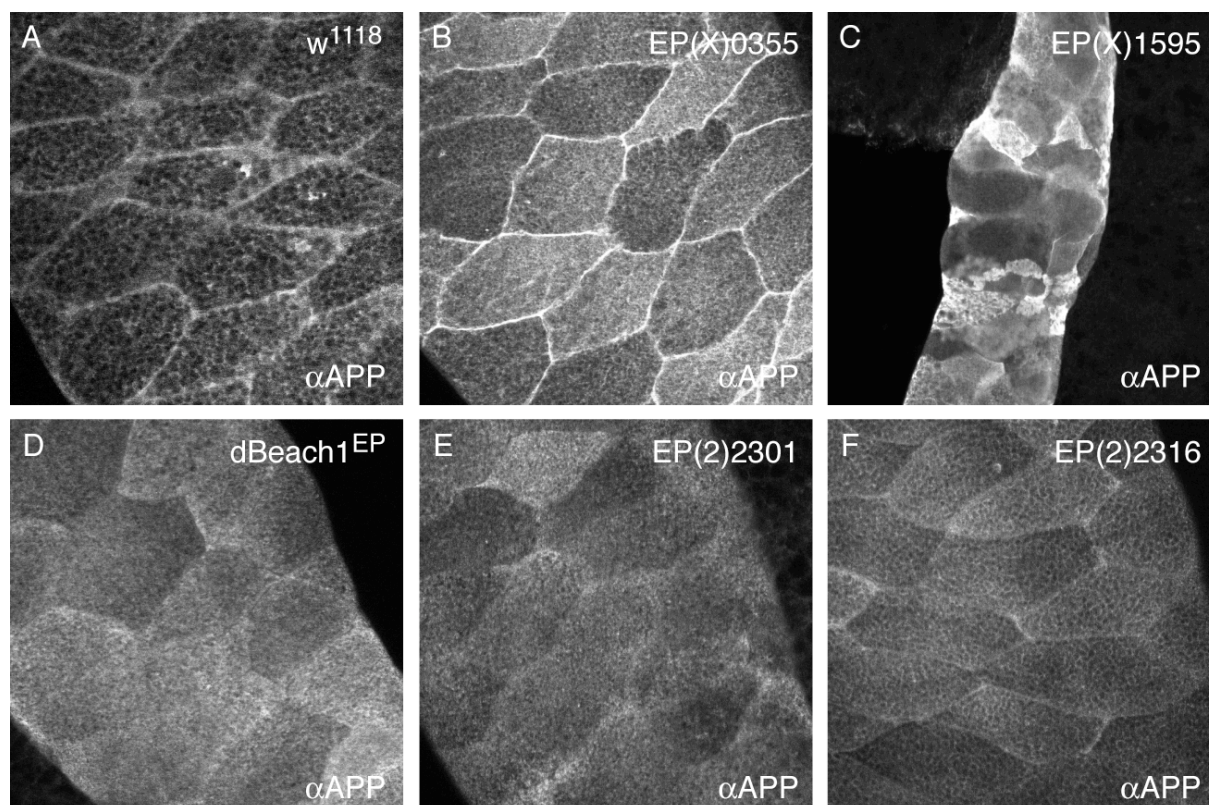


Abb. 22 Veränderung der APP-Lokalisierung durch die identifizierten Regulatoren der APP Prozessierung. APP wurde unter der Kontrolle von Gal4^{231.4} alleine oder zusammen mit verschiedenen EP-Elementen in den larvalen Speicheldrüsen exprimiert. Die Lokalisierung wurde durch eine Immunfärbung mit dem Antikörper 4G8 gegen die A β -Region sichtbar gemacht. Während die EP-Elemente EP(2)2301 und EP(2)2316 eine ähnliche Auswirkung wie dBeach1 auf die APP Lokalisierung haben, führt EP(X)0355 zu einer Verstärkung des APP Signals auf der Zelloberfläche. Einige der EP-Elemente (z.B. EP(X)1595) verursachten eine starke Veränderung der Speicheldrüsen-Morphologie, so dass keine Aussage über die APP Lokalisierung möglich war. Genotyp der Kreuzung: Gal4^{231.4}/+;UAS-APP/+ (bei X-chromosomalen EP-Elementen wurden nur weibliche Larven verwendet)

Die Coexpression von EP(X)0355 führt zu einem gegenteiligen Effekt auf die Lokalisation von APP: Die Färbung an den Zellgrenzen wird noch verstärkt und auch an der übrigen Oberfläche der Zelle scheint mehr APP vorhanden zu sein. Dies deutet daraufhin, dass dieses Protein die Internalisierung von APP verhindert und daher zu einer Akkumulation auf der Zelloberfläche führt.

Viele der neu identifizierten Regulatoren der APP-Prozessierung nehmen also Einfluss auf den intrazellulären Transport dieses Proteins. Dabei scheint vor allem die verstärkte Internalisierung und Lokalisation in endosomale Kompartimente eine Rolle zu spielen. Das Beispiel von EP(X)0355 zeigt jedoch auch, dass es noch andere Mechanismen zur Kontrolle der APP Prozessierung geben muss. Allerdings ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass Prozessierung und Lokalisation in unterschiedlichen Geweben untersucht wurden, und es daher nicht auszuschließen ist, dass entscheidende Kofaktoren in einem dieser Gewebe fehlen und dadurch unterschiedliche Ergebnisse zustande kommen.

2.1.3.5 Tlk/Hops und dBeach1 haben konträren Einfluss auf den APP Metabolismus

Die identifizierten Regulatoren der APP Prozessierung beeinflussen diese in verschiedener Weise: Einige führen zu einer erhöhten Menge an Volllängenprotein und CTF (z.B. EP(X)355), einige induzieren die Akkumulation der CTF bei gleichzeitiger Reduktion des Vorläufers (z.B. EP(2)2299) und andere sogar den kompletten Abbau von APP (EP(X)1408). Sind diese Prozesse alle von einander unabhängig oder beeinflussen sie sich gegenseitig? Diese Frage wurde für die beiden Proteine dBeach1 und Tlk/Hops durch gemeinsame Expression mit APP untersucht. Wie der entsprechende Western Blot zeigt (Abb. 23 A), induzieren die beiden EP-Elemente alleine die oben beschriebenen Effekte. Die gemeinsame Expression erzeugt jedoch einen intermediären Phänotyp: Die Menge an Protein voller Länge ist mit der Expression von dBeach1 alleine zu vergleichen, der degradierende Effekt von Tlk/Hops wird also verhindert oder ausgeglichen. Es akkumulieren allerdings deutlich weniger CTF, wenn neben dBeach1 auch Tlk überexprimiert wird. Scheinbar steuern die beiden Proteine APP in verschiedene metabolische Wege, die zu einem gegenteiligen Effekt auf die Prozessierung führen. Die gleichzeitige Expression von Rab7^{QL} und Tlk (Abb. 23 B) macht dabei deutlich, dass der Transport ins endosomale/lysosomale Kompartiment APP vor der Tlk/Hops-induzierten Degradation schützt.

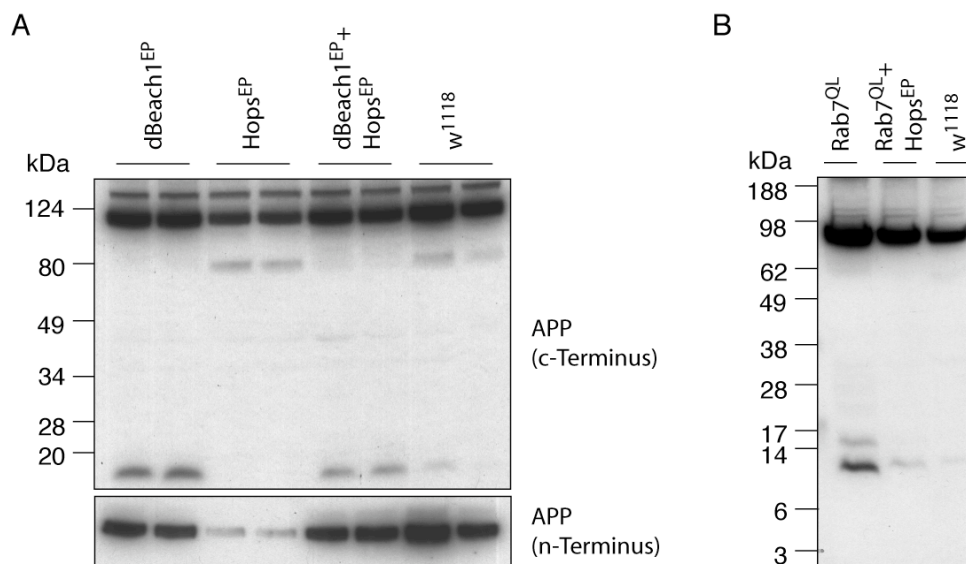


Abb. 23 dBeach und Hops haben gegensätzlichen Einfluss auf die APP-Prozessierung. A) Western Blot Analyse der APP-Prozessierung bei gleichzeitiger Überexpression von dBeach1, Hops oder beiden zusammen. Die Antikörpern CT13 und 22C11 wurden zur Detektion verwendet. Die gemeinsame Überexpression führt zur Stabilisierung des Protein voller Länge im Vergleich zur Expression von Hops alleine, aber die Akkumulation des CTF findet nur in geringerem Ausmaß als bei Expression von dBeach1 statt. B) Die APP Prozessierung bei Expression von Rab7^{QL}, Hops oder beiden zusammen wurde durch Western Blot Analyse mit α CT13 untersucht. Die Expression von Rab7^{QL} verhindert die Hops induzierte Degradation von APP. Aber auch der Einfluss von Rab7^{QL} auf APP wird durch die Expression von Hops abgeschwächt. Genotyp der Kreuzungen: dBeach1^{EP} - +;GMR-Gal4/EP(2)2299;UAS-APP/+ Hops^{EP} - EP(X)1408/+;GMR-Gal4/+;UAS-APP/+ dBeach1^{EP}+Hops^{EP} - EP(x)1408/+;GMR-Gal4/ EP(2)2299;UAS-APP/+ w¹¹¹⁸ - GMR-Gal4/+;UAS-APP/+ Rab7^{QL} - +;GMR-Gal4/UAS-Rab7^{QL};UAS-APP/+ Rab7^{QL}+Hops^{EP} EP(X)1408/+;GMR-Gal4/UAS-Rab7^{QL};UAS-APP/+

2.2 Räumliche und zeitliche Regulation der γ -Sekretase Aktivität

2.2.1 Prozessierung von APP und Notch in *Drosophila melanogaster*

2.2.1.1 γ -Sekretase vermittelte Prozessierung im adulten Auge von *Drosophila*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Drosophila melanogaster* ein geeigneter Modellorganismus ist, um den ersten Schritt der APP Prozessierung, die Freisetzung der extrazellulären Domäne, zu untersuchen. Auf Grund der geringen Stabilität konnte in den Western Blot Analysen die im zweiten Schritt von der γ -Sekretase freigesetzte A^{ICD} aber nicht detektiert werden. Zur Untersuchung der Regulation der γ -Sekretase wurde ein auf GFP basierendes *in-vivo* Reportersystem verwendet (Loewer 2001). Dieses System ermöglicht es, die Prozessierung von APP im Kontext eines Gewebes zu visualisieren.

Zu Beginn wurden verschiedene Fusionskonstrukte für APP und Notch erzeugt. Neben der neuronalen Form von APP mit 695 AS Länge (APP^{LV}) wurde ein verkürztes APP-Molekül, das dem β -Sekretase geschnittenen CTF entspricht (SPA4CT^{LV}, Lichtenthaler et al. 1999), mit der LexA DNA-bindenden und der VP16 transaktivierenden Domäne fusioniert (Abb. 24). Aufgrund der großen Ähnlichkeit in der Prozessierung wurden auch Fusionskonstrukte für Notch hergestellt: Neben dem vollständigen Rezeptor (Notch^{LV}) handelt es sich dabei um ein verkürztes Konstrukt (Notch ^{Δ EGF/LV}), das durch Deletion der EGF-Domänen nicht mehr in der Lage ist, die Liganden zu binden (Kidd et al. 1998) und um eine konstitutiv aktive Form (Notch^{S2 Δ CT/LV}). Erneut wurde wegen der leichten Zugänglichkeit das adulte Auge als erstes Gewebe untersucht. Die Expression von APP^{LV} in allen Zellen des Auges mit dem starken Gal4-Treiber

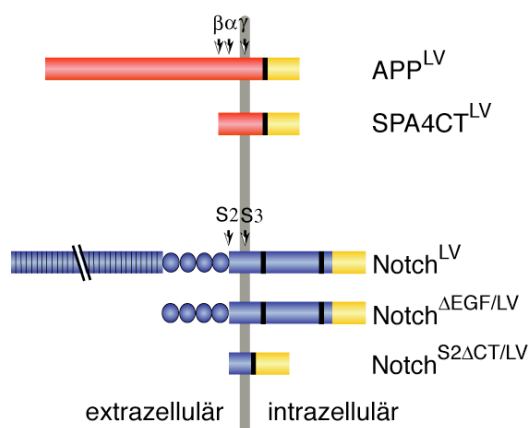


Abb. 24 Fusionskonstrukte für das *in-vivo* Reportersystem. Schematische Darstellung der Fusionskonstrukte von APP und Notch. Alle Konstrukte enthalten C-terminal eine Kernlokalisationssequenz (schwarzer Balken), die DNA-bindende Domäne des bakteriellen Proteins LexA und die transaktivierende Domäne des VP16-Proteins aus *Herpes simplex* (gelber Kasten). Für APP wurde die neuronale Variante mit 695 AS Länge (APP^{LV}) und eine verkürzte Form (SPA4CT^{LV}) verwendet, die eine vorhergehende Prozessierung an der β -Schnittstelle nachahmt. Notch^{LV} entspricht dem vollständigen Rezeptor, während Notch ^{Δ EGF/LV} durch Deletion der EGF-Domänen nicht mehr in der Lage ist, Liganden zu binden. Das an der S2-Schnittstelle beginnende Notch^{S2 Δ CT/LV} stellt dagegen eine konstitutiv aktive Form des Notch-Rezeptors dar, deren intrazelluläre Domäne deletiert wurde, um die Überaktivierung von Zielgenen zu vermeiden. Die EGF-Domänen des Notch-Rezeptors sind als schwarze Striche, die LNR-Domäne als Kreise symbolisiert.

GMR führte zu einem deutlich sichtbaren GFP-Signal, wodurch die Freisetzung der intrazellulären Domäne und damit die Prozessierung innerhalb der Transmembrandomäne gezeigt werden konnte (Abb. 25 A). Im Gegensatz dazu konnte nach Expression des Notch-Rezeptors keine Reporteraktivität detektiert werden (Abb. 25 B). Dies lässt darauf schließen, dass im adulten Auge keine Aktivierung dieses Signalweges mehr stattfindet. Dementsprechend wurde auch $N^{\text{AEGF/LV}}$, das als Negativkontrolle für das Reportersystem dient, nicht prozessiert (Abb. 25 C). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren genetischen Studien überein, in denen gezeigt wurde, dass Notch keine Funktion im adulten Auge hat (Shellenbarger et al. 1978). Erst die Expression der konstitutiv aktiven Variante $N^{\text{S2}\Delta\text{CT/LV}}$, die eine vorhergehende Prozessierung an der S2 Stelle simuliert und ein direktes Substrat für die γ -Sekretase darstellt, führte wie erwartet zu einem deutlichem GFP-Signal (Abb. 25 D).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass sich das *in-vivo* Reportersystem im adulten Auge wie erwartet verhält und, zumindest für die Prozessierung von Notch, spezifisch für die Liganden-aktivierte Freisetzung der intrazellulären Domäne ist. Um auch die Spezifität des Reportersystems für die γ -Sekretase vermittelte Prozessierung von APP zu beweisen, wurde ein RNAi-Ansatz in Kombination mit heterozygoten Mutationen gewählt. Die drei Komponenten des Reportersystems, der Gal4-Treiber, das Fusionskonstrukt und die Reportergene, wurden auf dem zweiten Chromosom vereinigt und mit Mutationen in den Genen *Presenilin (Psn)* oder *nicastrin (nct)* auf dem dritten Chromosom kombiniert. Diese Fliegen wurden wiederum zu einer Linie gekreuzt, die RNAi gegen Nicastrin erzeugt.

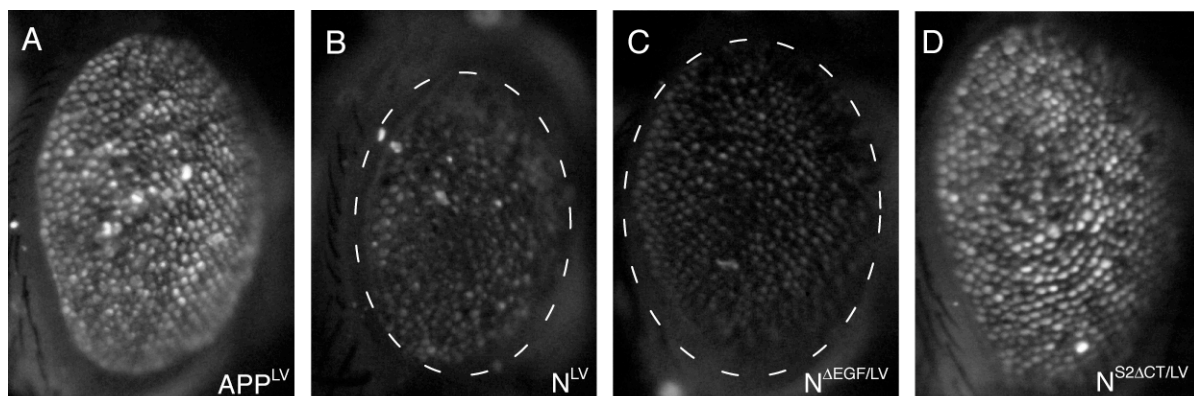


Abb. 25 A^{ICD} wird im adulten Auge freigesetzt. Die Fusionskonstrukte von APP und Notch wurden zusammen mit Reportergenen unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. A) APP^{LV} induziert ein deutliches GFP-Signal, dass die Freisetzung der intrazellulären Domäne visualisiert. B) Der Notch-Rezeptor wird im adulten Auge nicht aktiviert, so dass auch kein GFP detektiert werden kann. C) Die inaktive Form von Notch ($N^{\text{AEGF/LV}}$) wird wie erwartet nicht prozessiert, erst die konstitutiv aktive Form $N^{\text{S2}\Delta\text{CT/LV}}$ induziert eine starke Expression von GFP (D). Das GFP-Signal wurde durch entsprechenden Filter mit einer Farbkamera aufgenommen. Die Abbildungen entsprechen dem grünen Kanal. Genotyp der Kreuzungen: A) $2\text{xlexA-hrGFP}; \text{UAS-APP}^{\text{LV}}/\text{GMR-Gal4}$ B) $2\text{xlexA-hrGFP}/\text{UAS-N}^{\text{LV}}$ $\text{lexA-hrGFP}; \text{lexA-hrGFP}/\text{GMR-Gal4}$ C) $2\text{xlexA-hrGFP}; \text{UAS-N}^{\text{AEGF/LV}}/\text{GMR-Gal4}$ D) $2\text{xlexA-hrGFP}; 2\text{xUAS-N}^{\text{S2}\Delta\text{CT/LV}}/\text{GMR-Gal4}$

Vergleicht man das Signal des Reportersystems dieser Kreuzung mit dem direkt erzeugten Signal von APP^{LV}, erkennt man, dass die Prozessierung deutlich reduziert ist (Abb. 26 A und B). Da aber der rote Augenfarbstoff mit der Detektion der Fluoreszenz interferiert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Menge an Pigment, die durch das zusätzliche *white*-Gen des RNAi-Konstrukts erzeugt wird, für das verminderte Signal verantwortlich ist. Daher wurde GFP zusätzlich durch Western Blot Analyse in frisch geschlüpften und gealterten Fliegen quantifiziert (Abb. 26 C und D). Auch mit dieser Methode lässt sich eine deutliche Reduktion auf 40-70% der Kontrollmenge erkennen. Die hierbei erzielte Verminderung der γ -Sekretase Aktivität ließ sich aus mehreren Gründen nicht steigern: Einerseits wird die γ -Sekretase auf Grund ihrer zentralen Stellung im Notch-Signalweg während der Entwicklung benötigt, so dass Zellen ohne *Presenilin* oder *Nicastrin* nicht die hier untersuchten Gewebe

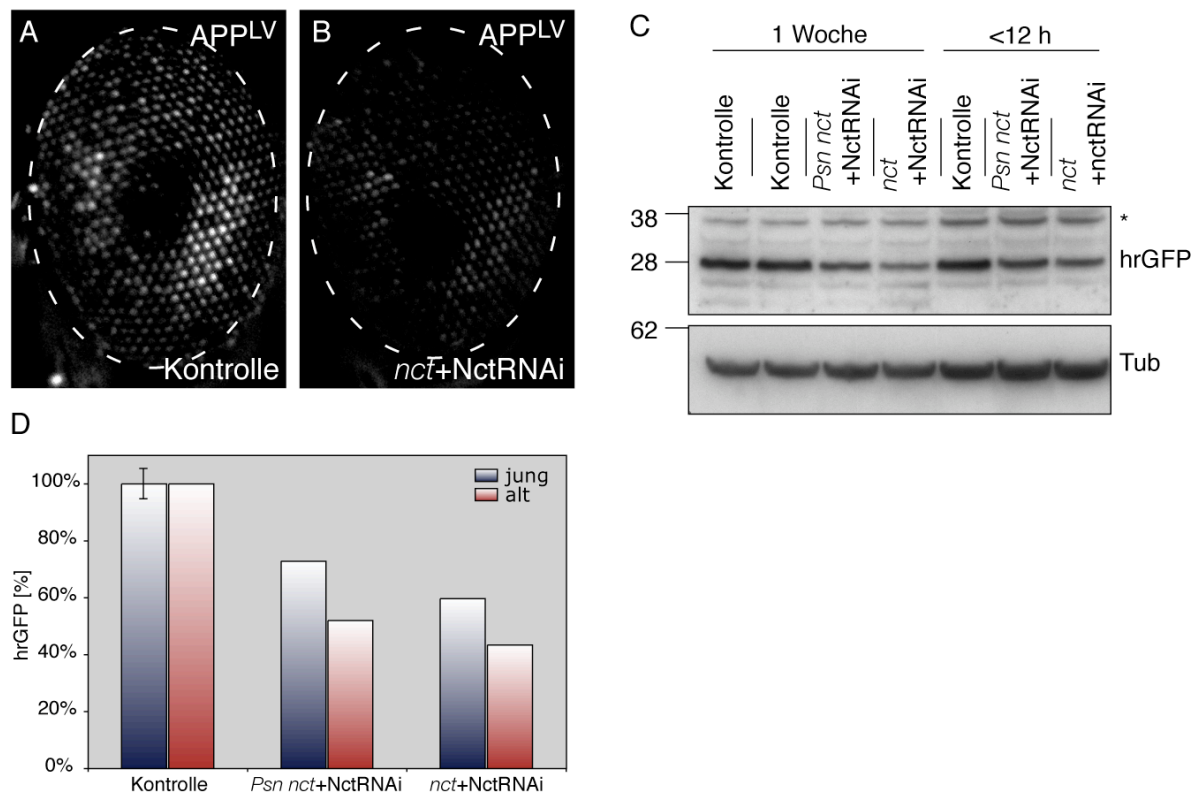


Abb. 26 Das Reportersystem visualisiert spezifisch γ -Sekretase vermittelte Prozessierung von APP. A) und B) Das von APP^{LV} im adulten Auge induzierte GFP-Signal wird durch eine heterozygote *Nicastrin*-Mutation und gleichzeitiger RNAi stark abgeschwächt. C) hrGFP wurde durch Western Blot aus Proteinextrakten adulter Köpfe analysiert. Die verwendeten Fliegen exprimierten das Reportersystem für APP^{LV} unter Kontrolle von GMR-Gal4 alleine oder zusammen mit Mutationen in *Presenilin* oder *Nicastrin* in Kombination mit *Nicastrin*-RNAi. Die Fliegen waren entweder frisch geschlüpft oder 1 Woche alt. Zur Detektion wurde der polyklonale hrGFP-Antikörper verwendet. Die Inkubation desselben Blot mit α Tubulin diente als Ladekontrolle. D) Die Signale des Western Blots wurden durch Densitometrie quantifiziert und auf die Tubulin-Menge normalisiert. Genotyp: Kontrolle - 2xlexA-hrGFP UAS-APP^{LV} GMR-Gal4/2xlexA-hrGFP;+ | *nct*+NctRNAi - 2xlexA-hrGFP UAS-APP^{LV} GMR-Gal4/2xlexA-hrGFP;nct^{R46}/GMR-NctRNAi | *Psn nct*+NctRNAi - 2xlexA-hrGFP UAS-APP^{LV} GMR-Gal4/2xlexA-hrGFP;ps^{C1} nct^{R46}/GMR-NctRNAi

bilden können. Andererseits wird die spätere Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität in adulten Geweben durch die hohe Stabilität des Proteasekomplexes, der eine Halbwertszeit von über 24h Stunden hat, erschwert (Ratovitski et al. 1997). Zusätzlich dazu muss noch die 48h betragende Halbwertszeit von GFP berücksichtigt werden (Li et al. 1998). Dieser zeitliche Aspekt wird gut im Vergleich der jungen und alten Fliegen in der Quantifizierung der GFP-Menge erkennbar (Abb. 26 C und D). Aus diesen Gründen beweist die gezeigte Reduktion der Reporteraktivität auf die Hälfte der Kontrollstärke die Spezifität des Reportersystems für die γ -Sekretase vermittelte Prozessierung von APP, obwohl kein vollständiger Verlust des GFP-Signals gezeigt werden konnte.

Mit dem Reportersystem lässt sich nun die Frage untersuchen, ob die gängigen Modelle der Prozessierung, die meist aus Studien in Zellkultur abgeleitet wurden, auch auf die Situation in einem komplexen Gewebe zutreffen oder ob Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen oder zwischen APP und Notch festzustellen sind. Die Struktur des Facettenauges erlaubt es jedoch nicht, diese Analyse im adulten Auge durchzuführen.

2.2.1.2 Die Prozessierung von APP in der larvalen Augenimaginalscheibe ist abhängig von dem γ -Secretase Komplex

Um mögliche Unterschiede in der Prozessierung von APP zwischen verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, wurde die sich entwickelnde Augenimaginalscheibe als Modell verwendet. Bereits während der Embryogenese werden die Zellen spezifiziert, die später die epidermalen Strukturen des Imago bilden. Während der larvalen Entwicklung liegen diese Zellen in einschichtigen Epithelien vor, den so genannten Imaginalscheiben. Am Ende des letzten larvalen Stadiums beginnt in der Augenimaginalscheibe die Musterbildung der zukünftigen Retina. Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Selektion der ersten Photorezeptorzelle (R8) jedes Ommatidiums in der morphogenetischen Furche (Abb. 27 A; (Wolff et al. 1993)). Die morphogenetische Furche bewegt sich vom posterioren Ende durch die Augenimaginalscheibe, wodurch in jeder Zellreihe die entsprechende erste Rezeptorzelle selektiert wird. Diese Gründerzelle rekrutiert dann benachbarte Zellen, die die weiteren Zelltypen des Ommatidiums bilden. (Abb. 27, apikale Ansicht). Die Selektion von R8 und die Determinierung der Zelltypen sind Signalprozesse, die von Notch abhängig sind (Frankfort et al. 2002), so dass sich dieses Gewebe gut zu untersuchen der Prozessierungsvorgänge eignen sollte.

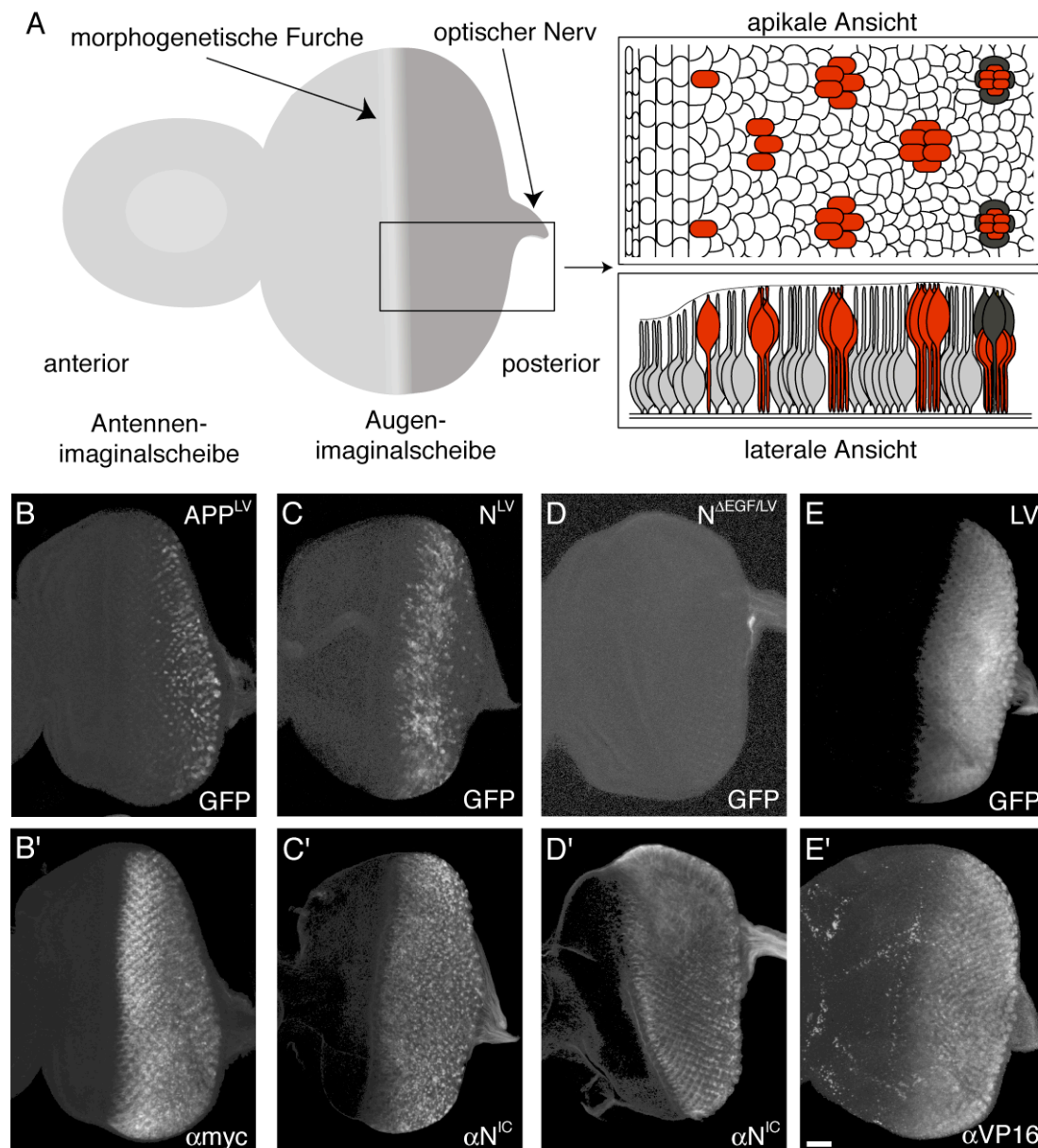


Abb. 27 APP und Notch Prozessierung in der larvalen Augenimaginalscheibe. A) Schematische Darstellung der larvalen Augenimaginalscheibe. Die morphogenetische Furche wandert vom posterioren zum anterioren Ende und induziert dabei die Musterbildung in der Imaginalscheibe. Der markierte Bereich ist in einer apikalen und lateralen Ansicht vergrößert gezeigt. Die differenzierenden Photorezeptoren sind rot markiert, während die undeterminierten Zellen grau/farblos sind. Die Musterbildung beginnt mit der Auswahl der ersten Rezeptorzelle R8 für jedes Ommatidium in der morphogenetischen Furche. Diese Zelle veranlasst danach benachbarte Zellen, sich zu den weiteren Photorezeptoren zu entwickeln. Nachdem alle acht Photorezeptoren bestimmt sind, werden weitere Zellen rekrutiert, um die Kegelzellen zu bilden (dunkelgrau). B) In der larvalen Augenimaginalscheibe wird APP nur in einigen Zellen am posterioren Ende prozessiert. C) Notch Prozessierung ist dagegen auf einen breiten Streifen posterior der morphogenetischen Furche beschränkt. D) Die Negativkontrolle $N^{\Delta EGF/LV}$ zeigt die Spezifität der Signale, während in der Positivkontrolle LV alle Zellen GFP aktivieren (E). Die gleichmäßige Expression aller Konstrukte wurde durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern überprüft (B'-E'). Genotyp der Kreuzungen: B) $2 \times \text{lexA-hrGFP}; \text{UAS-APP}^{LV}/\text{GMR-Gal4}$ C) $2 \times \text{lexA-hrGFP}; \text{UAS-N}^{LV} \text{lexA-hrGFP}; \text{lexA-hrGFP}/\text{GMR-Gal4}$ D) $2 \times \text{lexA-hrGFP}; \text{UAS-N}^{\Delta EGF/LV} / \text{GMR-Gal4}$ E) $2 \times \text{lexA-hrGFP}; \text{UAS-NLSLexAVP16}/\text{GMR-Gal4}$

Um die Prozessierung von APP und Notch in den verschiedenen Zelltypen der sich entwickelnden Retina zu visualisieren, wurden die entsprechenden Fusionskonstrukte mit

GMR-Gal4 in allen Zellen posterior der morphogenetischen Furche exprimiert. Die Expression von APP^{LV} führte zu einem deutlichen GFP-Signal (Abb. 27 B), das jedoch überraschenderweise auf Zellen am posterioren Ende der Imaginalscheibe beschränkt war, obwohl das Konstrukt selber in allen Zellen vorhanden war (Abb. 27 B'). Im Gegensatz dazu konnte Notch-Prozessierung in einem breiten Streifen in der Nähe der morphogenetischen Furche detektiert werden (Abb. 27 C). In den posterioren Zellen der Imaginalscheibe war dagegen kein Signal mehr nachzuweisen. Die Negativkontrolle N^{ΔEGF/LV} induzierte wie erwartet keine GFP Expression (Abb. 27 D). Durch die Expression der freien, nicht membranverankerten DNA-bindenden und transaktivierenden Fusionsdomäne LV konnte gezeigt werden, dass alle Zellen kompetent waren, das GFP Signal zu erzeugen (Abb. 27 E).

2.2.1.3 Effiziente APP Prozessierung ist auf Neurone beschränkt

Um das Muster der APP und Notch Prozessierung genauer zu untersuchen, wurden die Kerne neuronaler Zellen mit Antikörpern gegen das Protein ELAV und die Zellgrenzen aller Zellen durch Antikörper gegen α Spectrin mittels Immunfärbung hervorgehoben. Es wurden jeweils zwei optische Ebenen der Augenimaginalscheibe aufgenommen, so dass die unterschiedlichen Zelltypen besser analysiert werden konnten (siehe Schema in Abb. 28). Ebene 1 enthält dabei die Kerne und Somata der differenzierenden Neuronen, Ebene 2 dagegen die Zellkörper der noch undeterminierten Zellen. Das von APP^{LV} erzeugte GFP Signal wurde großteils in Ebene 1 detektiert, und überlappte mit dem neuronalen Marker ELAV (Abb. 28 A), während in den undifferenzierten Zellen kein GFP nachgewiesen werden konnte (Abb. 28 C). Einen weiteren Hinweis auf die verstärkte Prozessierung von APP in Neuronen gab die Ansammlung von GFP in den Axonen, die von den sich entwickelnden Neuronen in den optischen Lobus projizieren (Abb. 28 F). Zu Beginn der Differenzierung zeigten nicht alle ELAV-positiven Zellen ein GFP Signal, wohingegen der Reporter am posterioren Ende der Imaginalscheibe in mehr Zellen der Ommatidien aktiviert wurde (Abb. 28 G).

Die Prozessierung von Notch zeigte ein anderes Muster: GFP wurde nur in undifferenzierten Zellen an der basalen Seite des Epitheliums exprimiert, wobei keine Übereinstimmung mit dem ELAV Signal erkennbar war (Abb. 28 D). Dieses Muster reflektiert wahrscheinlich die Rolle von Notch während der Selektion der R8 Zellen durch laterale Inhibition in der morphogenetischen Furche (Frankfort et al. 2002). Während dieses Prozesses wird die Kompetenz, neuronale Zellen zu bilden, auf eine kleine Gruppe Zellen und anschließend auf eine einzelne R8 Zelle beschränkt.

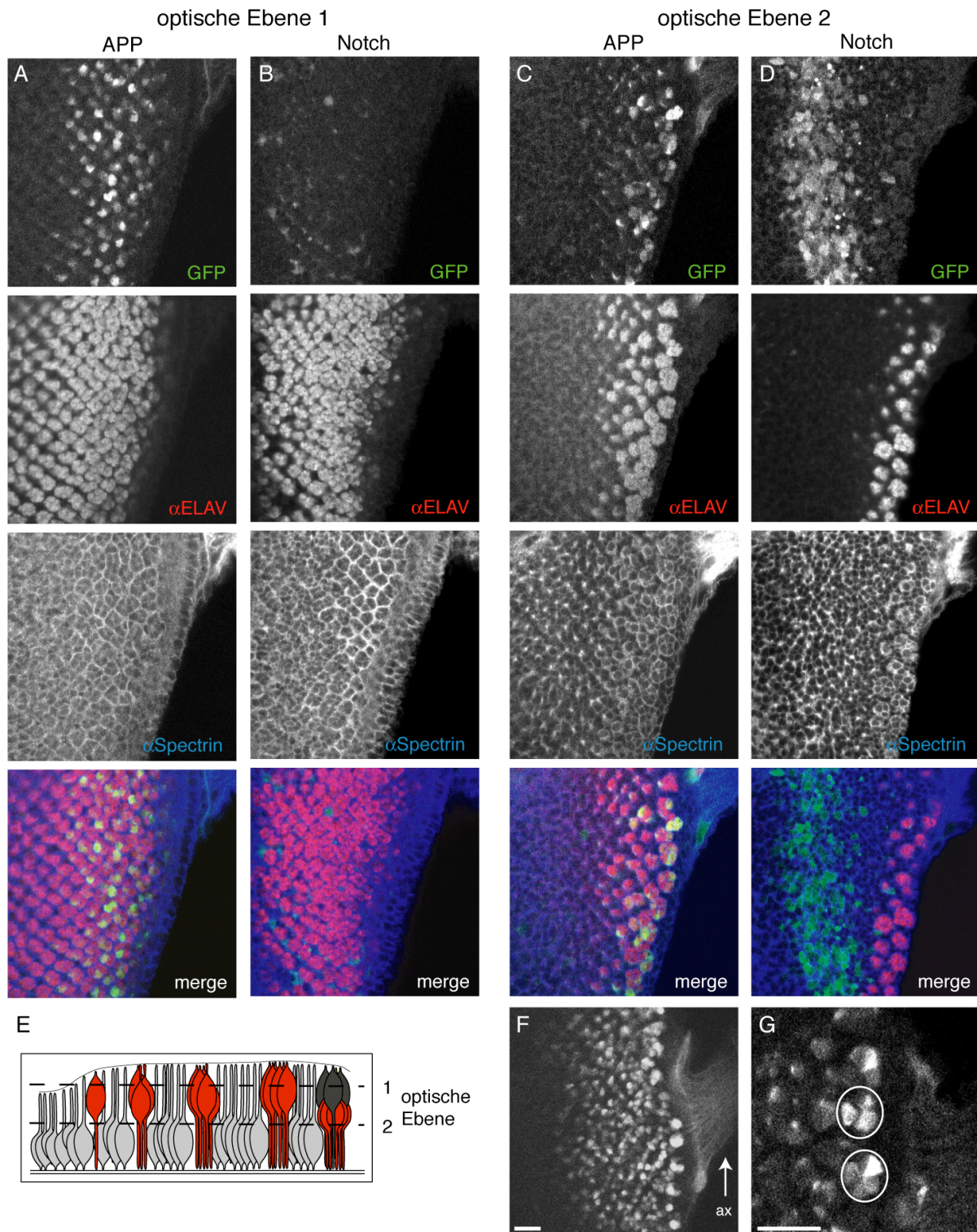


Abb. 28 Effiziente APP Prozessierung ist auf neuronale Zellen beschränkt. Das Reportersystem für APP und Notch wurde mit GMR-Gal4 in der Augenimaginalscheibe exprimiert. Die Zelltypen der Imaginalscheibe wurden durch Färbung des neuronalen Markers ELAV und mit α Spectrin hervorgehoben, welches die Zellgrenzen durch Färbung des kortikalen Aktinnetzwerkes erkennbar macht. A) und B) bzw. C) und D) geben zwei verschiedene optische Ebenen wider, die sich entwickelnde Photorezeptoren (Ebene 1) oder undifferenzierte Zellen (Ebene 2) enthalten (in E) schematisch dargestellt). Während das GFP-Signal für APP ausschließlich in ELAV-positiven Zellen in Ebene 1 auftritt, wird Notch in den undifferenzierten Zellen in Ebene 2 prozessiert. F) Das APP-induzierte GFP Signal kann auch in den Axonen der Photorezeptoren beobachtet werden. G) In weiter entwickelten Ommatidien wird APP in fast allen Photorezeptoren prozessiert. Genotyp der Kreuzungen: A) $2xlexA-hrGFP;UAS-APP^{LV}/GMR-Gal4$ B) $2xlexA-hrGFP/UAS-N^{LV}lexA-hrGFP;lexA-hrGFP/GMR-Gal4$

Diese Ergebnisse zeigen, dass deutliche Unterschiede zwischen der Prozessierung von APP und Notch bestehen. Notch Prozessierung, die von der Ligandenbindung und der anschließenden Aktivität der Protease Kuzbanian abhängig ist, ist auf die undeterminierten Zellen hinter der morphogenetischen Furche beschränkt. Obwohl dadurch gezeigt werden konnte, dass diese Zellen in der Lage sind, die γ -Sekretase vermittelte Freisetzung der N^{ICD} durchzuführen, kann keine Intramembranprozessierung von APP festgestellt werden. APP ist erst in den Neuronen ein gutes Substrat für den Presenilin-Komplex. Da bisher nur APP voller Länge verwendet wurde, stellt sich die Frage, ob diese Restriktion auf einem ähnlichen Liganden-abhängigen Mechanismus, einer veränderten α - oder einer veränderten γ -Sekretase Aktivität beruht.

2.2.1.4 Die Beschränkung der effizienten APP Prozessierung wird durch γ -Secretase Aktivität reguliert

Um die Frage zu beantworten, ob die Spaltung an der α - oder an der γ -Schnittstelle limitierend für die Prozessierung von APP in der Augenimaginalscheibe ist, wurden die Proteasen Kuzbanian und BACE zusammen mit APP^{LV} exprimiert. Wie vorher gezeigt, spalten beide Enzyme APP im adulten Auge und führen zu einer massiven Akkumulation von CTF (Abb. 7). Aber überraschenderweise veränderte sich das GFP Signal trotz der vermehrten Bildung von Substraten für den γ -Sekretase Komplex nicht (Abb. 29 A-C). Dies deutet daraufhin, dass nicht die α - oder β -Sekretase vermittelte Abspaltung der Ektodomäne die Freisetzung der intrazellulären Domäne beschränkt, sondern dass die Aktivität der γ -Sekretase der limitierende Schritt ist. Um die Notwendigkeit einer vorhergehenden Freisetzung der Ektodomäne bei der Untersuchung der Intramembranproteolyse zu umgehen, wurde das Konstrukt SPA4CT^{LV} verwendet, das einem von der β -Sekretase erzeugtem CTF entspricht (Abb. 24). In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dieses Konstrukt ein direktes Substrat für den Presenilin-Komplex darstellt, wodurch A β und die freie A^{ICD} erzeugt werden (Fossgreen et al. 1998; Lichtenthaler et al. 1999; Struhl et al. 2000). Aber auch mit diesem Konstrukt blieb die Aktivierung des GFP Reporters auf die neuronalen Zellen am posterioren Ende der Imaginalscheibe beschränkt (Abb. 29 D).

Obwohl zwei unterschiedliche Möglichkeiten verwendet wurden, direkte Substrate für die γ -Sekretase zu erzeugen, veränderte sich die von dem *in-vivo* Reportersystem visualisierte APP Prozessierung nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des Presenilin Komplexes moduliert wird und daher die effiziente Prozessierung von APP in der Augenimaginalscheibe auf Neurone beschränkt ist.

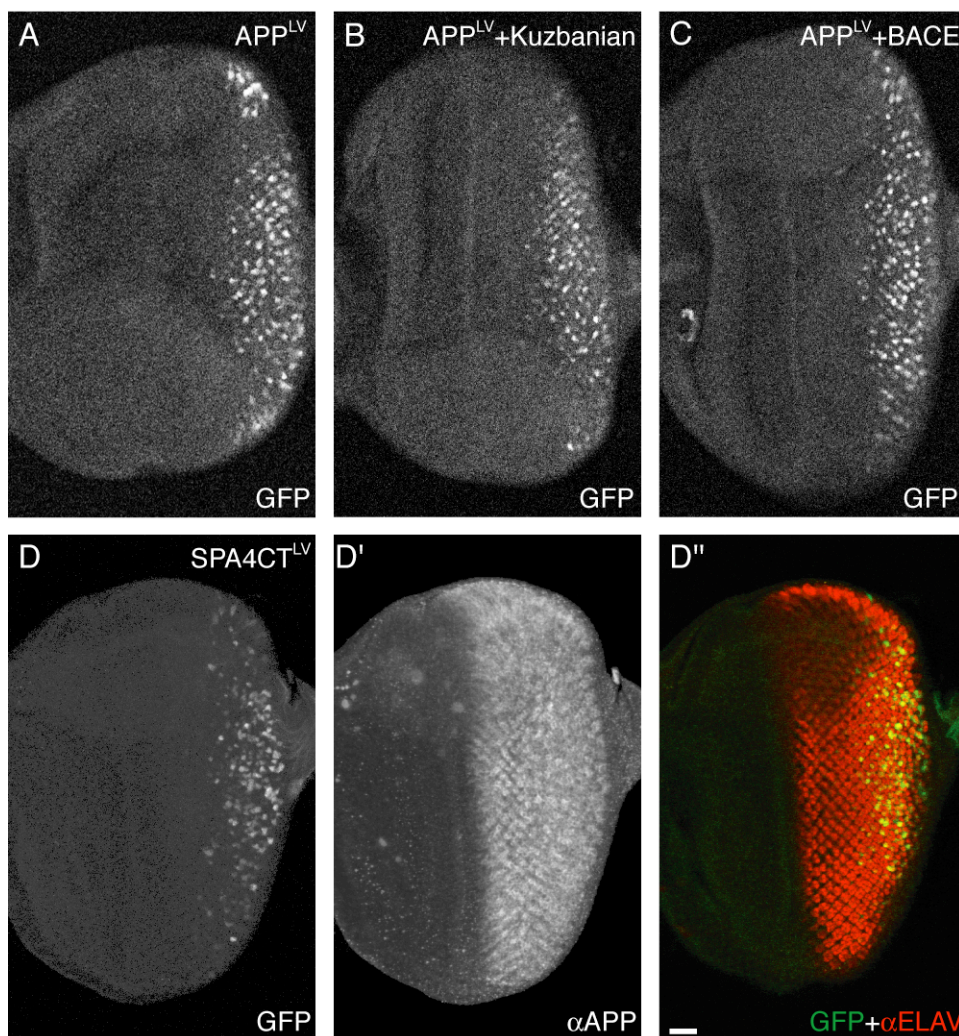


Abb. 29 γ -Sekretase-Aktivität ist limitierend für die Prozessierung von APP. A)–C) Das Reportersystem für APP wurde alleine oder zusammen mit den Proteasen Kuzbanian oder BACE unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. Es konnten jedoch keine Veränderungen des GFP-Signals erkannt werden. D) Das Konstrukt SPA4CT^{LV} hebt die Notwendigkeit einer extrazellulären Prozessierung auf, da es erst an der β -Schnittstelle beginnt. Obwohl es gleichmäßig exprimiert wird (Immunfärbung mit dem Antikörper 4G8, D'), wird die intrazelluläre Domäne nur in einigen Zellen am posterioren Ende der Imaginalscheibe freigesetzt, die alle positiv für den neuronalen Marker ELAV sind (Immunfärbung mit α ELAV, D''). Genotyp der Kreuzungen: A) 2xlexA-hrGFP/+;UAS-APP^{LV} GMR-Gal4/+ B) 2xlexA-hrGFP/+;UAS-APP^{LV} GMR-Gal4/UAS-Kuzbanian C) 2xlexA-hrGFP/UAS-BACE;UAS-APP^{LV} GMR-Gal4/+ D) 2xlexA-hrGFP;UAS-SPA4CT^{LV}/GMR-Gal4

2.2.1.5 Auch in der Flügelimaginalscheibe ist die Prozessierung durch γ -Secretase reguliert

Um die in der Augenimaginalscheibe erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Fusionskonstrukte auch in der Flügelimaginalscheibe mit dem Treiber *apterous*-Gal4 exprimiert. Diese Gal4-Linie ist in der dorsalen Hälfte der Imaginalscheibe aktiv (Abb. 30 A). Durch Western Blot konnte gezeigt werden, dass APP auch in diesem Gewebe von einer endogenen Protease gespalten wird und CTF entstehen (Abb. 30 B). Allerdings scheint diese Prozessierung weniger effizient zu sein, da das Verhältnis zwischen CTF und Protein voller Länge kleiner ist als in den Proteinextrakten von adulten Köpfen (Abb. 7). Wenn nun die Fusionskonstrukte APP^{LV} (nicht gezeigt) oder SPA4CT^{LV} im Flügel exprimiert wurden,

konnte keine Prozessierung detektiert werden (Abb. 30 C), obwohl das Fusionsprotein selber vorhanden war (Abb. 30 C'). Dagegen führte die Expression von N^{LV} zur Aktivierung von GFP in Zellen der sich entwickelnden Flügelephelien (Abb. 30 D). In diesen Zellen wird durch den Notch-Signalweg Proliferation und damit das Wachstum der Flügelgröße angeregt (Baonza et al. 2000). Dies zeigte, dass auch in der Flügelimaginalscheibe die Zellen in der Lage sind, regulierter Intramembranproteolyse durchzuführen. Die Negativkontrolle $N^{ΔEGF/LV}$ induzierte wiederum keine GFP Expression (Abb. 30 E).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Voraussetzung für die effiziente Freisetzung von A^{ICD} und N^{ICD} unterschiedlich sind und dass die Effizienz der Spaltung von APP durch γ -Sekretase zwischen verschiedenen Zelltypen variiert.

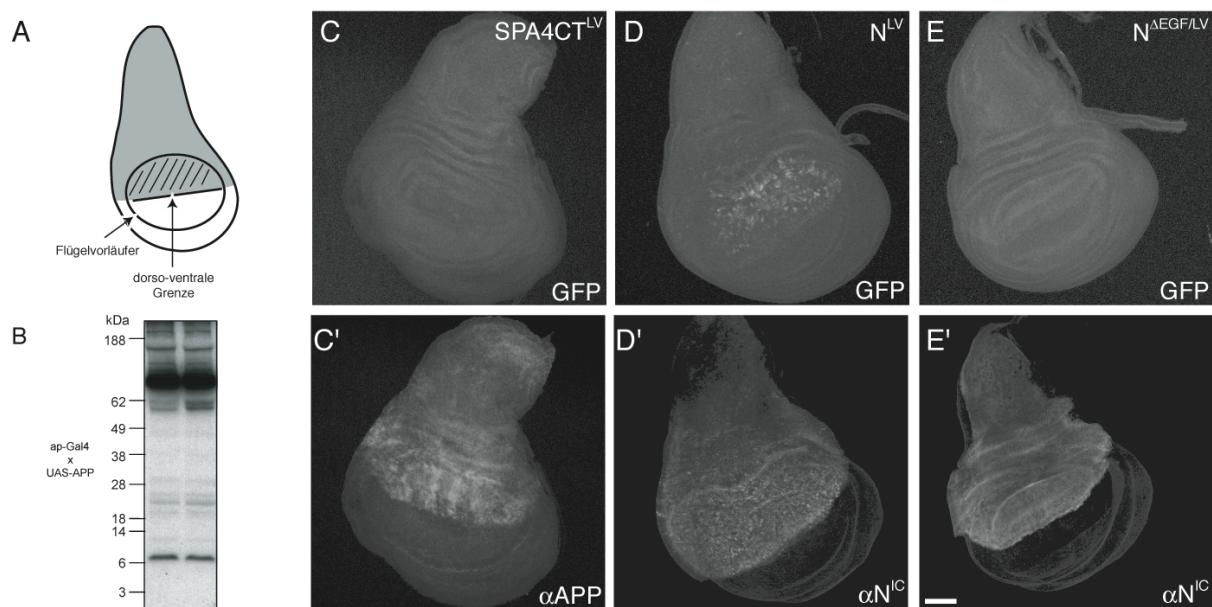


Abb. 30 Prozessierung von APP und Notch in der Flügelimaginalscheibe. A) Schematische Darstellung der Flügelimaginalscheibe. Die dorso-ventrale Grenze und der Bereich der späteren Flügelephelien sind eingezeichnet. Die dunkelgraue Fläche repräsentiert den dorsalen Teil der Imaginalscheibe, in dem der Gal4-Treiber *apterous* (*ap*) aktiv ist. B) Western Blot – Analyse der APP Prozessierung in der Flügelimaginalscheibe. Die Imaginalscheiben von 15 Larven wurden präpariert und die Proteinextrakte durch Elektrophorese aufgetrennt. APP wurde mit dem Antikörper CT13 detektiert. Auch in der Flügelimaginalscheibe findet Prozessierung durch eine endogenen Sekretase statt, jedoch weniger effizient als in adulten Köpfen, da das Verhältnis von CTF zum Protein voller Länge geringer ist. C) Das Reportersystem zeigt keine Prozessierung von $SPA4CT^{LV}$ in diesem Gewebe, obwohl das Konstrukt gut exprimiert wird (Immunfärbung mit dem Antikörper 4G8, C'). D) Notch-Prozessierung kann dagegen in den Zellen der zukünftigen Flügelephelien detektiert werden. E) $N^{\Delta EGF/LV}$ aktiviert keine Expression des Reportergens. Die Expression beider Notch-Konstrukte wurde durch Immunfärbung mit αN^{IC} -Antikörpern visualisiert. Genotyp der Kreuzungen: C) $2 \times \text{lexA-hrGFP}/\text{ap-Gal4}; \text{UAS-SPA4CT}^{LV}/+$ D) $\text{lexA-hrGFP UAS-N}^{LV}/\text{ap-Gal4}; \text{lexA-hrGFP}/+$ E) $2 \times \text{lexA-hrGFP}/\text{ap-Gal4}; \text{UAS-N}^{\Delta EGF/LV}/+$

2.2.2 Analyse der charakteristischen Eigenschaften von γ -Sekretase Substraten

2.2.2.1 APLP2 und APPL werden in *Drosophila* prozessiert und die intrazellulären Domänen freigesetzt

Mit den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der γ -Sekretase vermittelten APP Prozessierung zelltyp-spezifisch variiert. Daraus ergibt sich die Frage, ob dies eine exklusive Eigenschaft von APP ist oder ob dies auch auf andere Substrate des Presenilin-Komplexes zutrifft. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Proteinen identifiziert, die der RIP unterliegen, unter anderem die Paraloge von APP in Säugetieren, APLP1 und APLP2 (Scheinfeld et al. 2002; Walsh et al. 2003; Eggert et al. 2004). Auch das *Drosophila* Homolog APPL wird während des normalen Zellmetabolismus prozessiert (Luo et al. 1990). Daher lag es nahe, die genauen Substratvoraussetzung der γ -Secretase anhand von Unterschieden und Gemeinsamkeiten der Prozessierung dieser Proteine zu untersuchen.

Da auch für APLP2 und APPL die vorherige Sekretion der Ektodomäne notwendig ist, um die Freisetzung der intrazellulären Domäne zu ermöglichen, wurde zuerst die Prozessierung im adulten Auge von *Drosophila* analysiert. Dies zeigte, dass sowohl APLP2 als auch APPL in diesem Gewebe von einer Protease extrazellulär geschnitten wird (Abb. 31). Dabei entstehen für APLP2 neben der starken Hauptbande noch zahlreiche weitere CTF unterschiedlicher Größe, die aber nur bei längeren Belichtungen sichtbar sind (Abb. 31 A). Bei Überexpression der Protease Kuzbanian ergibt sich im Gegensatz zu APP keine Anreicherung des prominenten CTF, allerdings kann eine verstärkte Prozessierung an einer Stelle weiter N-terminal detektiert werden, wodurch ein etwas größeres CTF akkumuliert. BACE hingegen erkennt APLP2 als gutes Substrat und führt zu einer deutlich erhöhten Sekretion der Ektodomäne und zur Akkumulation des CTF der entsprechenden Größe (Abb. 31 A).

Die Prozessierung von APPL im adulten Auge führt zur Entstehung eines distinkten CTF, das größer als die CTF von APP und APLP2 ist (Abb. 31 B). Überraschenderweise erkennt Kuzbanian APPL nicht als Substrat, wohingegen BACE zwar schneidet, aber im Gegensatz zu den anderen beiden Proteinen der APP-Familie zu einem kleineren CTF als die endogene Protease führt (Abb. 31 B). Da dieses CTF die selbe Größe hat wie bei APP, muss die Schnittstelle des endogenen CTF N-terminal der β -Schnittstelle liegen. Dies deutet daraufhin, dass APPL von einer anderen endogenen Protease als APP und APLP2 prozessiert wird.

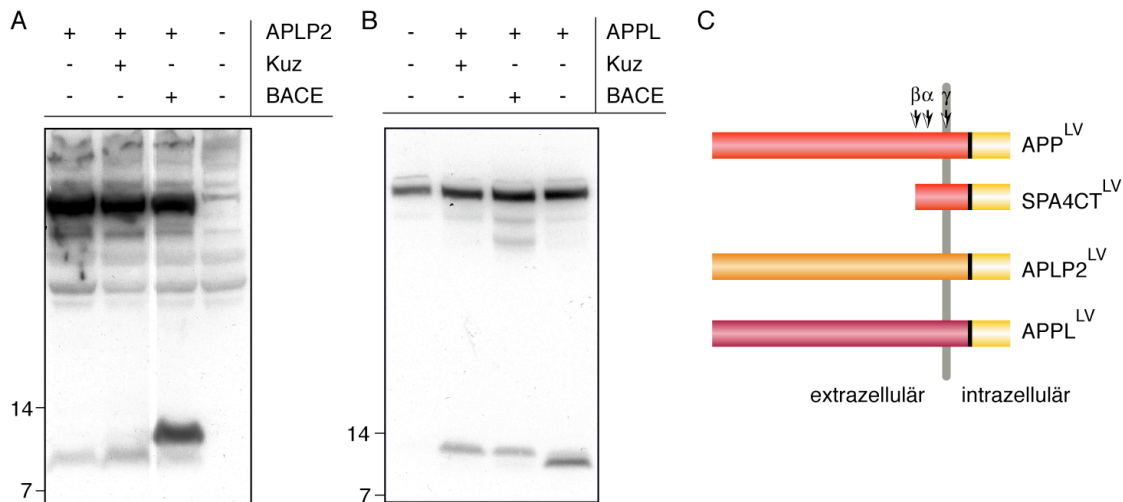


Abb. 31 Erweiterung des Reportersystems auf APLP2 und APPL. A) Die Prozessierung von APLP2 wurde durch Western Blot mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne (CT12) analysiert. Eine endogene Sekretase prozessiert APLP2, so dass CTF entstehen. Kuzbanian führt nicht zu einer Anreicherung des prominenten CTF, aber bei längerer Exposition kann die Akkumulation eines größeren CTF erkannt werden. BACE dagegen schneidet APLP2 sehr effizient. B) Western Blot Analyse der APPL Prozessierung. Der verwendete C-terminale Antikörper erkennt auch das endogene Protein, dessen CTF aber erst bei längerer Exposition sichtbar wird. Überexpression von APPL führt zur stärkeren Akkumulation dieses Fragments. APPL wird nicht von Kuzbanian als Substrat erkannt, aber von transgenem BACE prozessiert. Das dabei entstehende CTF ist kleiner als das von der endogenen Sekretase erzeugte. C) Zur Untersuchung der γ -Sekretase vermittelten Intramembranproteolyse wurden auch für APLP2 und APPL Fusionskonstrukte der vollständigen cDNA mit der DNA-bindenden Domäne von LexA und der transaktivierenden Domäne von VP16 erzeugt. Genotyp der Kreuzungen APLP2 - GMR-Gal4/+;UAS-APLP2/+ | APLP2+Kuz - GMR-Gal4/+;UAS-APLP2/UAS-Kuz | APLP2+BACE - GMR-Gal4/+;UAS-APLP2/UAS-BACE | APPL - GMR-Gal4/+;UAS-APPL/+ | APPL+Kuz - GMR-Gal4/+;UAS-APPL/UAS-Kuz | APPL+BACE - GMR-Gal4/+;UAS-APPL/UAS-BACE

Zur Analyse der γ -Sekretase vermittelten Prozessierung wurden auch von APLP2 und APPL Fusionskonstrukte mit der LexA DNA-bindenden und der VP16 transaktivierenden Domäne erzeugt (Abb. 31 C). Die Expression dieser Konstrukte in allen Zellen des adulten Auges zeigte ein GFP Signal und somit die Freisetzung der intrazellulären Domäne (Abb. 32 A und C). Die Stärke des GFP-Signals war dabei für APLP2 jedoch deutlich höher als für APPL. In den sich entwickelnden Augenimaginalscheiben ähnelte das Muster der APLP2-Prozessierung dem von APP (Abb. 32 B): Das GFP Signal wird nicht gleichmäßig in allen Zellen, die das Fusionskonstrukt exprimieren, erzeugt, sondern nur in einigen Zellen, vor allem am posterioren Ende der Imaginalscheibe. APPL scheint in diesem Gewebe im Vergleich nur schwach prozessiert zu werden, da nur in vereinzelt Zellen GFP detektiert wurde (Abb. 32 D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch APLP2 und APPL im Auge von *Drosophila* in einem bestimmten Muster prozessiert werden. Aber ist diese Prozessierung wie bei APP auf bestimmte Zelltypen beschränkt?

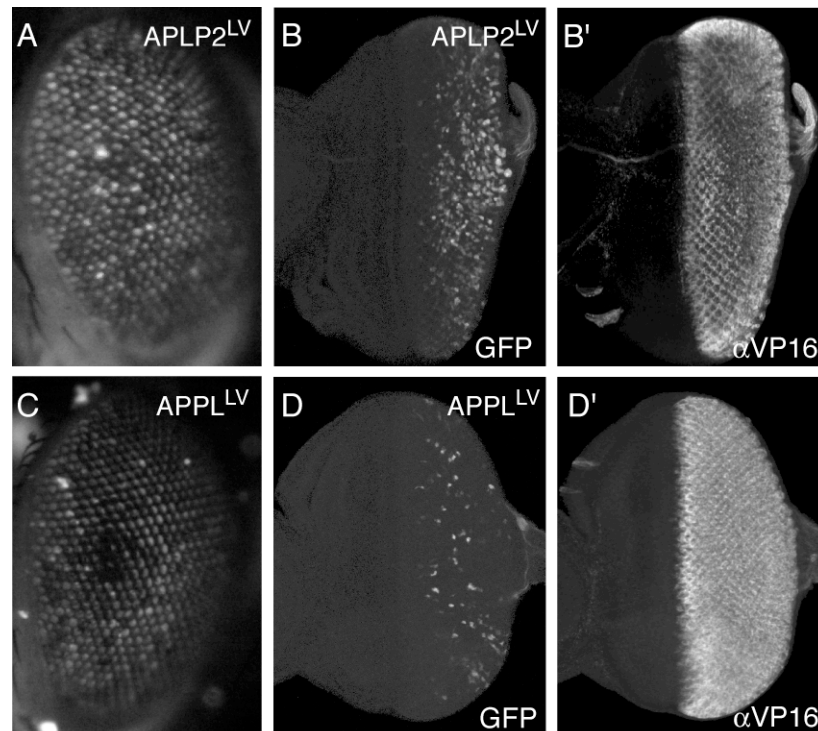


Abb. 32 Prozessierung von APLP2 und APPL im Auge von *Drosophila*. Die Fusionskonstrukte von APLP2 und APPL wurden zusammen mit GFP-Reportern unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. Im adulten Auge wird sowohl von APLP2^{LV} (A), als auch von APPL^{LV} (C) ein GFP-Signal erzeugt, wobei APLP2 den Reporter deutlich stärker aktiviert. B) In der larvalen Imaginalscheibe wird APLP2^{LV} nur in einigen Zellen effizient geschnitten, obwohl das Konstrukt gleichmäßig exprimiert wird. D) APPL^{LV} scheint in diesem Gewebe ein schlechtes Substrat für RIP zu sein, da nur in wenigen verstreuten Zellen GFP detektiert werden kann. B') und D') Die Expression wurde durch Immunfärbung mit Antikörpern gegen VP16 kontrolliert. Genotyp der Kreuzungen: A)+B) 2xlexA-hrGFP;UAS-APLP2^{LV}/GMR-Gal4 C)+D) 2xlexA-hrGFP;UAS-APPL^{LV}/GMR-Gal4

2.2.2.2 Auch APLP2 und APPL werden nur in bestimmten Zellen prozessiert

Zur genaueren Analyse des Prozessierungsmusters von APLP2 und APPL wurden wiederum Färbungen mit Antikörpern gegen ELAV zur Visualisierung der Neuronen und gegen Spektrin zur Darstellung der Zellgrenzen durchgeführt. Dabei wurden zwei optische Ebenen aufgenommen, die die differenzierenden Photorezeptoren (Ebene 1) oder die undeterminierten Zellen (Ebene 2) enthalten. Das GFP Signal, das durch die Prozessierung von APLP2 erzeugt wird, ist ähnlich wie bei APP großteils in den neuronalen Zellen lokalisiert (Abb. 33 A). Allerdings lassen sich auch einige Zellen in Ebene 2 detektieren, die GFP exprimieren, aber ELAV negativ sind (Abb. 33 B). Die Effizienz der APLP2-Prozessierung scheint also in den Photorezeptoren erhöht zu sein, obwohl auch einige undeterminierte Zellen genügend Aktivität haben, um den Reporter zu aktivieren. Die Interpretation dieser Ergebnisse wird allerdings durch den deutlichen Phänotyp, den die Expression von APLP2^{LV} erzeugt, erschwert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in Ebene 2 detektierten Zellen Photorezeptoren waren, aber auf Grund von Veränderungen der Genexpression, die durch das Fusionskonstrukt ausgelöst wurden, ihre Identität verloren oder verändert haben. Da sie vor-

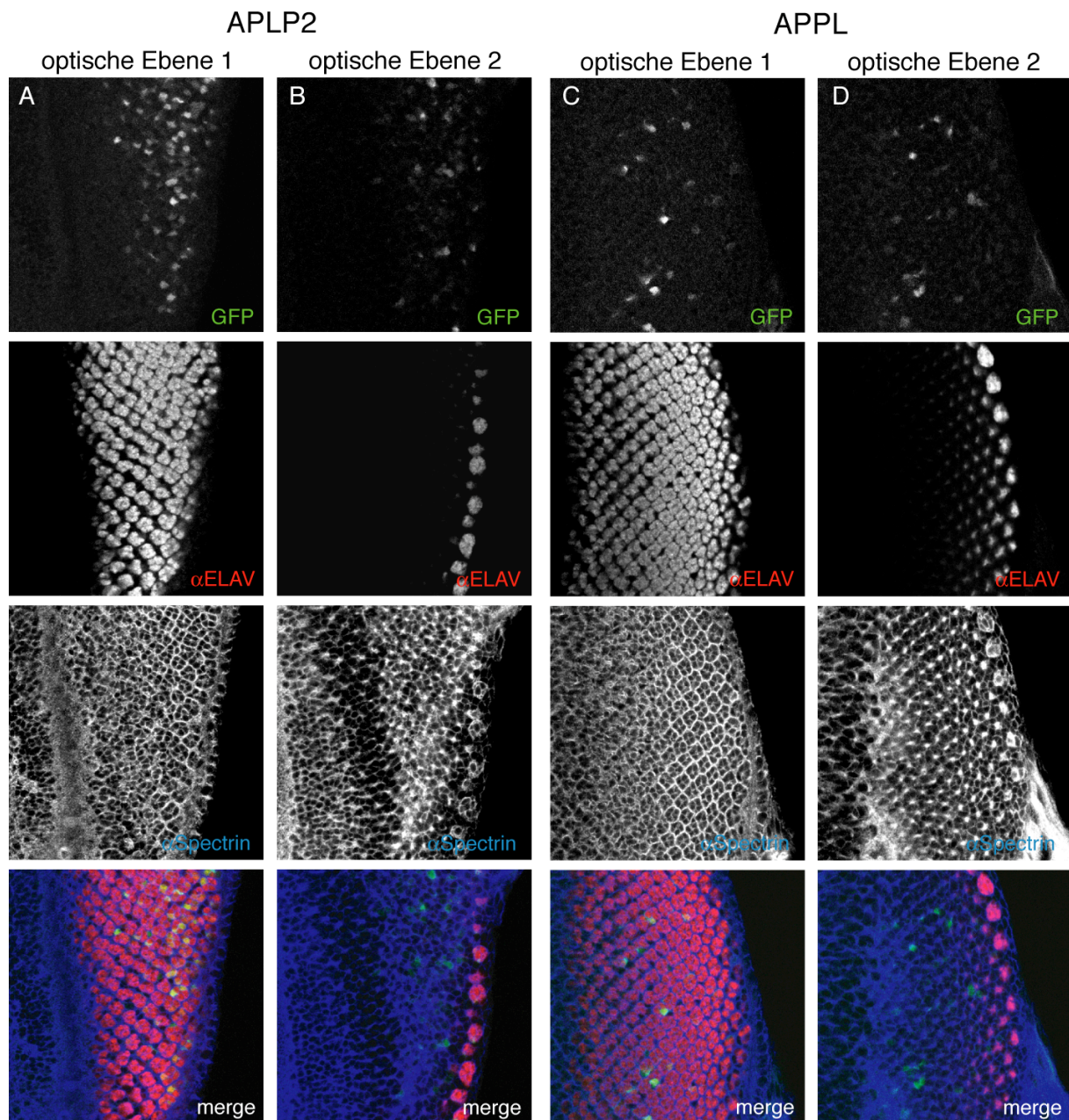


Abb. 33 Zelltyp-Spezifität der APLP2 und APPL Prozessierung. Das Reportersystem für APLP2 und APPL wurde mit GMR-Gal4 in der Augenimaginalscheibe exprimiert. Die Zelltypen der Imaginalscheibe wurden durch Färbung mit α ELAV und α Spectrin hervorgehoben. Es sind jeweils zwei optische Ebenen gezeigt, die neuronale Zellen (Ebene 1, A) und C)) oder undifferenzierte Zellen (Ebene 2, B) und D)) enthalten. Das GFP-Signal, das die Prozessierung von APLP2 repräsentiert, war vor allem in Ebene 1 zu erkennen und überlappte mit dem neuronalen Marker. Es waren jedoch auch einige undifferenzierte Zellen positiv für GFP. Die vereinzelt Zellen mit effizienter APPL-Prozessierung befanden sich in beiden Ebenen, so dass keine klare Aussage über deren Identität getroffen werden konnte. Genotyp der Kreuzungen: A)+B) 2xlexA-hrGFP;UAS-APLP2^{L^V}/GMR-Gal4 C)+D) 2xlexA-hrGFP;UAS-APPL^{L^V}/GMR-Gal4

her die Prozessierung durchführen konnten, wäre GFP wegen der Stabilität des Proteins noch detektierbar, obwohl keine neuronalen Proteine mehr exprimiert würden.

Die schwache APPL-Prozessierung scheint nicht auf einen Zelltyp beschränkt zu sein. Die verstreuten Zellen, die GFP-Aktivierung zeigten, waren in beiden optischen Ebenen sowohl in ELAV positiven als auch negativen Zellen zu detektieren (Abb. 33 C+D). Da der von APPL^{L^V}

erzeugte Phänotyp sehr schwach ist, kann hier eine Veränderung des Zellschicksals als Erklärung ausgeschlossen werden. Es entsteht der Eindruck, dass APPL in allen Zellen der Augenimaginalscheibe ein schlechtes Substrat für RIP ist, so dass nur einige Zellen zufällig das Reportersystem aktivieren können.

Zusammengenommen zeigen die Experimente mit dem Reportersystem, dass die drei untersuchten Mitglieder der APP-Proteinfamilie in Geweben von *Drosophila* in unterschiedlichen Mustern prozessiert werden. Da für APLP2 und APPL bisher allerdings nur das vollständige Protein untersucht wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welcher proteolytische Schritt reguliert ist.

2.2.2.3 Die von BACE generierten CTF der APP-Familie sind unterschiedliche Substrate für die γ -Secretase

Eine Möglichkeit, den limitierenden Schritt in der Prozessierung der APP-Proteinfamilie einzugrenzen, ist die gleichzeitige Überexpression von Proteasen mit α - oder β -Sekretase-Aktivität. Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass Kuzbanian zwar APP schneidet, APLP2 und APPL aber nur schlecht als Substrat erkennt (Abb. 7 und Abb. 31). Dementsprechend führte die Überexpression dieser Protease auch zu keiner Veränderung im Prozessierungsmuster (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu erkennt BACE alle drei Proteine gut als Substrate und führt zur Akkumulation von CTF und damit potentiellen Substraten für die γ -Sekretase. Wie bereits gezeigt, führt dies für APP zur keiner verstärkten Freisetzung der intrazellulären Domäne (Abb. 34 A und A'). Überraschenderweise erhöht sich aber für APLP2 das visualisierte GFP-Signal durch die begleitende Expression von BACE dramatisch (Abb. 34 B und B'). Zusätzlich zur der Verstärkung des Signals ändert sich auch das Muster der GFP positiven Zellen. Während das Signal bei APLP2 alleine großteils in den Photorezeptoren lokalisiert war (Abb. 33 A und Abb. 34 B), zeigen nun Zellen in beiden Ebenen der Imaginalscheibe effiziente Freisetzung der intrazellulären Domäne (Abb. 34 E und F). Es scheint sogar, dass die differenzierenden Neurone nun im Vergleich schwächere Prozessierung zeigen und das GFP-Signal daher kaum in den ELAV positiven Zellen zu detektieren ist.

Dies verdeutlicht, dass im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen für APP während der APLP2-Prozessierung der erste Schnitt, der zur Freisetzung der Ektodomäne führt, limitierend ist. Die Prozessierung innerhalb der Membran von APPL im Auge wird dagegen nicht von der vorherigen extrazellulären Prozessierung beschränkt. Obwohl auch bei APPL BACE zur Akkumulation von CTF führt, verändert sich das visualisierte Prozessierungsmuster in der

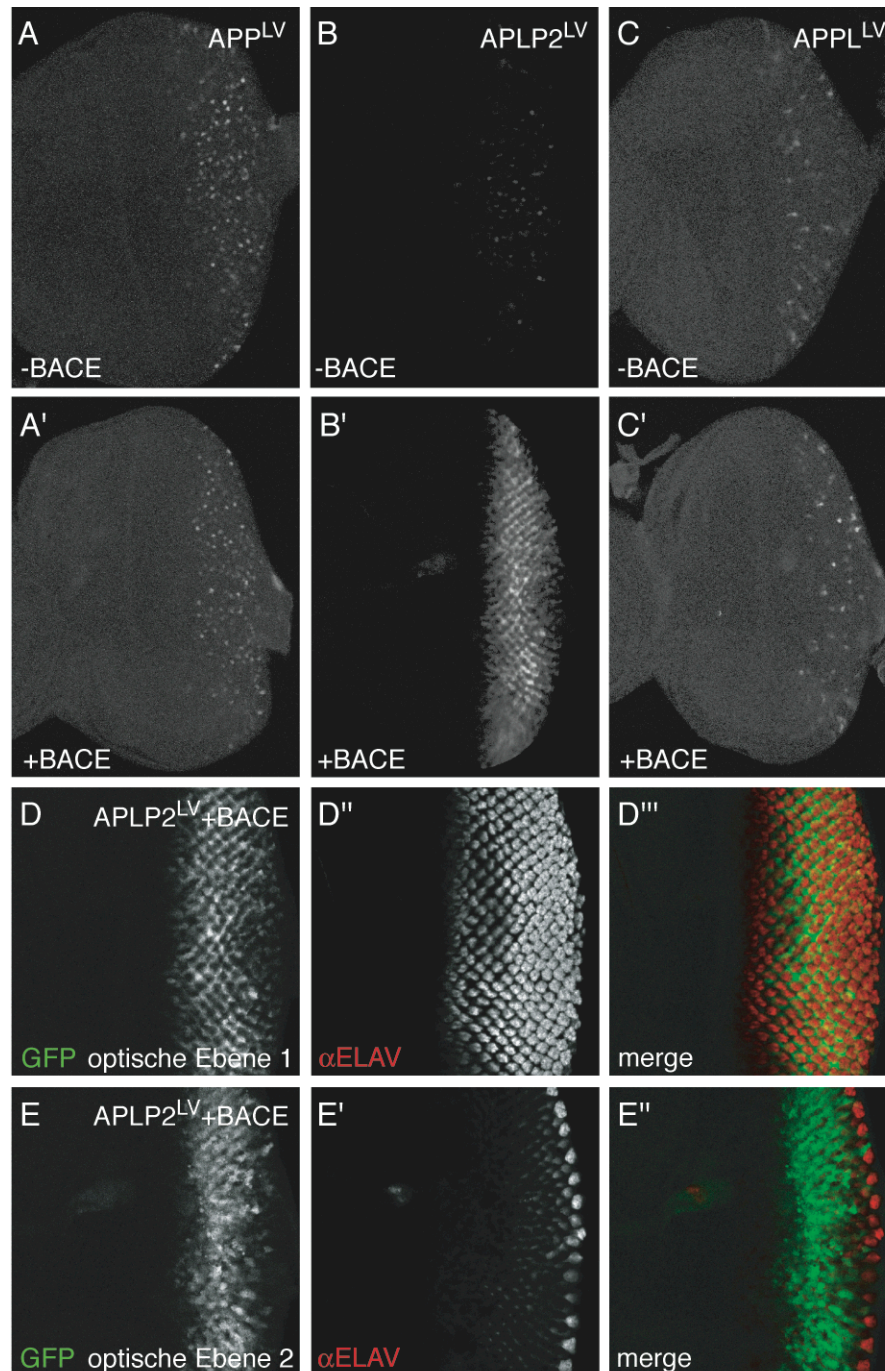


Abb. 34 Der Einfluss von BACE auf die Prozessierung der APP-Familie. Das Reportersystem für APP, APLP2 und APPL wurde alleine oder zusammen mit BACE unter Kontrolle von GMR-Gal4 exprimiert. A) Wie bereits gezeigt, hat die verstärkte Bildung von γ -Sekretasesubstraten durch BACE keinen Einfluss auf die Freisetzung von A^{ICD}. B) Im Gegensatz dazu scheint bei APLP2 der extrazelluläre Schnitt limitierend zu sein, da die verstärkte Prozessierung durch BACE zu einem dramatischen Anstieg der GFP-Aktivierung führt. C) Das Reportersystem zeigt für APPL keine Veränderung der γ -Sekretase vermittelten Prozessierung, obwohl auch dieses Protein extrazellulär von BACE geschnitten wird. D) und E) Die vorhergehende Prozessierung durch BACE führt nicht nur zu einer Verstärkung des Signals, es sind auch andere Zellen, in denen die intrazelluläre Domäne freigesetzt war. Während APLP2 alleine vor allem in neuronalen Zellen prozessiert wird (Abb. 33 A) und B)), ist nun auch ein deutliches Signal in den undeterminierten Zellen zu erkennen (Ebene 2). Das neuronale Signal (ELAV positive Zellen) scheint nun sogar schwächer, also nicht von der BACE-Aktivität verändert zu sein. Genotyp: A) 2xlexA-hrGFP/+;UAS-APP^{LV}/GMR-Gal4 A') 2xlexA-hrGFP/UAS-BACE;UAS-APP^{LV}/GMR-Gal4 B) 2xlexA-hrGFP/+;UAS-APLP2^{LV}/GMR-Gal4 B')+(D)+E) 2xlexA-hrGFP/UAS-BACE;UAS-APLP2^{LV}/GMR-Gal4 C) 2xlexA-hrGFP/+;UAS-APPL^{LV}/GMR-Gal4 C') 2xlexA-hrGFP/UAS-BACE;UAS-APPL^{LV}/GMR-Gal4

Augenimaginalscheibe nicht (Abb. 34 C und C'). Es werden weiterhin nur einige verstreute Zellen mit aktiviertem Reporter detektiert.

Ein anderes Bild zeigte sich dagegen in der Flügelimaginalscheibe. Wie bereits gezeigt, verändert sich auch in diesem Gewebe die γ -Sekretase abhängige Prozessierung von APP durch die Expression von BACE nicht (Abb. 35 A). Im Gegensatz zur Augenimaginalscheibe gilt dies auch für die Prozessierung von APLP2 (Abb. 35 B). Allerdings ist der vom Fusionskonstrukt erzeugte Phänotyp in diesem Gewebe so stark, dass viele Zellen ihre dorsale Identität verlieren und kein Gal4 und damit auch kein Reportersystem mehr exprimieren. Daher kann nur unter Vorbehalt eine Aussage über die APLP2-Prozessierung getroffen werden. Sehr deutlich ist das Ergebnis aber für APPL: Während im Auge keine verstärkte Freisetzung der intrazellulären Domäne nach BACE-Expression festzustellen war, erhöht sich im Flügel die GFP Aktivierung, wenn mehr Substrate für die γ -Sekretase zur Verfügung stehen (Abb. 35 C).

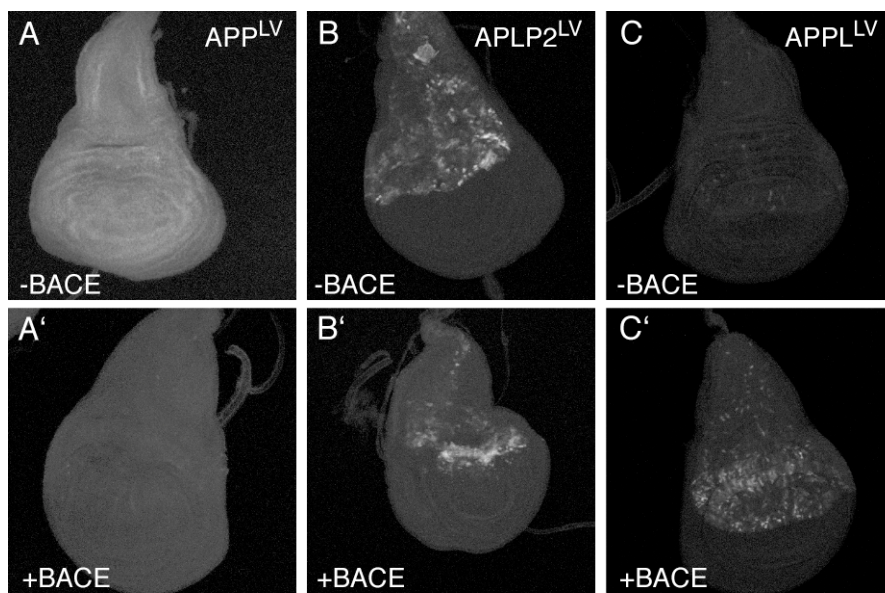


Abb. 35 Der Einfluss von BACE auf die Prozessierung der APP-Familie im Flügel. Das Reportersystem für APP, APLP2 und APPL wurde alleine oder zusammen mit BACE unter Kontrolle von *ap*-Gal4 in der Flügelimaginalscheibe exprimiert. A) und A') APP wird in diesem Gewebe auch bei gleichzeitiger Expression von BACE nicht effizient prozessiert. B) und B') Im Gegensatz zur Augenimaginalscheibe führt die Akkumulation von γ -Sekretasesubstraten durch BACE in der Flügelimaginalscheibe nicht zur einer verstärkten Aktivierung von GFP. Da dieses Fusionskonstrukt aber einen starken Phänotyp induziert und die Zellen ihre dorsale Identität und damit die Gal4-Aktivität verlieren, kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. C) und C') Die Prozessierung von APPL durch BACE hat in diesem Gewebe einen deutlichen Einfluss auf die γ -Sekretase vermittelte Freisetzung der intrazellulären Domäne. Alleine exprimiert zeigt das Reportersystem kaum eine Aktivierung, die gleichzeitige Anwesenheit von BACE führt jedoch zu einem starken GFP-Signal. Genotyp der Kreuzungen: A) 2xlexA-hrGFP/*ap*-Gal4;UAS-APP^{LV}/+ A') 2xlexA-hrGFP/*ap*-Gal4;UAS-APP^{LV}/ UAS-BACE B) 2xlexA-hrGFP/*ap*-Gal4;UAS-APLP2^{LV}/+ B') 2xlexA-hrGFP/*ap*-Gal4;UAS-APLP2^{LV}/ UAS-BACE C) 2xlexA-hrGFP/*ap*-Gal4;UAS-APPL^{LV}/+ C') 2xlexA-hrGFP/*ap*-Gal4;UAS-APPL^{LV}/ UAS-BACE

Die Überexpression von BACE zeigt zusammengenommen ein differenziertes Bild für die γ -Sekretase vermittelte Freisetzung der intrazellulären Domäne innerhalb der APP-Proteinfamilie und in verschiedenen Geweben von *Drosophila*: Während APP generell nur in neuronalen Zellen ein gutes Substrat zu sein scheint, ist im Bezug auf APLP2 im Auge die vorherige Freisetzung der intrazellulären Domäne entscheidend. Dagegen ist für die Prozessierung von APPL in diesem Gewebe die Prozessierung durch γ -Sekretase limitierend, während im Flügel der Protease-Komplex mehr CTF schneiden kann als die endogenen Sekretase zur Verfügung stellt.

2.2.2.4 Die Prozessierung durch die γ -Secretase hängt sowohl von der Länge als auch von der Sequenz des Substrates ab

Die gemeinsame Expression von BACE mit den jeweiligen Fusionskonstrukten der APP-Proteinfamilie legt nahe, dass die γ -Sekretase die verschiedenen CTF mit unterschiedlicher Effizienz als Substrat erkennt. Alle bisherigen Versuche waren jedoch von der vorhergehenden Freisetzung der Ektodomäne durch α - oder β -Sekretase abhängig. Um die Prozessierung durch die γ -Sekretase direkt untersuchen zu können, wurden von APP, APLP2, APPL und Notch Konstrukte erzeugt, die der vorherigen Prozessierung durch eine α -Sekretase entsprechen. Dies bedeutet, dass alle Fusionsproteine nach Entfernung des Signalpeptids eine Ektodomäne von 13-15 AS Länge haben (Abb. 36 A und B). Um die Bedingungen möglichst gleich zu gestalten, wurde für alle Konstrukte das gut charakterisierte APP Signalpeptid verwendet (Lichtenthaler et al. 1999). Da verschiedene Signalpeptide einen Einfluss auf die Effizienz der Insertion des Proteins in die Membran und die resultierende N-terminale Aminosäure haben könnte, wurde zum Vergleich ein APLP2-Konstrukt mit dem Signalpeptid von APLP2 generiert (Abb. 36 A).

Die Fusionproteine wurden mit dem Gal4-Treiber GMR in allen Zellen posterior der morphogenetischen Furche exprimiert und das GFP Signal in der larvalen Imaginalscheibe analysiert. Das GFP Signal, das von APP^{AEC/LV} erzeugt wird, entspricht wie erwartet dem von APP oder SPA4CT bekannten Muster (Abb. 36 D). Dies bestätigt die Ergebnisse der Expression von Kuzbanian und BACE, die beide entsprechende CTF erzeugten, aber zur keiner Veränderung in der Freisetzung der intrazellulären Domäne führten. Das Resultat der gemeinsamen Expression von BACE und APLP2 ließ erwarten, dass das verkürzte APLP2 Konstrukt ubiquitär prozessiert wird. Überraschenderweise wurde der GFP Reporter aber nur in Zellen am posterioren Ende der Imaginalscheibe aktiviert, ähnlich wie bei APLP2^{LV} alleine (Abb. 36 E). Das umgekehrte Bild zeigte sich bei der Prozessierung von APPL: In diesem Fall

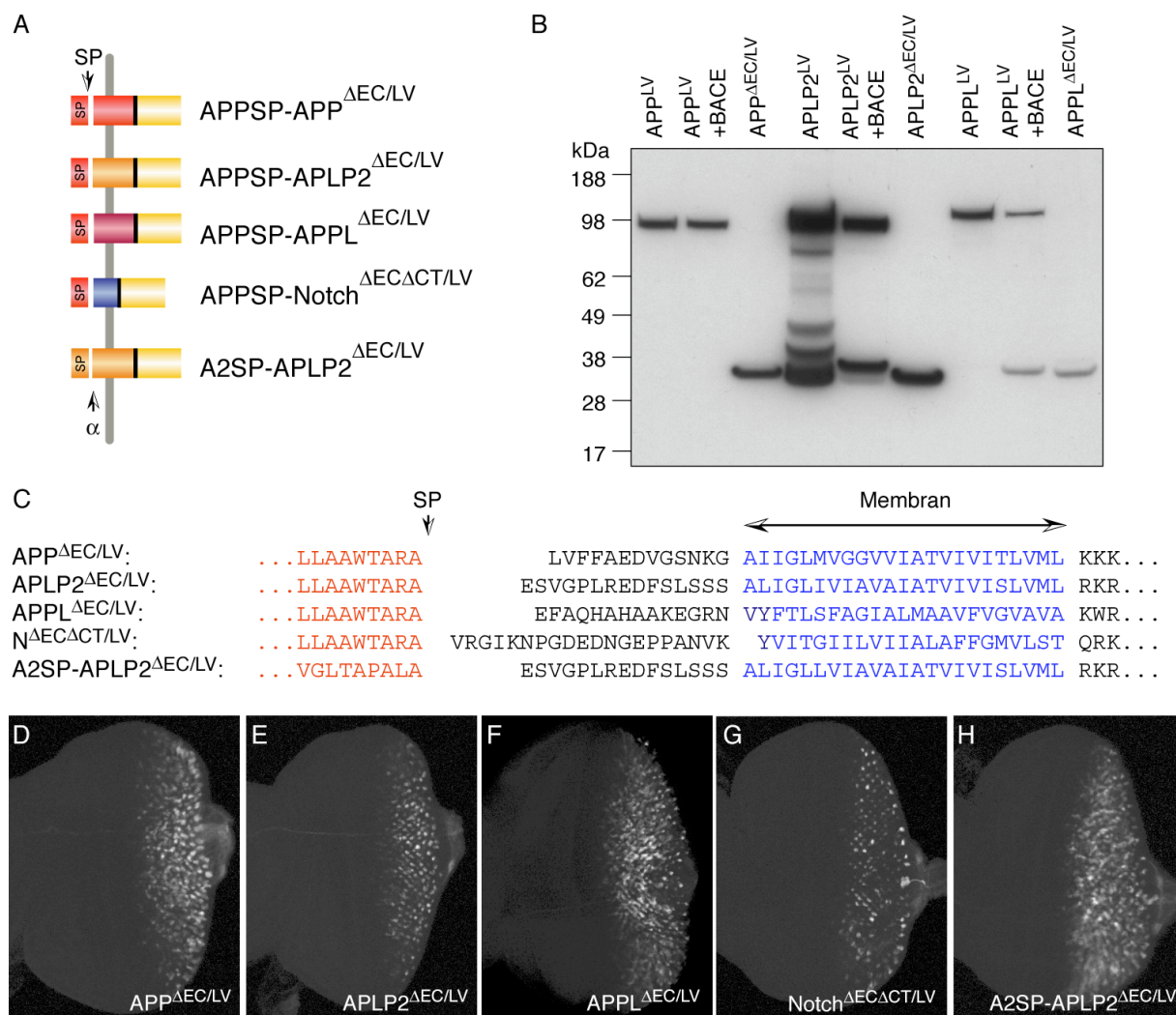


Abb. 36 Neue Konstrukte zur direkten Untersuchung der γ -Sekretase-Aktivität. A) Um die γ -Sekretase vermittelte Intramembranproteolyse ohne die Notwendigkeit einer vorhergehenden extrazellulären Prozessierung untersuchen zu können, wurden neue Fusionskonstrukte erzeugt, die einem vorherigen Schnitt durch die α -Sekretase entsprechen. Dadurch haben alle Konstrukte eine Länge der extrazellulären Domäne von 13-15 AS. Um einen möglichen Einfluss des Signalpeptids auszuschließen, wurde für alle Konstrukte das Signalpeptid von APP verwendet. Zum Vergleich der Signalpeptide wurde eine Form von APLP2 mit dem APLP2-Signalpeptid kloniert. Die Aminosäuresequenz der extrazellulären und der Transmembrandomäne ist in C) angegeben. B) Die Expression der verschiedenen Fusionskonstrukte wurde durch Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen VP16 untersucht. Die Konstrukte wurden mit GMR-Gal4 exprimiert. D)-H) Die verschiedenen verkürzten Konstrukte wurden in der Augenimaginalscheibe zusammen mit Reportergenen exprimiert. D) APP^{ΔEC/LV} erzeugt wie die anderen APP-Konstrukte nur Signale in bestimmten Zellen. E) Entgegen der Erwartungen wird APLP2^{ΔEC/LV} ebenfalls nur in wenigen Zellen effizient prozessiert. F) APPL^{ΔEC/LV} scheint dagegen ein gutes Substrat für den γ -Sekretasekomplex zu sein und wird in den meisten Zellen prozessiert. G) Die ineffiziente Prozessierung von N^{ΔECΔCT/LV} könnte auf dem gestörten Transport durch das Fehlen der C-terminalen Domäne zurückzuführen sein. H) Das verkürzte APLP2-Konstrukt mit dem APLP2-Signalpeptid wird ähnlich wie das Konstrukt mit APP-Signalpeptid geschnitten, die Expression und damit das erzeugte Signal ist jedoch deutlich stärker. Bei diesem Konstrukt war eine große Varianz zwischen den verschiedenen Insertionen festzustellen. Die Identität aller Konstrukte wurde durch PCR validiert. Genotyp der Kreuzungen: D) 2xlexA-hrGFP;UAS-APP^{ΔEC/LV}/GMR-Gal4 E) 2xlexA-hrGFP;UAS-APLP2^{ΔEC/LV}/GMR-Gal4 F) 2xlexA-hrGFP;UAS-APPL^{ΔEC/LV}/GMR-Gal4 G) 2xlexA-hrGFP;UAS-N^{ΔECΔCT/LV}/GMR-Gal4 H) 2xlexA-hrGFP;UAS-A2SP-APLP2^{ΔEC/LV}/GMR-Gal4

wurden mit oder ohne BACE kaum Zellen detektiert, in denen die intrazelluläre Domäne effizient freigesetzt wurde. Die Expression des N-terminal deletierten Konstrukts APPL^{AEC/LV} dagegen führte zur starken Aktivierung des Reportersystems (Abb. 36 F).

Auch das Konstrukt N^{AECΔCT/LV} zeigte ein unerwartetes Prozessierungsmuster: Da dieses Konstrukt konstitutiv aktiv sein sollte, also keine Liganden-abhängige Abspaltung der extrazellulären Domäne mehr voraussetzt, war eine ubiquitäre Prozessierung in allen Zellen zu erwarten. Es zeigte sich jedoch, dass auch von diesem Fusionsprotein nur in einigen Zellen die intrazelluläre Domäne freigesetzt und der Reporter aktiviert wird (Abb. 36 G). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist die Deletion der intrazellulären Domäne in diesem Konstrukt. Diese ist notwendig, da sonst eine konstitutive Aktivierung des Notch Signalwegs induziert wird. Neben den proteinbindenden- und transaktivierenden Domänen enthält der C-Terminus von Notch aber auch Motive, die für den korrekten Transport des Proteins notwendig sind. Da diese Signale in N^{AECΔCT/LV} fehlen, wird das Fusionsprotein wahrscheinlich nicht fehlerfrei zur Zelloberfläche transportiert. Dies würde dazu führen, dass es nur schlecht von der γ -Sekretase als Substrat erkannt wird.

Auch für die verkürzten Konstrukte wurden Färbungen mit ELAV und α Spectrin Antikörpern zur detaillierten Analyse angefertigt. Dabei ergab sich für APP^{AEC/LV} das erwartete Muster mit ausschließlicher Prozessierung in den neuronalen Zellen. Das Signal ist jedoch sehr stark und der Reporter scheint in mehr Zellen aktiviert zu sein (Vergleich Abb. 28). Die Prozessierung von APLP2^{AEC/LV} entsprach weitgehend der von APLP2^{LV}: Der Großteil des GFP Signals ist in ELAV positiven Zellen lokalisiert, nur vereinzelte Signale können in den undeterminierten Zellen detektiert werden. Ganz anders das Ergebnis von APPL^{AEC/LV}: In Ebene 1 wird Prozessierung in den sich entwickelnden Photorezeptoren visualisiert, aber in Ebene 2 sind auch sehr deutliche Signale in den undeterminierten Zellen zu erkennen. APPL^{AEC/LV} wird also in allen Zellen effizient von der γ -Sekretase erkannt und geschnitten, so dass die intrazelluläre Domäne in den Kern wandern und den Reporter aktivieren kann.

Die in diesem Teil vorgestellten Ergebnisse machen deutlich, dass für eine effiziente Prozessierung durch den γ -Sekretasekomplex je nach Zelltyp unterschiedliche Voraussetzungen für das Substrat erfüllt sein müssen. Dabei sind sowohl die Aminosäuresequenz, als auch die Länge der extrazellulären Domäne von Bedeutung. Die Prozessierung durch die γ -Sekretase scheint also keine homogene Aktivität zu sein, sondern für verschiedene Substrate in verschiedenen Zelltypen distinkte Eigenschaften zu haben.

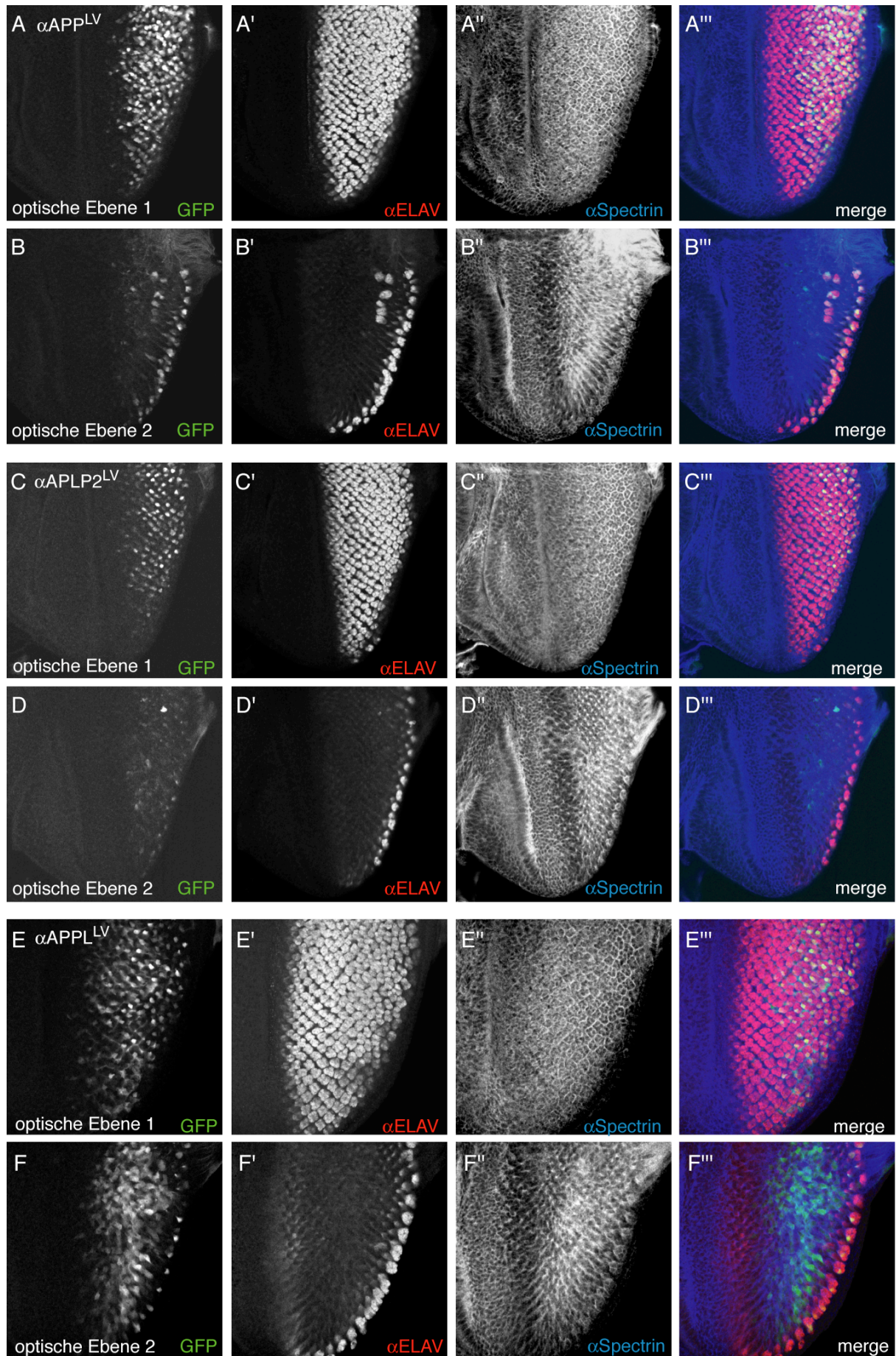


Abb. 37 Untersuchung der Zelltypen mit effizienter Prozessierung der verkürzten Konstrukte. Die verkürzten Konstrukte des Reportersystems wurden mit GMR-Gal4 in der Augenimaginalscheibe exprimiert. Die Zelltypen der Imaginalscheibe wurden durch Färbung mit ELAV- und α Spectrin-Antikörpern hervorgehoben. Es sind jeweils zwei optische Ebenen gezeigt, die die neuronalen Zellen (Ebene 1) oder die undifferenzierten Zellen (Ebene 2) enthalten. A) und B) Die effiziente Prozessierung von APP^{AEC/LV} ist wie erwartet auf die neuronalen Zellen beschränkt. C) und D) Auch APLP2^{AEC/LV} erzeugt Signale, die denen von APLP2^{LV} entsprechen. Vor allem neuronale Zellen aktivieren den Reporter, nur vereinzelt ist GFP in der Ebene der undifferenzierten Zellen zu erkennen. E) und F) Im Gegensatz dazu visualisiert das Reportersystem für APPL^{AEC/LV} γ -Sekretaseaktivität in beiden optischen Ebenen, dieses Konstrukt wird also in allen Zellen effizient prozessiert. Genotyp der Kreuzungen: A)+B) 2xlexA-hrGFP;UAS-APP^{AEC/LV}/GMR-Gal4 C)+D) 2xlexA-hrGFP;UAS-APLP2^{AEC/LV}/GMR-Gal4 E)+F) 2xlexA-hrGFP;UAS-APPL^{AEC/LV}/GMR-Gal4

2.2.3 Modulierung der γ -Secretase Aktivität

Im Verlauf dieser Arbeit sind die unterschiedlichen Voraussetzungen für eine effiziente Prozessierung durch die γ -Sekretase deutlich geworden. Im letzten Abschnitt soll nun versucht werden, die Hintergründe für diese variierende Aktivität durch Modulierung der γ -Sekretase zu beleuchten.

2.2.3.1 Die Unterschiede der γ -Secretase-Aktivität in Flügel- und Augenimaginalscheiben hängen nicht von alternativen Spleißformen ab

Die Ergebnisse der gemeinsamen Expression des Reportersystems für APPL mit der Protease BACE legen nahe, dass es in der Augen- und der Flügelimaginalscheibe γ -Sekretasekomplexe unterschiedlicher Aktivität gibt. Wodurch wird dieser Unterschied verursacht? Eine Möglichkeit ist, dass unterschiedliche Spleißformen der beteiligten Proteine einen Einfluss auf die Eigenschaften der Protease haben. So sind zum Beispiel drei alternative Varianten von *Psn* bekannt, die sich in der Länge der cytoplasmatischen Schleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 unterscheiden und deren Expression während der Entwicklung dynamisch reguliert wird (Nowotny et al. 2000). Ein einfacher Test, ob diese Varianten eine Rolle für die beobachteten Unterschiede in der Prozessierung spielen, ist, deren Auftreten in den beiden Imaginalscheiben zu vergleichen. Daher wurde RNA aus beiden Geweben isoliert und durch RT-PCR die drei Spleißformen analysiert (Abb. 38). Als Vergleich wurde RNA des Puppenstadiums verwendet, da zu diesem Zeitpunkt die dritte Variante verstärkt exprimiert ist. Obwohl dies in der RT-PCR auch gut reproduzierbar war, ließen sich keine Unterschiede zwischen der Augen- und der Flügelimaginalscheibe erkennen. Trotz des vorläufigen Charakters dieser Analyse erscheint es daher sehr unwahrscheinlich, dass alternatives Spleißen eine Ursache für die unterschiedliche Aktivität der γ -Sekretase in den untersuchten Geweben ist.

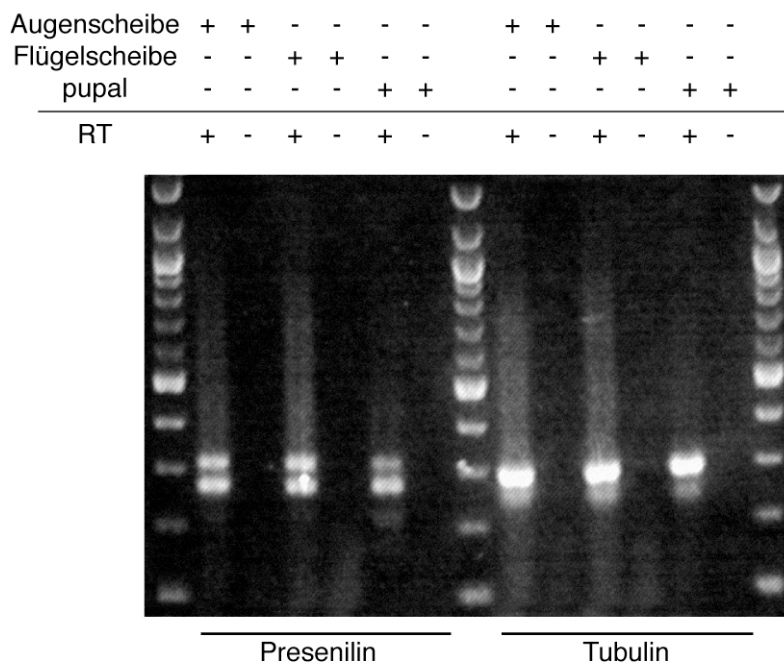


Abb. 38 Expression der alternativen Spleißformen von Presenilin in verschiedenen Geweben. RNA wurde aus den Augen- oder Flügelimaginalscheiben und aus Puppen von wildtypischen Fliegen isoliert. Mit Hilfe von Oligo-dT Primern wurde die mRNA zu cDNA umgeschrieben und die Expression der Spleißvarianten analysiert. Die für die PCR verwendeten Primer überspannen die alternative Grenze zwischen den Exons und produzieren Fragmente von 215, 272 und 314 Bp Länge, die die alternativen Formen der *Psn*-mRNA repräsentieren. Das Verhältnis dieser Formen ändert sich zwischen Augen- und Flügelimaginalscheibe nicht, erst im pupalen Stadium wird die kürzeste Variante verstärkt exprimiert. Als Kontrolle der RNA-Menge wurde eine PCR mit Tubulin-spezifischen Primern durchgeführt. DNA-Kontamination wurden durch Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase ausgeschlossen.

2.2.3.2 FAD-Mutationen in Presenilin verändern nicht die Zelltyp-Spezifität der γ -Secretase

Die Alzheimersche Erkrankung tritt meistens sporadisch im hohen Alter auf, doch einige Fälle mit frühem Beginn der Krankheit sind auf familiär vererbte Mutationen in den Genen *Presenilin 1* und *2* zurückzuführen (Hardy 1997). Diese Mutationen führen zu Veränderungen in der Produktion des pathogenen A β , besonders zur verstärkten Bildung der potenteren Form A β 42. Könnten diese Mutationen auch Einfluss auf die Abhängigkeit vom Zelltyp haben? Um diese Frage zu untersuchen, konnten wir freundlicher Weise auf transgene Linien aus dem Labor von Marc Fortini zugreifen, die *Drosophila Presenilin* mit Mutationen in den entsprechenden AS exprimieren, die in verschiedenen Patienten mit FAD gefunden wurden. Hier verwendet wurden die Mutationen E280A (Lemere et al. 1996) und L235P (Campion et al. 1996). Diese transgenen Konstrukte wurden unter der Kontrolle des endogenen Promoters in einem genetischen Hintergrund exprimiert, der frei von funktionellem endogenem *Presenilin* war. Die mutierten Formen von Presenilin können aktive Proteasekomplexe bilden und so den Verlust des endogenen Presenilins in gewissem Maße ausgleichen (Ye et al. 1999).

Kombiniert mit dem Reportersystem für APP konnte der Einfluss auf die Freisetzung der intrazellulären Domäne visualisiert werden (Abb. 39). Wurde wildtypisches *Psn* als Kontrolle verwendet, konnte das gewohnte Signal in den neuronalen Zellen beobachtet werden (Abb. 39 A). Die Wiederherstellung der γ -Sekretase-Aktivität und die damit einhergehende Rettung der Entwicklungsdefizite war aber abhängig von der Expressionsstärke des Konstrukts, da nur eine Kopie des transgenen Konstrukts verwendet werden konnte. Dies führte dazu, dass in einigen Larven die Entwicklung der Augenheimagscheibe wegen des Verlusts des Notch-Signalwegs nicht stattfinden konnte (Abb. 39 B) und somit auch keine Untersuchung der APP Prozessierung möglich war. Auch das Konstrukt mit der L235P-Mutation in *Psn* zeigte nur eine unvollständige Wiederherstellung des Phänotyps (Abb. 39 C). Dennoch ist gut zu erkennen, dass die Neuronen, die noch gebildet werden, trotzdem APP prozessieren können. Das transgen exprimierte *Psn* mit der E280A-Mutation vermittelte ebenso die effiziente Freisetzung der A^{ICD}, das heißt, es war kein Unterschied zur wildtypischen Form detektierbar (Abb. 39 D).

Es scheint also keinen Einfluss der FAD-Mutationen auf die Zelltypspezifität der APP Prozessierung zu geben. Dies ist im Einklang mit anderen Studien, die zeigen, dass die FAD Mutationen zwar das Verhältnis der verschiedenen A β -Spezies verändern, aber wenig Einfluss auf die Freisetzung von A^{ICD} haben (Bergman et al. 2003). Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass der Grad der Wiederherstellung der Entwicklung abhängig ist von der Expression des transgenen Konstrukts und so kein direkter Vergleich über die absolute Aktivität der verschiedenen Formen des Proteins gemacht werden kann. Alle Konstrukte erlauben homozygot die normale Entwicklung des Organismus.

2.2.3.3 Koordinierte Überexpression von Presenilin mit seinem Kofaktoren führt zu verstärkter γ -Sekretase Aktivität

Durch die gemeinsame Expression von *Presenilin* mit den Kofaktoren *Nicastrin*, *Aph1* und *Pen2* kann ein aktiver Proteasekomplex nachgebildet werden (Edbauer et al. 2003; Hu et al. 2003; Takasugi et al. 2003). Dies eröffnet die Möglichkeit, γ -Sekretase auch in *Drosophila* verstärkt zu exprimieren und den Einfluss auf die verschiedenen Substrate zu untersuchen. Im Labor von Marc Fortini wurden transgene Fliegenlinien erzeugt, die die Expression der vier Komponenten mit verschiedenen Tag-Sequenzen unter Kontrolle von Gal4-Bindestellen erlauben. Diese Fliegenlinien wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Dadurch konnten die Bestandteile des γ -Sekretasekomplexes in verschiedenen Kom-

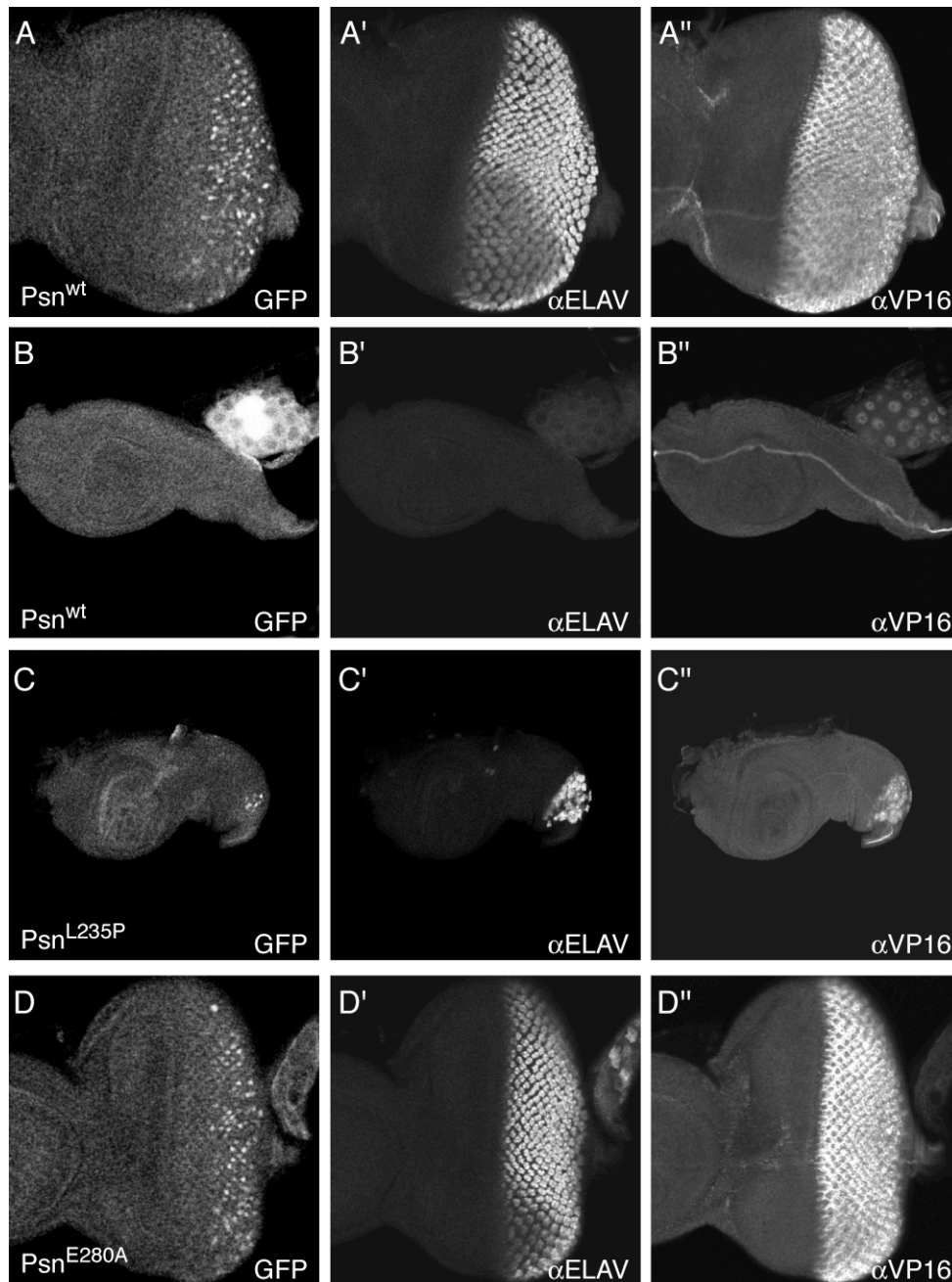


Abb. 39 FAD-Mutationen haben keinen Einfluss auf die Zelltypspezifität der APP Prozessierung. Das Reportersystem wurde in einem genetischen Hintergrund eingesetzt, in dem die endogene *Presenilin*-Aktivität durch transgen exprimierte wildtypische (A) und B)) oder mutierte Formen von *Psn* ersetzt wurde. Es wurden dabei die zwei FAD-Mutationen L235P (C) und E280A (D) verwendet. Die Expression des Fusionkonstruktes wurde mit α VP16, die neuronalen Zellen mit α ELAV visualisiert. A) Das transgen produzierte wildtypische *Psn* ermöglicht die normale Prozessierung von APP im bekannten Muster. B) Die Expressionsstärke reicht jedoch nicht aus, um in allen Larven den Verlust des endogenen *Psn* zu ersetzen, so dass häufig Imaginalscheiben mit dem Phänotyp isoliert wurden, der durch einen Verlust der Notch-Aktivität erzeugt wird. C) Das *Psn*-Transgen mit der Mutation L235P konnte den Entwicklungsphänotyp nur teilweise retten. Es werden jedoch Zellen gebildet, die das Reportersystem exprimieren und die neuronale Differenzierung beginnen. In diesen Zellen kann GFP-Aktivierung beobachtet werden. D) Das Reportersystem zeigt keine Unterschiede in der APP-Prozessierung zwischen *Psn*^{E280A} und der wildtypischen Form des Proteins. Genotyp der Fliegen: A)+B) 2xlexA-hrGFP UAS-APP^{L^V} glass-Gal4/PEPC-*Psn*^{wt}; *Psn*^{C1}/*Psn*^{B3} C) 2xlexA-hrGFP UAS-APP^{L^V} glass-Gal4/PEPC-*Psn*^{L235P}; *Psn*^{C1}/*Psn*^{B3} D) 2xlexA-hrGFP UAS-APP^{L^V} glass-Gal4/PEPC-*Psn*^{E280A}; *Psn*^{C1}/*Psn*^{B3}

binationen mit GMR-Gal4 im adulten Auge exprimiert werden (Abb. 40). Nach Expression von *Psn* alleine wurde zwar eine leichte Akkumulation von Protein voller Länge festgestellt, die aktive, endoproteolytisch gespaltene Form reicherte sich aber nicht an. Auch die verstärkte Produktion der anderen Kofaktoren führte alleine zu keiner Veränderung in der Menge des reifen Komplexes. Kombiniert man *Psn* mit einem der anderen Transgene, zeigt nur *Aph1* einen Einfluss: Es kommt zu einer deutlich verstärkten Anreicherung des Proteins voller Länge. Aber erst die koordinierte Expression aller vier beteiligten Proteine führt zur

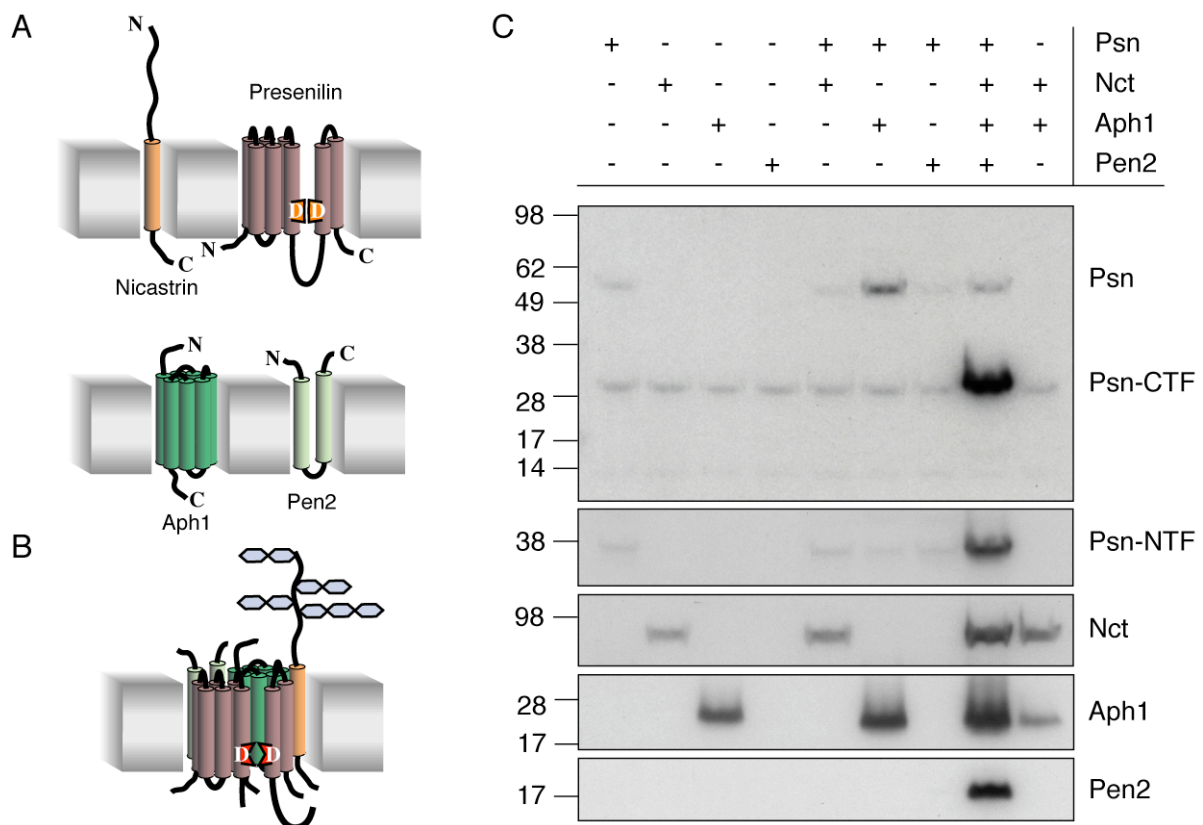


Abb. 40 Rekonstruktion des γ -Sekretase-Komplexes in *Drosophila*. A) Schematische Darstellung der vier Komponenten der γ -Sekretase. Von den vier Proteinen wurden markierte Versionen der cDNAs unter UAS-Kontrolle exprimiert. *Psn* und *Nct* waren mit einem N-terminalen myc-Tag, *Aph1* mit einem C-terminalen V5- und His-Tag und *Pen2* mit einem C-terminalen FLAG-Tag markiert. B) Modell des reifen Proteasekomplexes. C) Die vier Konstrukte wurden alleine, in Kombination mit *Psn* und alle zusammen mit GMR-Gal4 im adulten Auge exprimiert. Proteinextrakte der entsprechenden Kreuzungen wurden in Probenpuffer mit 4M Urea bei 37°C denaturiert und durch Western Blot analysiert. Die Expression von *Psn* führt zu einer leichten Anreicherung von *Psn*-Holoprotein, die anderen Komponenten führen zu keiner Änderung. Gemeinsame Expression einer der Komponenten mit *Psn* resultiert nur für *Aph1* in einer deutlichen Stabilisierung des Holoproteins. Erst die koordinierte Expression aller vier Proteine führt zur verstärkten Expression des reifen Komplexes mit endoproteolytisch gespaltendem *Psn*. Die gemeinsame Expression von *Aph1* und *Nct* führte im Gegensatz zu anderen Studien (Hu et al. 2003) nicht zu einem stabilen Subkomplex. *Psn*-Holoprotein und CTF wurden mit polyklonalem α LoopPsn detektiert, das *Psn*-NTF und *Nct* mit polyklonalen α myc-, *Aph1* mit α V5- und *Pen2* mit α FLAG-Antikörpern. Genotyp der Kreuzungen: 1) UAS-NmycPsn/GMR-Gal4 2) GMR-Gal4/+;UAS-mycNct/+ 3) UAS-Aph1V5/GMR-Gal4 4) GMR-Gal4/+;UAS-Pen2Flag/+ 5) GMR-Gal4/+;UAS-NmycPsn UAS-mycNct/+ 6) UAS-NmycPsn UAS-Aph1V5/GMR-Gal4 7) UAS-NmycPsn UAS-Pen2Flag/+;GMR-Gal4/+ 8) UAS-NmycPsn UAS-Aph1V5 /GMR-Gal4; UAS-mycNct UAS-Pen2Flag/+ 9) GMR-Gal4/+;UAS-mycNct UAS-Aph1V5/+

massiven Produktion des Protease-Komplexes. Die Menge an C- und N-terminalen Presenilinfragmenten, ein Indikator der aktiven γ -Sekretase, nimmt um ein Vielfaches zu. Ein anderer Marker für den funktionellen Zusammenbau des Komplexes, die Maturierung von Nicastrin durch Glykosylierung, ist in *Drosophila* leider nicht zu erkennen (Takasugi et al. 2003). Es kommt jedoch zu einer leichten Anreicherung von Nicastrin und auch von Aph1. Gut erkennbar ist auch, das Pen2 nur stabil ist, wenn alle vier Komponenten exprimiert werden.

Die Western Blot – Analyse zeigt, dass bei Überexpression aller vier Komponenten Presenilin endoproteolytisch gespalten wird, wodurch vermutet werden kann, dass der Proteinkomplex korrekt zusammengesetzt wird. Aber ist dieser Komplex auch proteolytisch aktiv? Diese Frage kann gut mit dem *in-vivo* Reportersystem beantwortet werden. Dazu wurde das minimale Notch-Konstrukt $N^{\Delta ECACT/LV}$ als Substrat verwendet. Wird es zusammen mit dem γ -Sekretasekomplex in der larvalen Augenimaginalscheibe exprimiert, zeigt das Reportersystem eine vielfach stärkere Aktivierung von GFP als bei Expression von $N^{\Delta ECACT/LV}$ alleine (Abb. 41 A). Dieser Anstieg in Reporteraktivität ist auf die erhöhte Intramembranproteolyse des Notch-Konstruktes zurückzuführen, da die Expression des γ -Sekretasekomplexes keinen Einfluss auf die cytoplasmatische Fusionsdomäne LexA-VP16 hat (Abb. 41 B).

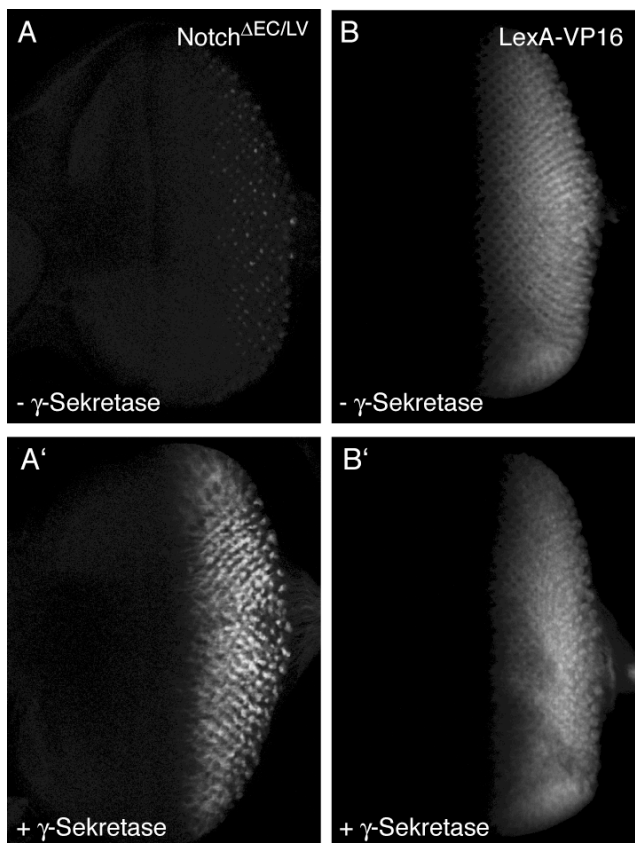


Abb. 41 Der rekonstituierte γ -Sekretasekomplex ist proteolytisch aktiv. Die Aktivität des rekonstituierten Komplexes wurde durch gemeinsame Expression mit dem Reporter $N^{\Delta ECACT/LV}$ in der Augenimaginalscheibe analysiert. Das nur schwach detektierbare GFP-Signal des Fusionskonstruktes allein (A), wird durch die gemeinsame Überexpression der γ -Sekretasekomponenten extrem verstärkt (A'). Der nachgebildete Komplex katalysiert also die Intramembranproteolyse, die zur Freisetzung der intrazellulären Domäne führt. Ein Einfluss auf andere Komponenten des Reportersystems kann ausgeschlossen werden, da das GFP-Signal der direkt exprimierten intrazellulären Domäne nicht modifiziert wird (B) und B')). Genotyp der Kreuzung: A) $2xlexA-hrGFP/+; UAS-N^{\Delta ECACT/LV} GMR-Gal4/+$ A') $2xlexA-hrGFP/UAS-NmycPsn UAS-Aph1V5; UAS-N^{\Delta ECACT/LV} GMR-Gal4/UAS-mycNct UAS-Pen2Flag$ B) $2xlexA-hrGFP/+; UAS-NLV GMR-Gal4/+$ B') $2xlexA-hrGFP/UAS-NmycPsn UAS-Aph1V5; UAS-NLV GMR-Gal4/UAS-mycNct UAS-Pen2Flag$

Der rekonstituierte γ -Sekretasekomplex kann also die intrazelluläre Domäne von $N^{\text{AEC/ACT/LV}}$ freisetzen, aber führt seine Überexpression auch zu einer verstärkten Prozessierung von anderen Substraten, z.B. der APP-Familie? Das Reportersystem bot wiederum die Möglichkeit, dies zu untersuchen. Die direkten γ -Sekretasesubstrate $\text{APP}^{\text{AEC/LV}}$, $\text{APLP2}^{\text{AEC/LV}}$ und $\text{APPL}^{\text{AEC/LV}}$ wurden zusammen mit den vier Komponenten der Protease in der Augenimaginalscheibe exprimiert (Abb. 42). Erstaunlicherweise verursachte die erhöhte Produktion des Proteasekomplexes keine Verstärkung der Intramembranproteolyse von APP

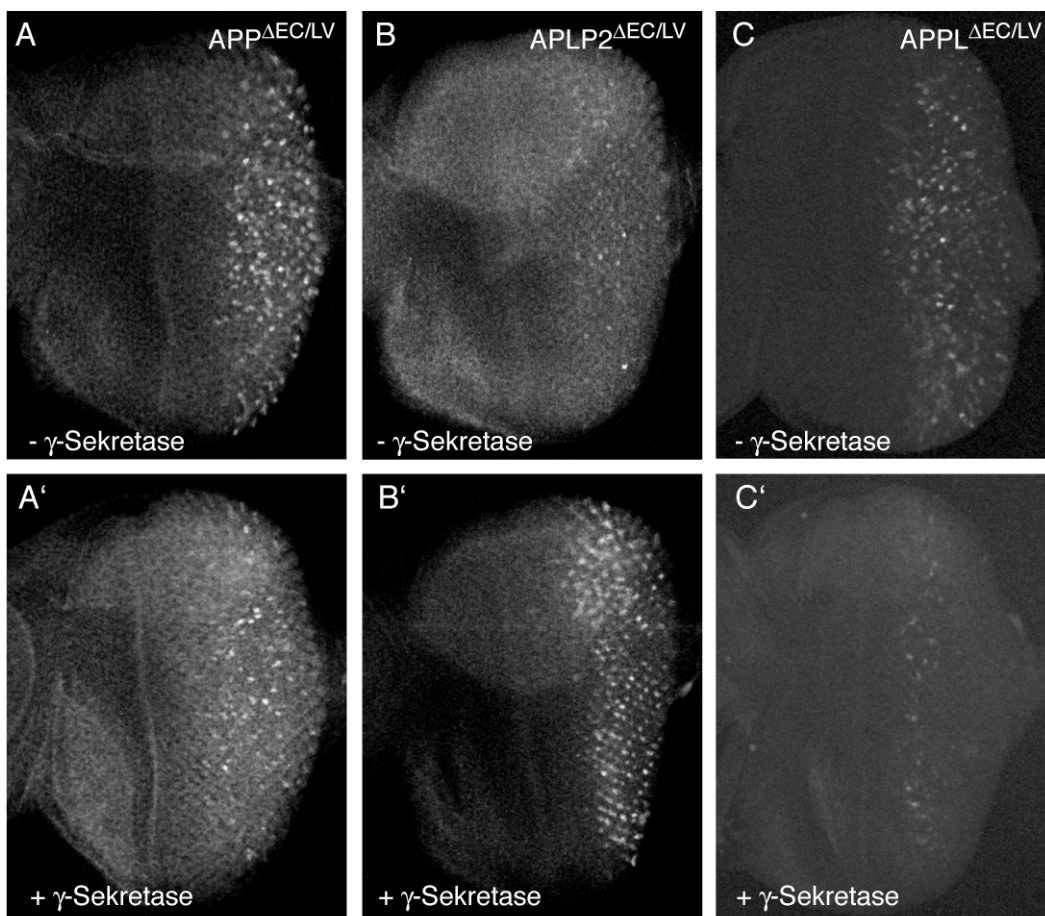


Abb. 42 Prozessierung der APP-Familie durch den rekonstituierten γ -Sekretasekomplex. Die Konstrukte $\text{APP}^{\text{AEC/LV}}$, $\text{APLP2}^{\text{AEC/LV}}$ und $\text{APPL}^{\text{AEC/LV}}$ wurden mit oder ohne den γ -Sekretasekomplex in der Augenimaginalscheibe exprimiert und die Prozessierung durch das Reportersystem visualisiert. A) Die Prozessierung von $\text{APP}^{\text{AEC/LV}}$ wird durch die Expression des Proteasekomplex kaum verändert, die leichte Reduktion der Signalstärke ist wahrscheinlich auf die schwächere Expression des Fusionskonstrukt zurückzuführen. B) $\text{APLP2}^{\text{AEC/LV}}$ ist ein gutes Substrat für die rekonstituierte γ -Sekretase und wird verstärkt gespalten. C) Die Expression der Protease führt dagegen zum Verlust des GFP-Signals von $\text{APPL}^{\text{AEC/LV}}$. Es können nur noch direkt hinter der morphogenetischen Furche zu Beginn der Expression Zellen mit GFP detektiert werden. Genotyp der Kreuzungen: A) $2x\text{lexA-hrGFP/+}; \text{UAS-APP}^{\text{AEC/LV}} \text{ GMR-Gal4/+}$ A') $2x\text{lexA-hrGFP/UAS-NmycPsn UAS-Aph1V5}; \text{UAS-APP}^{\text{AEC/LV}} \text{ GMR-Gal4/UAS-mycNct UAS-Pen2Flag}$ B) $2x\text{lexA-hrGFP/+}; \text{UAS-APLP2}^{\text{AEC/LV}} \text{ GMR-Gal4/+}$ B') $2x\text{lexA-hrGFP/UAS-NmycPsn UAS-Aph1V5}; \text{UAS-APLP2}^{\text{AEC/LV}} \text{ GMR-Gal4/UAS-mycNct UAS-Pen2Flag}$ C) $2x\text{lexA-hrGFP/+}; \text{UAS-APPL}^{\text{AEC/LV}} \text{ GMR-Gal4/+}$ C') $2x\text{lexA-hrGFP/UAS-NmycPsn UAS-Aph1V5}; \text{UAS-APPL}^{\text{AEC/LV}} \text{ GMR-Gal4/UAS-mycNct UAS-Pen2Flag}$

(Abb. 42 A). Es ist eher eine leichte Abnahme der Signalintensität zu beobachten. Da das räumliche Muster aber keine Veränderung zeigt, könnte dies auf die verringerte Expression des Fusionskonstrukts zurückzuführen sein, da Gal4 in dieser Kombination auf fünf UAS kontrollierte Promotoren verteilt wird. Obwohl die Transmembrandomäne von APP kaum von der überexprimierten γ -Sekretase erkannt wird, ist APLP2^{ΔEC/LV} ein gutes Substrat für die Protease (Abb. 42 B). Das schwache Signal, das in dieser Konstellation vom Reportersystem alleine visualisiert wird, nimmt durch die Expression der vier Komplexmitglieder um ein Vielfaches zu. Bei höherer Vergrößerung kann beobachtet werden, dass auch andere Zelltypen nun die effiziente Freisetzung der intrazellulären Domäne erlauben (Daten nicht gezeigt).

Ein völlig anderes Bild bot APPL^{ΔEC/LV}. Dieses Konstrukt war für die endogenen Proteasen in der Augenimaginalscheibe ein sehr gutes Substrat, so dass in den meisten Zellen GFP aktiviert wurde. Wird nun der γ -Sekretasekomplex aus den vier einzelnen Komponenten rekonstituiert, können die Zellen erstaunlicherweise APPL nicht mehr umsetzen. Zu Beginn der Expression direkt hinter der morphogenetischen Furche können zwar noch GFP-positive Zellen detektiert werden, wenn Gal4 jedoch länger aktiv ist, im posterioren Teil der Imaginalscheibe, visualisiert das Reportersystem keine Prozessierung mehr. Die anfänglichen Signale lassen sich am Besten durch die zeitliche Verzögerung zwischen der Produktion des kurzen Fusionskonstruktes und der komplizierten Reifung der überexprimierten γ -Sekretase erklären. Sobald der Komplex jedoch zusammengesetzt ist, scheint er APPL^{ΔEC/LV} zu binden, kann aber die Hydrolyse der Peptidbindung nicht durchführen. Da der rekonstituierte Komplex im Überschuss vorhanden ist, verhindert dessen Bindung die Freisetzung der APPL^{ICD} durch die endogene Protease.

Die Überexpression der vier Komponenten von UAS kontrollierten cDNAs ermöglicht also die Rekonstitution eines aktiven Proteasekomplexes; dieser hat jedoch distinkte Substratvoraussetzungen: Einige Substrate, zum Beispiel Notch^{ΔECACT/LV} und APLP2^{ΔEC/LV}, werden gebunden und umgesetzt, so dass im Reportersystem ein massiv verstärktes Signal detektiert wird. APPL^{ΔEC/LV} scheint dagegen von diesem Komplex nicht erkannt zu werden. Da das Fusionskonstrukt weder gebunden noch prozessiert wird, verändert die Expression der vier Komponenten das GFP-Signal kaum. Andere Substrate scheinen zwar von der Substratbindestelle der Protease erkannt zu werden, können aber nicht im aktiven Zentrum gespalten werden. Dies führt dazu, dass zum Beispiel die intrazelluläre Domäne von APPL^{ΔEC/LV} nicht mehr freigesetzt werden kann. Die normalerweise starke Aktivierung von GFP kommt völlig zum Erliegen.

3 Diskussion

In unserer alternden Gesellschaft stellen neurodegenerative Erkrankungen eine der größten Herausforderungen für die medizinische Forschung dar. Um effektive Therapieansätze entwickeln zu können, müssen die zellulären Mechanismen der Pathogenese verstanden werden. Mit der Entwicklung der Amyloid-Hypothese und der Identifizierung der für die Produktion von A β verantwortlichen Proteasen wurden bereits große Fortschritte im Verständnis der Alzheimerschen Erkrankung gemacht. Doch es ist noch unklar, wie diese Proteasen reguliert werden, vor allem wenn man die zellulären Vorgänge im Kontext eines intakten Gewebes betrachtet. Um diese Regulationsmechanismen *in-vivo* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Vorteile des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* ausgenutzt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Möglichkeiten eines genetischen Screens ausgenutzt, um neue Gene zu finden, die die Prozessierung von APP beeinflussen. Zwei dieser Gene wurden näher charakterisiert. Die Kinase Hops/Tlk induziert spezifisch die Degradation von APP, die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen müssen aber noch weiter untersucht werden. Dagegen konnte gezeigt werden, dass das Protein dBeach1 durch Veränderung der subzellulären Lokalisation zur Akkumulation des α -geschnittenen Fragments von APP führt. Der zweite Teil dieser Arbeit ging der Frage nach, wie die Freisetzung der intrazellulären Domäne durch Intramembranproteolyse *in-vivo* reguliert wird. Durch Verwendung eines GFP-basierten *in-vivo* Reportersystems konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der γ -Sekretase-vermittelten Prozessierung von APP abhängig vom Zelltyp ist. Der Vergleich verschiedener Fusionskonstrukte von APP, APLP2, APPL und Notch machte deutlich, dass sowohl die Länge der extrazellulären Domäne, als auch ihre Aminosäuresequenz entscheidend dafür ist, ob ein Typ-I Membranprotein von der γ -Sekretase gespalten werden kann.

3.1 Neue Regulatoren der APP Prozessierung

3.1.1 Die Vorauswahl der untersuchten EP-Elemente

Der vielleicht größte Vorteil des Modellsystems *Drosophila* ist die Möglichkeit, durch genetische Screens unvoreingenommen nach Genen zu suchen, die einen bestimmten zellulären Prozess beeinflussen. Da die Prozessierung von APP keinen sichtbaren Effekt auf die Entwicklung von *Drosophila* hat, kann leider nicht direkt nach deren Modifikatoren gesucht werden. Allerdings kann man sich die große Ähnlichkeit zwischen der Prozessierung

von APP und der des Notch-Rezeptors zu Nutze machen. Die Freisetzung der intrazellulären Domäne ist ein wesentlicher Bestandteil des Notch-Signalweges, so dass Störungen der proteolytischen Spaltungen Phänotypen während der Entwicklung erzeugen. Da identische Proteasen sowohl die Spaltung von Notch als auch die von APP vermitteln, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Modifikatoren des Notch-Signalweges auch die Proteolyse von APP beeinflussen.

Als Ausgangsbasis für den in dieser Arbeit durchgeführten Screen diente ein Phänotyp, der durch Expression einer dominant-negativen Form von *Kuzbanian* erzeugt wird (Abb. 8, (Pan et al. 1997)). Dadurch wird der erste Schritt in der proteolytischen Kaskade blockiert, so dass in einem Screen sowohl Modifikatoren dieser Proteaseaktivität als auch aller nachfolgender Prozesse identifizierbar sind. Als Mutagen wurden Insertionen von EP-Elementen benutzt, die die Überexpression benachbarter Gene induzieren (Rorth 1996). So kann die Aktivierung betroffener Gene analysiert werden. Da die zeitlichen Möglichkeiten beschränkt waren, wurden anstelle zufällig erzeugter Insertionen Linien verwendet, die entweder bekanntermaßen Notch-abhängige Entwicklungsvorgänge beeinflussen (Abdelilah-Seyfried et al. 2000) oder den APP induzierten Flügelphänotyp supprimieren (Bilic 2005). Durch diese Vorauswahl war es möglich, trotz der geringen Anzahl getesteter Linien zwei Suppressoren des *Kuzbanian*^{DN}-Phänotyps zu identifizieren (Abb. 9).

Einen ähnlichen Screen nach neuen Modifikatoren des Notch-Signalwegs hat Dr. Anja Nagel im Labor von Dr. Anette Preiss durchgeführt. Sie erzeugte durch Expression des Repressors *Hairless*, eines negativen Regulator von Notch, einen Augenphänotyp und testete alle 2293 EP-Elemente der Røth-Kollektion (Rorth et al. 1998) auf mögliche Suppressoren. In diesem Screen wurden weitere 43 EP-Elemente mit Einfluss auf Notch identifiziert, die uns freundlicherweise zu Verfügung gestellt wurden. Zusammen mit den beiden identifizierten Suppressoren von *Kuzbanian*^{DN} konnten dann ihre Wirkung auf die APP Prozessierung analysiert werden.

3.1.2 Elf EP-Elemente beeinflussen die Prozessierung von APP in *Drosophila*

Um den Einfluss der identifizierten Modifikatoren des Notch-Signalwegs auf die APP Prozessierung zu untersuchen, wurden die proteolytischen Fragmente von APP durch Western Blot mit dem C-terminalen Antikörper CT 13 detektiert (Abb. 10). Diese Methode hat den Vorteil, dass eine relativ große Menge an Proben gleichzeitig untersucht werden kann. Allerdings ist die Analyse auf bestimmte Teile der Prozessierung beschränkt: Nur das Protein voller Länge und die CTF sind detektierbar. Da die intrazelluläre Domäne sehr instabil ist,

kann sie im Western Blot normalerweise nicht untersucht werden (Cupers et al. 2001). Daher kann mit dieser Methode vor allem die α -Sekretaseaktivität und die Stabilität von APP untersucht werden. Veränderungen der γ -Sekretaseaktivität können nur indirekt durch erhöhte oder verringerte Menge des CTF beobachtet werden.

Von den getesteten 45 EP-Elementen zeigten elf einen Einfluss auf die APP Prozessierung. Da für zwei genomische Loci jeweils zwei Insertionen identifiziert wurden, konnten insgesamt neun neue Regulatoren der APP Prozessierung entdeckt werden (Tab. 3). Diese Proteine sind, soweit ihre Funktion bekannt ist, an verschiedenen zellulären Prozessen von der Transkription bis zur Regulation des Zytoskeletts beteiligt. Ohne weitere Charakterisierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung einiger EP-Elemente auf die APP-Prozessierung unspezifisch ist.

Interessant ist das EP-Element EP(X)0355, das in der Nähe von *small wing* (*sl*), dem *Drosophila* Homolog der Phospholipase C γ (PLC γ , Thackeray et al. 1998), inseriert ist. Wie in der Einleitung beschrieben, kann PLC γ durch Aktivierung der PKC α -Sekretase-Aktivität stimulieren. Es liegt daher nahe, dass die Expression von EP(X)0355 zu einer Überexpression von *small wing* führt, so dass die α -Sekretase stimuliert wird und dadurch die massive Anreicherung der CTF von APP verursacht wird. Allerdings ist EP(X)0355 nicht direkt in *small wing* inseriert, sondern im benachbarten Gen *Dsp1*, das als transkriptioneller Repressor fungiert (Mosrin-Huaman et al. 1998). Es bleibt daher zu klären, ob PLC γ an dem beobachteten Effekt auf die APP-Prozessierung beteiligt ist.

EP(X)1595 ist eines der EP-Elemente, dessen Effekt auf die Prozessierung von APP abhängig vom Alter der Fliegen ist. In frisch geschlüpften Fliegen war die Prozessierung kaum verändert, es kam lediglich zu einer leichten Anreicherung des Proteins voller Länge. In älteren Fliegen wurde dagegen eine deutliche Akkumulation des CTF festgestellt. Dieses EP-Element ist in den genomischen Locus des Gens *bendless* inseriert. Es codiert für eine Ubiquitin-Ligase, die eine Rolle in der Wegfindung der Axone spielt (Muralidhar et al. 1993; Oh et al. 1994). Der molekulare Mechanismus dieses Prozesses und die Substrate des Enzyms sind aber nicht bekannt. Es wäre also möglich, dass *bendless* APP modifiziert und so die Prozessierung reguliert. Für den Notch-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin eine Rolle für die Freisetzung der intrazellulären Domäne durch die γ -Sekretase spielt (Gupta-Rossi et al. 2004). Allerdings muss auch für dieses EP-Element noch gezeigt werden, dass es *bendless* reguliert.

Zusammengefasst konnten durch den genetischen Screen einige interessante Gene identifiziert werden, die Einfluss auf die APP Prozessierung nehmen. Es sind aber weitere Experimente

notwendig, um die Mechanismen dieser Interaktionen zu verstehen. Zu diesem Zweck wurden zwei der identifizierten EP-Elemente näher charakterisiert.

3.1.3 Die Kinase Hops/Tlk induziert die Degradation von APP

Das EP-Element EP(X)1408 induziert die Degradation von APP, ohne dass sich proteolytische Fragmente anreichern (Abb. 12). Da die Menge des cytoplasmatischen Proteins LacZ und anderer Kontrollen von der Überexpression des betroffenen Gens nicht beeinflusst werden, scheint der Effekt für APP spezifisch zu sein und nicht auf einer allgemeinen Beeinflussung des dualen Gal4-Systems zu beruhen. Mit Hilfe eines erzeugten Antikörpers konnte gezeigt werden, dass EP(X)1408 die Expression einer benachbarten Kinase aus der Familie der „Tousled-like“ Kinasen induziert (Abb. 13). Durch Verwendung der cDNA wurde dann bewiesen, dass diese auch für den beobachteten Effekt auf APP verantwortlich ist (Abb. 14).

Die erste Kinase dieser Familie wurde in *Arabidopsis thaliana* entdeckt. Mutationen im Gen *tousled* verursachten Defekte in der Blüten- und Blattmorphologie (Roe et al. 1993). Wie sich herausstellte, definiert diese Kinase eine konservierte Proteinfamilie („Tousled-like Kinasen“/Tlk), die in allen bisher untersuchten Genomen von *C. elegans* bis zu den Säugetieren gefunden werden kann. Über die zwei humanen Homologe Tlk1 und 2 ist bekannt, dass sie während des Zellzyklus reguliert werden (Sillje et al. 1999; Groth et al. 2003). Sie phosphorylieren zum Beispiel den „Chromatin Assembly Factor“ Asf1 und Histon H3 (Li et al. 2001; Sillje et al. 2001). In *C. elegans* wurde für Tlk eine essentielle Rolle für die Transkription durch RNA Polymerase II postuliert (Han et al. 2003). Mittlerweile wurde auch eine Funktion für Tlk in *Drosophila* publiziert (Carrera et al. 2003): Während der Embryogenese und der Endoreduplikation in den Speicheldrüsen führt der Verlust der Genaktivität zum Arrest des Zellzyklus in der Interphase. Die Überexpression der Kinase führt zur Veränderung in der Chromatinstruktur. Wiederum wurde Asf1 als Ziel der Phosphorylierung identifiziert. Die Autoren stellen ein Modell auf, in dem Tlk durch Phosphorylierung von Asf1 und anderer Substrate wie Histon H3 den Aufbau und die Struktur von Chromatin beeinflusst und so den Zellzyklus steuert.

Mit Blick auf diese Ergebnisse fällt es schwer, den Effekt von Tlk/Hops auf APP einzuordnen. Die einfachste Erklärung ist ein Einfluss auf die Transkription. Es konnte jedoch durch Northern Blot gezeigt werden, dass die Mengen der APP mRNA nicht signifikant verändert wird (Daten nicht gezeigt). Gegen eine Veränderung der Transkriptionsrate spricht auch, dass die Proteinmenge von APP durch Koexpression von Rab7 wieder erhöht werden kann (Abb. 23). Da dieses G-Protein den Transport in das Lysosom reguliert, müsste ein

Effekt auf die Transkription immer dominant über dessen Wirkung sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Tlk in verkürzter Form als SNARE-Kinase (SNAK) identifiziert wurde (Cabaniols et al. 1999). In dieser Studie wird eine Funktion der Kinase für die Fusion von Vesikeln mit ihren Zielmembranen vorgeschlagen. Es wäre also denkbar, dass in *Drosophila* Tlk neben der Kontrolle der Zellteilung und der Chromatinstruktur eine weitere Rolle in der Regulation des intrazellulären Transports spielt.

Mit einer möglichen dualen Funktion der Kinase steht auch die Beobachtung im Einklang, dass die Expression von Tlk/Hops nur zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Entwicklung einen Einfluss auf APP hat (Abb. 15). Da der Effekt in den postmitotischen Zellen des Puppenstadiums und des adulten Auges auftritt, würde dies gut mit einem Funktionswechsel der Kinase von der Kontrolle der Zellteilung zur Kontrolle von Transportvorgängen übereinstimmen. Diese Ergebnisse legen aber auch nahe, dass die Wechselwirkung von Tlk mit APP indirekt ist. Möglicherweise ist dies auch der Grund, warum keines der intrazellulären Motive von APP für die Tlk-induzierte Degradation notwendig ist (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression der Kinase Tlk führt also spezifisch zum Abbau von APP, der genaue Mechanismus dieser Wechselwirkung muss jedoch noch weiter untersucht werden.

3.1.4 dBeach1 beeinflusst die Prozessierung durch Veränderung der subzellulären Lokalisation von APP

Während EP(X)1408 die Degradation von APP induziert, führt die Expression von EP(2)2299 zur Akkumulation des CTF. Gleichzeitig wird die Menge des Proteins voller Länge reduziert (Abb. 16). EP(2)2299 ist im 5' nicht-translatierten Bereich des Gens *dBeach1* inseriert. Dieses Gen kodiert ein Protein mit konservierten Beach- und WD40-Domänen und einem FYVE-Finger (Abb. 17). Die gemeinsame Expression in den Speicheldrüsen zeigte, dass die subzelluläre Lokalisation von APP durch dBeach1 verändert wird. Vor allem die APP-Menge an der Zelloberfläche wird reduziert (Abb. 18). Die Analyse verschiedener Deletionen in der A^{ICD} ergab, dass sowohl für die Akkumulation des CTF, als auch für die Relokalisation in den Speicheldrüsen das NPTY-Motiv und darin Asparagin-684 vorhanden sein müssen (Abb. 19 und 20). Diese Aminosäure spielt eine entscheidende Rolle für die Endozytose von APP (Perez et al. 1999). Da dBeach1 über keine der bekannten Domänen verfügt, die an die A^{ICD} binden, und auch biochemisch keine Hinweise auf eine Interaktion der beiden Proteine gefunden werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass dBeach1 direkt für die Endozytose von APP verantwortlich ist. Die Ergebnisse lassen sich besser durch eine indirekte Wirkung von dBeach1 auf den Proteintransport erklären.

dBeach1 scheint also die Prozessierung von APP durch Veränderung der Lokalisation zu beeinflussen. Aber welche Proteaseaktivität ist davon betroffen? Wie bereits erwähnt, kann sowohl die Aktivierung der α -, als auch die Inhibition der γ -Sekretase zu einer Akkumulation des CTF führen. Zwei Ergebnisse sprechen dafür, dass dBeach1 zu verstärkter α -Sekretaseaktivität führt: Erstens nimmt die Menge an Protein voller Länge bei Überexpression von dBeach1 ab, was darauf hindeutet, dass dieses zu CTF umgesetzt wurde. Zweitens zeigte das *in-vivo* Reportersystem für die Prozessierung von APP keine verringerte Freisetzung der intrazellulären Domäne (Daten nicht gezeigt). Dies wäre aber bei Inhibition der γ -Sekretase zu erwarten.

Letztendlich stellt sich die Frage nach der Funktion von dBeach1 und den zellulären Prozessen, die es steuert. Zu Beginn dieser Arbeit war über das Gen *dBeach1* nur bekannt, dass die Überexpression des Proteins zu Veränderungen in der synaptischen Struktur führt (Kraut et al. 2001). Später wurde eine Studie über eine Mutation in *dBeach1* veröffentlicht (Finley et al. 2003): Der Verlust des Gens führt zu einer verkürzten Lebensspanne und zur altersabhängigen Bildung von Proteinaggregaten im zentralen Nervensystem (ZNS). Die Aggregate enthalten vor allem ubiquitin-konjugierte Proteine, aber erstaunlicherweise auch APPL, das *Drosophila* Homolog von APP. In älteren Fliegen nimmt die Größe des ZNS ab, wobei extensive neuronale Apoptose beobachtet wurde. Der neurodegenerative Phänotyp dieser Mutante von *dBeach1* (*blue cheese*) zusammen mit dem Auftreten von Proteinaggregaten erinnert an verschiedene humane neurodegenerative Erkrankungen.

dBeach1 gehört zu einer Proteinfamilie, die von der Hefe bis zu den Säugetieren konserviert ist. Das humane Homolog Alfy („autophagy-linked FYVE protein“) ist zu 46,6% identisch mit dBeach1, innerhalb der Beach-Domäne sogar zu 69,9%. Die Funktion von Alfy wurde in Zellkultur untersucht (Simonsen et al. 2004): Die meisten Proteine mit FYVE-Finger werden durch die Bindung von Phosphatidylinositol-3'-Phosphat an Endosome rekrutiert, deren Membranen dieses Lipid enthalten (Stenmark et al. 2002). Im Gegensatz dazu ist Alfy in HeLa-Zellen normalerweise an der cytoplasmatischen Seite der Kernmembran lokalisiert. Bei Nährstoffmangel oder Inhibition des Proteasoms bindet es an filamentöse cytoplasmatische Strukturen, die in der Nähe von autophagozytotischen Membranen und Aggregaten ubiquitiniertes Proteine zu finden sind. Die Autoren schlagen daher vor, dass Alfy den Abbau cytoplasmatischer Proteine durch Autophagozytose reguliert. Es ist jedoch nicht klar, ob dies die einzige Funktion von Alfy/Beach ist. Die Assoziation von Alfy mit autophagosomalen Proteinen wurde nur bei Nährstoffmangel beobachtet, und selbst dann war nur ein Teil des Proteins an diesen Strukturen lokalisiert. Außerdem wurde für dBeach1 publiziert, dass es in

den Photorezeptoren der larvalen Augenimaginalscheibe nicht mit dem Kern assoziiert ist, sondern im ganzen Zytoplasma bis zum Wachstumskegel des projizierenden Axons detektiert werden kann (Finley et al. 2003). Ein gemeinsamer Aspekt der beiden Studien ist aber, dass dBeach1/Alfy mit ubiquitinierten Proteinen interagiert und an deren Abbau beteiligt ist.

Ein weiteres gut untersuchtes Protein mit Beach-Domäne ist Lyst. Mutationen in diesem Protein verursachen beim Menschen das Chediak-Higashi-Syndrom und bei Mäusen den verwandten *beige*-Phänotyp (Nagle et al. 1996). Dabei kommt es zu einer starken Vergrößerung der Lysosomen, wodurch verringerte Pigmentierung, schwere immunologische Defizite und neurologische Defekte verursacht werden. Lyst ist ebenfalls ein sehr großes cytoplasmatisches Protein (450kDa), das wahrscheinlich als Adapterprotein die Fusion von Membranen am Lysosom reguliert (Tchernev et al. 2002). Da während der Autophagozytose cytoplasmatische Proteine von einer Isolationsmembran umschlossen werden, die dann mit den Lysosomen fusioniert, sind die beiden bisher bekannten Funktionen der Beach-Domäne eng miteinander verknüpft. Es könnte sein, dass dBeach1 unter physiologischen Bedingungen lysosomale Prozesse reguliert, bei Nährstoffmangel aber die Bildung von Autophagosomen unterstützt.

dBeach1 würde nach dieser Hypothese die Prozessierung von APP regulieren, indem es entweder zu einem verstärkten Transport in das Lysosom oder zu einem veränderten Stoffwechsel in diesem Kompartiment führt. Diese Sichtweise wird durch die Ergebnisse der Rab7-Aktivierung unterstützt. Die Expression der aktivierten Form dieses G-Proteins (Rab7^{QL}) führt zum verstärkten Transport internalisierter Membranproteine vom frühen Endosom in das späte Endosom/Lysosom (Entchev et al. 2000). Dies induziert, stärker noch als die Expression von dBeach1, die Akkumulation der CTF von APP (Abb. 21). Auch hier scheint vor allem die α -Sekretaseaktivität betroffen zu sein: Im Reportersystem ist keine Inhibition der γ -Sekretase zu erkennen, sondern eher eine leichte Verstärkung des GFP-Signals (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 Die Lokalisation von APP reguliert die Prozessierung

Viele der bisherigen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der subzellulären Lokalisation für die APP Prozessierung. Zusätzlich beeinflussen auch die Adapterproteine Numb und Disabled, die beide endozytotische Funktionen haben, die Prozessierung von APP (Abb. 21). Für das EP-Element EP(2)2316 wurde in den Speicheldrüsen gezeigt, dass es ähnlich wie dBeach1 sowohl die Prozessierung, als auch die Lokalisierung von APP verändert (Abb. 22). Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass dabei verschiedene Wege miteinander

konkurrieren. So scheint die von Hops/Tlk induzierte Degradation der lysosomalen Prozessierung, die von dBeach1 oder Rab7^{QL} stimuliert wird, entgegenzuwirken. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse in einem hypothetischen Modell zusammengefasst.

Aus verschiedenen Studien in Säugetierzellen ist bekannt, dass auch hier die Endozytose und der Transport in intrazelluläre Kompartimente eine entscheidende Rolle für die APP Prozessierung spielen (Nixon 2004). Änderungen in der Morphologie der Endosomen gehören

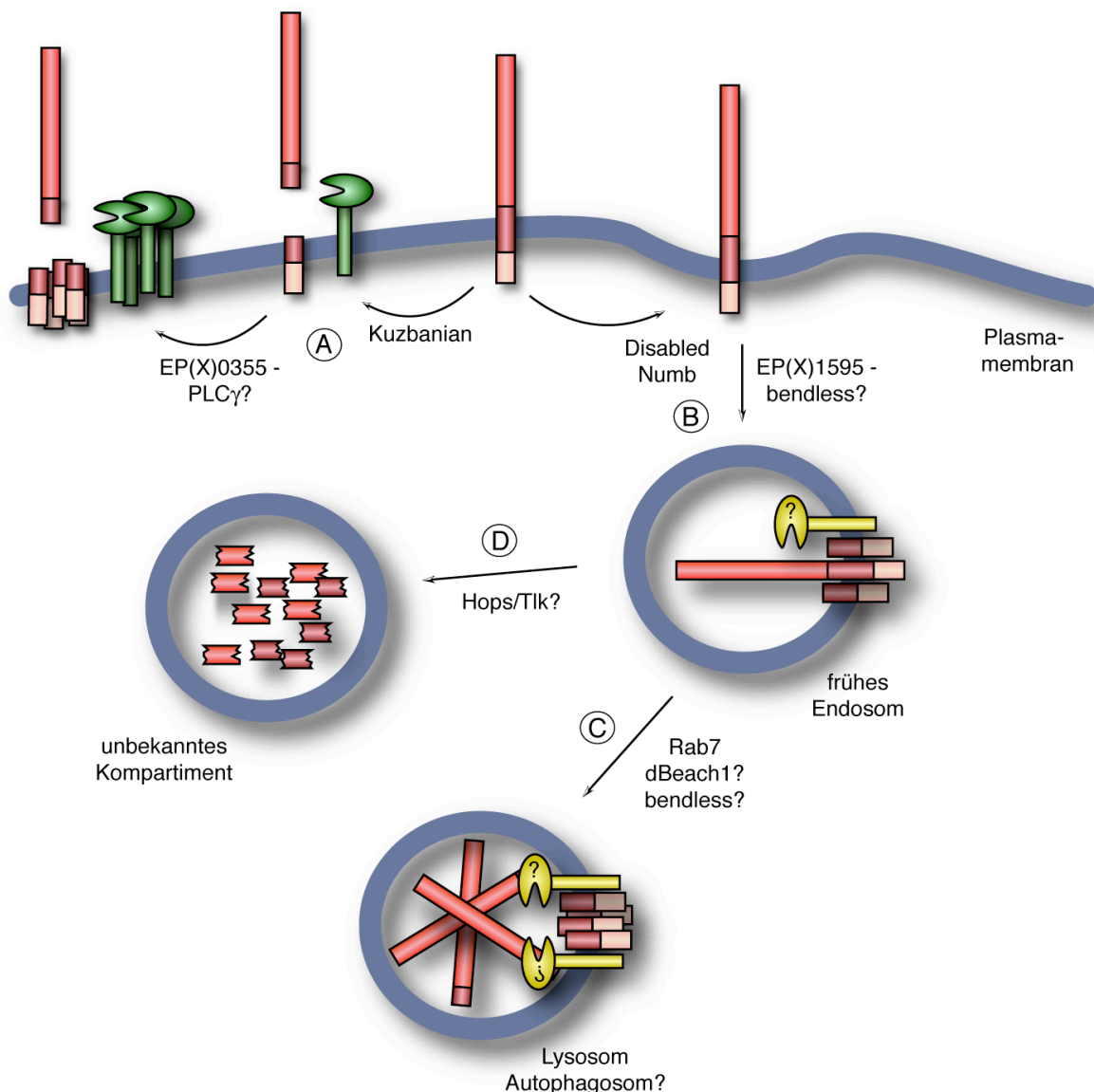


Abb. 43 Modell: APP Prozessierung wird durch die subzelluläre Lokalisation reguliert. Die Prozessierung von APP findet an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle statt. An der Zelloberfläche schneidet die Protease Kuzbanian an der α -Schnittstelle. Diese Aktivität kann durch Aktivierung der PKC verstärkt werden. Dieser Signalweg könnte der Angriffspunkt von EP(X)0355 sein, das eventuell die PLC γ *small wing* reguliert (A). Durch die Adapterproteine Disabled oder Numb kann die Endozytose von APP induziert werden. Eventuell spielt auch die Ubiquitinligase *bendless* (EP(X)1595) eine Rolle in diesen Prozess (B). Internalisiertes APP wird vom frühen Endosom in das späte Endosom/Lysosom transportiert. Dafür ist das kleine G-Protein Rab7 notwendig, möglicherweise spielt auch dBeach1 eine Rolle (C). Eine andere Funktion von dBeach1 könnte sein, im Lysosom die Prozessierung von APP zu verstärken. Ein alternativer Transportweg könnte APP in ein noch unbekanntes Kompartiment führen, wo es degradiert wird, ohne dass sich proteolytische Fragmente ansammeln. An diesem Prozess könnte die Kinase Hops/Tlk beteiligt sein (D).

zu den ersten pathologischen Merkmalen der Alzheimerschen Erkrankung (Cataldo et al. 1997; Cataldo et al. 2000). Im Gegensatz zu *Drosophila* scheint dabei die Lokalisierung von APP aber auch die Auswahl der Schnittstellen zu beeinflussen. Während die Endozytose von APP zu verstärkter Prozessierung an der β -Schnittstelle führt (Perez et al. 1999; Grbovic et al. 2003), scheint an der Zelloberfläche vor allem die α -Sekretase aktiv zu sein (Ono et al. 1997; Lammich et al. 1999). Leider kann diese Verteilung zwischen dem amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Abbauweg in *Drosophila* nicht nachvollzogen werden. Trotzdem können die in dieser Arbeit identifizierten Kandidaten einen Beitrag zum Verständnis der α -Sekretase-vermittelten Sekretion leisten. Bisher war nur der PKC-Signalweg als Regulator dieser Prozessierung bekannt. Möglicherweise bieten sich durch die Identifikation neuer Regulationsmechanismen Angriffspunkte für therapeutische Eingriffe. Studien in transgenen Mäusen haben bereits das Potential der α -Sekretase zur Verringerung der amyloiden Plaques gezeigt (Postina et al. 2004).

3.2 Zeitliche und räumliche Regulation der γ -Sekretase

3.2.1 Das *in-vivo* Reportersystem visualisiert spezifisch γ -Sekretase vermittelte Prozessierung

Ein Komplex aus den Proteinen Presenilin, Nicastrin, Aph1 und Pen2 vermittelt die Freisetzung der A^{ICD} (Periz et al. 2004). Diese vier Komponenten konnten durch biochemische und vor allem genetische Methoden identifiziert werden. Durch Studien in Zellkultur konnte der komplexe Reifungsprozess und viele der katalytische Eigenschaften entschlüsselt werden. Aber es ist noch unklar, ob und in welcher Weise die Aktivität dieser ungewöhnlichen Protease reguliert wird. Um dies im Kontext eines intakten Gewebes zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein auf GFP basierendes *in-vivo* Reportersystem verwendet (Abb. 6). Durch seinen modularen Aufbau kann dieses Reportersystem in verschiedenen Geweben eingesetzt werden und erlaubt den Vergleich der γ -Sekretaseaktivität verschiedener Zelltypen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Verwendung unterschiedlicher Fusionskonstrukte Aussagen über die Substratvoraussetzungen erlaubt.

Um aber die Eigenschaften der γ -Sekretase mit diesem Reportersystem untersuchen zu können, musste zuerst die Spezifität der generierten Signale für diese Proteaseaktivität sichergestellt werden. Sind die Voraussetzungen für die Intramembranproteolyse wie im Fall des Notch-Rezeptors bekannt, gibt es dafür eine einfache Lösung: Eine verkürzte Form dieses Proteins kann den Liganden nicht mehr binden und wird nicht mehr durch die extrazelluläre Spaltung aktiviert. Damit stellt sie eine Negativkontrolle für das Reportersystem dar. Da für

das entsprechende Konstrukt $N^{\text{AEGF/LV}}$ in keinem Gewebe Signale detektierbar waren, konnte die Spezifität des *in-vivo* Reporters für die Prozessierung von Notch gezeigt werden (Abb. 25 und 27).

Im Bezug auf die APP Prozessierung ist die Situation komplizierter. Es ist immer noch nicht bekannt, wodurch die erste extrazelluläre Proteolyse aktiviert wird. Die Spezifität für die γ -Sekretase-vermittelte Freisetzung der intrazellulären Domäne lässt sich daher nur beweisen, wenn der Proteasekomplex direkt inaktiviert wird. In Zellkultur gibt es dafür verschiedene Möglichkeiten: Die eleganteste Art ist es, Zelllinien zu verwenden, die weder Presenilin 1 noch Presenilin 2 exprimieren (Herreman et al. 2000). Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung spezifischer Inhibitoren (Li et al. 2000; Moore et al. 2000; Eggert et al. 2004). Die γ -Sekretase lässt sich in Zellkultur problemlos inaktivieren, da sie für diese Zellen nicht essentiell ist.

Während der Entwicklung eines Organismus wird die Protease jedoch als zentraler Bestandteil des Notch-Signalwegs benötigt. So können zwar in *Drosophila* durch genetische Methoden Embryonen erzeugt werden, die kein funktionelles Presenilin mehr kodieren, diese sterben jedoch früh in der Entwicklung (Ye et al. 1999). Um dieses Problem zu umgehen, gibt es die Möglichkeit, durch die Flp/FRT-Technik somatische Klone ohne Presenilin zu erzeugen (Xu et al. 1993). Im Laufe dieser Arbeit wurde zwar versucht, solche Klone für Presenilin und Nicastrin in der Augenimaginalscheibe zu induzieren, die erhaltenen Klone entwickelten sich aber auf Grund des fehlenden Notch-Signals nicht zu Neuronen (Daten nicht gezeigt). Da APP Prozessierung auf die Neuronen beschränkt ist, kann das Fehlen des Signals in diesen Klonen nicht als Beweis für die Spezifität dienen. Durch die Beschränkung auf mitotische Zellen kann diese Technik nicht angewendet werden, um Klone differenzierter Zellen zu erzeugen.

Auch γ -Sekretase Inhibitoren wurden schon in lebenden Organismen verwendet. Die Fütterung des Inhibitors DAPT induzierte in *Drosophila* und Zebrafisch Phänotypen, die dem Verlust der Notch-Aktivität entsprechen (Geling et al. 2002; Micchelli et al. 2003). Dabei wurde die Aktivität des Proteasekomplexes jedoch nur teilweise gehemmt. Obwohl die Entwicklung fast aller Gewebe in gewissem Maße von Notch abhängt, induzierte der Inhibitor vor allem einen Flügelphänotyp. Nur zwei Prozent der Fliegen zeigte auch eine Beeinträchtigung der Augenentwicklung. Es ist aber unklar, ob dies auf die Aufnahme, die Verteilung oder die Wirkung des Inhibitors zurückzuführen ist. Trotzdem wurde der Inhibitor zum Test des Reportersystems verwendet. In diesem Experiment konnten die beschriebenen Flügelphänotypen wie erwartet reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Das GFP-Signal in

den adulten Augen war aber nicht signifikant verändert. In den larvalen Imaginalscheiben war zwar ein Effekt auf das GFP-Signal zu erkennen, dieser war jedoch nur transient und wegen der Veränderungen in der Musterbildung und der Morphologie schwer zu interpretieren.

Um die beschriebenen Probleme zu umgehen, wurde schließlich ein RNAi-basierter Ansatz gewählt. Dabei wird die Expression von Nicastrin durch kleine, doppelsträngige RNAs verringert. Dies erfolgt in den selben Zellen, in denen auch das Fusionskonstrukt des Reportersystems exprimiert wird. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass das GFP Signal spezifisch für die γ -Sekretase-vermittelte Prozessierung von APP ist (Abb. 26). Die Menge des Reporters konnte durch die RNAi und Mutationen in Psn und Nct auf 40% der Kontrollmenge gesenkt werden. Leider konnte kein vollständiger Verlust des GFP-Signals gezeigt werden. Dies hat verschiedene Gründe: Einerseits verursacht RNAi bedingt durch den Mechanismus nur eine verringerte Expression, aber keinen vollständigen Verlust des Proteins. Andererseits sind sowohl der γ -Sekretase Komplex, als auch hrGFP stabile Proteine mit langen Halbwertszeiten (Ratovitski et al. 1997; Li et al. 1998). Dies spiegelt sich in dem Unterschied zwischen jungen und alten Fliegen wieder. Nach einer Woche ist die GFP-Menge deutlich stärker reduziert als direkt nach dem Schlüpfen. Zusammen mit der Kontrolle für Notch zeigt die deutliche Reduktion der Reporteraktivität aber, dass das Reportersystem spezifisch die γ -Sekretase-vermittelte Prozessierung visualisiert. Diese Resultate werden von einer anderen Studie gestützt, in der ein ähnliches Reportersystem für die APP Prozessierung als Hilfsmittel für genetische Screens verwendet wurde (Guo et al. 2003).

3.2.2 Zelltyp-Spezifität der APP Prozessierung

Mit dem *in-vivo* Reportersystem ist es möglich, die RIP in verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Gewebes zu vergleichen. Als Modellgewebe wurde in dieser Arbeit die larvale Augenimaginalscheibe gewählt. Sie hat den Vorteil, dass sowohl Zellen unterschiedlichen Typs als auch differenzierte mit undifferenzierten Zellen verglichen werden können. In all diesen Zellen kann die Expression mit dem selben Gal4-Treiber induziert werden. Die Visualisierung der RIP von Notch und APP zeigte gravierende Unterschiede (Abb. 27). Die Prozessierung von Notch wurde wie erwartet von der Bindung des Liganden kontrolliert. Delta ist in dieser Imaginalscheibe vor allem in der morphogenetischen Furche exprimiert (Daten nicht gezeigt, (Parks et al. 1995)). Dort aktiviert es den Notch Signalweg und führt zur Restriktion des neuronalen Schicksals auf wenige Zellen. Da alle Zellen mit aktivem, also prozessiertem Notch Rezeptor im undifferenzierten Zustand gehalten werden, kann auch nur in diesen Zellen ein GFP-Signal detektiert werden (Abb. 28).

Für APP ist nicht bekannt, wodurch die Sekretion der Ektodomäne und die anschließende Freisetzung der intrazellulären Domäne ausgelöst wird. Daher war es unerwartet, dass effiziente Prozessierung nur in den neuronalen Zellen visualisiert werden konnte (Abb. 28). Auf zwei verschiedene Weisen wurde gezeigt, dass die unterschiedliche Effizienz der Prozessierung durch regulierte γ -Sekretaseaktivität verursacht wird (Abb. 29): Zuerst wurden die α - und β -Sekretasen zusammen mit APP überexprimiert. Obwohl dadurch nachweislich die Menge an CTF, den Substraten für die γ -Sekretase, stark ansteigt, wird das GFP-Signal nicht verstärkt. Um die Notwendigkeit der extrazellulären Prozessierung vollständig zu umgehen, wurde ein verkürztes Konstrukt verwendet, das dem von der β -Sekretase erzeugtem CTF entspricht. Auch dieses Konstrukt aktivierte den GFP-Reporter nur in Neuronen.

Diese Ergebnisse weichen von bekannten Arbeiten ab, in denen in fast allen untersuchten Zelltypen APP Prozessierung beobachtet wurde. Wie lassen sich diese Unterschiede erklären? Eine Möglichkeit ist, dass die Sensitivität des Reportersystems im Vergleich zu den häufig verwendeten immunologischen Nachweismethoden wie ELISA relativ gering ist. Daher würde eine schwache, in allen Zellen vorhandene APP Prozessierung unterhalb der Detektionsschwelle des Systems liegen. Die geringe Sensitivität bietet aber den Vorteil, dass leichter Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen erkannt werden können. In den neuronalen Zellen wird APP effizienter prozessiert, so dass hier die Menge der freigesetzten A^{ICD} ausreichend ist, ein GFP-Signal zu erzeugen. Bisher sind keine anderen Studien veröffentlicht, die direkt die Prozessierung in verschiedenen Zelltypen vergleichen. Zwar wurde in *Drosophila* ein ähnliches Reportersystem von G. Struhl und Mitarbeitern eingesetzt, doch kamen auch hier wieder sehr sensitive Nachweismethoden zum Einsatz, die eine quantitative Analyse erschweren (Struhl et al. 2000). So wurde der verwendete Reporter LacZ immunologisch unter Verwendung einer enzymatischen Reaktion detektiert. Dadurch konnte eine gleichmäßige APP Prozessierung im gesamten Embryo nachgewiesen werden. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete GFP-Reportersystem zeigt in diesem Gewebe jedoch nur sehr schwache Signale. Dies könnte bedeuten, dass die von G. Struhl beschriebene Prozessierung eine konstitutive Aktivität in allen Zellen darstellt. Diese ist jedoch wesentlich geringer als die Prozessierung in spezialisierten Zellen. Durch die flexible Expression und die geringe Sensitivität des Reportersystems konnte entdeckt werden, dass neuronale Zellen solch eine verstärkte APP-Prozessierung zeigen.

Die A^{ICD} kann zusammen mit FE65 und Tip60 transkriptionelle Prozesse beeinflussen (Cao et al. 2001; Cao et al. 2004). Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die Bindung eines Repressors an die intrazelluläre Domäne die Aktivierung von GFP in den nicht-determinierten

Zellen verhindert. Diese Möglichkeit ist aber aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich. Erstens ist nicht klar, ob A^{ICD} in den Kern gelangt oder ob ihre Wirkung auf der Änderung der FE65-Konformation an der Membran beruht (Cao et al. 2004). Zweitens wurde einer der stärksten Transaktivatoren für die Fusionkonstrukte ausgewählt, um dieses Problem zu umgehen. So konnte gezeigt werden, dass die Fusion der transaktivierenden Domäne von VP16 den Repressor Su(H) in einen Aktivator umwandeln kann (Furriols et al. 2000). Leider gelang es nicht, durch direkte Expression der A^{ICD} die Bindung eines Repressors in undifferenzierten Zellen auszuschließen, da das entsprechende Fusionskonstrukt zu instabil war (Daten nicht gezeigt). Zwar konnte durch eine Fusion mit dem rot fluoreszierenden Protein mRFP ein in Zellkultur stabiles Protein erzeugt werden, aber im adulten Auge von *Drosophila* wurde auch dieses Konstrukt nur so schwach exprimiert, dass keine Aussage über die Aktivität im Reportersystem möglich war (Daten nicht gezeigt). Aus den oben genannten Gründen kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Zelltyp-Spezifität auf Unterschiede in der Prozessierung zurückzuführen ist.

3.2.3 Welche Eigenschaften bestimmen die Erkennung durch den γ -Sekretasekomplex?

APP und Notch sind nicht die einzigen Proteine, die von der γ -Sekretase prozessiert werden. Mittlerweile sind eine ganze Reihe Typ-I Transmembranproteine identifiziert worden, die Substrate für den Proteasekomplex sind. Es stellt sich daher die Frage, welche Kriterien für die Substraterkennung in verschiedenen Zelltypen entscheidend sind. In der oben erwähnten Arbeit von Struhl et al. wurde postuliert, dass die Prozessierung durch die γ -Sekretase nur durch die Länge der extrazellulären Domäne reguliert wird. Jedes Typ-I Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne kürzer als 200 AS ist, soll von der γ -Sekretase erkannt werden. Bei einer Länge von 50 AS oder weniger wird die maximale Effizienz erreicht (Struhl et al. 2000). Dies führte zu der Hypothese, dass der Presenilinkomplex unspezifisch als „Proteasom der Membran“ fungiert, um Fragmente von extrazellulär prozessierten Transmembranproteinen zu entfernen (Kopan et al. 2004).

Die zelltyp-spezifische Prozessierung von APP legt dagegen nahe, dass es neben der Länge der extrazellulären Domäne noch weitere Faktoren gibt, die die Freisetzung der intrazellulären Domäne während der RIP kontrollieren. Daher wurde durch den Vergleich verschiedener Substrate untersucht, welche Eigenschaften des Substrats für die Erkennung durch den Presenilinkomplex entscheidend sind. Als weitere Substrate wurden APLP2 und APPL ausgewählt. Auch diese Proteine wurden nur in bestimmten Zelltypen der

Augenimaginalscheibe prozessiert (Abb. 33). Doch die Überexpression der Sekretase BACE zeigte deutliche Unterschiede (Abb. 34 und 35, Tab. 5): Während bei APP und APPL im Auge die Prozessierung unverändert bleibt, wird bei vorhergehendem β -Schnitt deutlich mehr APLP2^{ICD} freigesetzt. Diese Verhältnisse sind in der Flügelimaginalscheibe umgekehrt. Hier wird die Intramembranproteolyse von APPL durch gleichzeitige Expression von BACE verstärkt.

Tab. 5 Unterschiedliche Auswirkung von BACE auf die RIP von APP, APLP2 und APPL. Die Symbole repräsentieren in der Reihenfolge -- < ~ < + < +++ steigende Signalstärke.

		APP	APLP2	APPL
Auge	+ BACE	+	+	~
	- BACE	+	+++	~
Flügel	+ BACE	--	+	+
	- BACE	--	+	+++

Da in diesen Experimenten die Proteine voller Länge verwendet wurden, war die Prozessierung durch die γ -Sekretase von der vorherigen Sekretion der Ektodomäne abhängig. Um diese Notwendigkeit zu umgehen und für alle drei Proteine γ -Sekretase Substrate mit definierten Eigenschaften zu erzeugen, wurden die Δ EC-Fusionskonstrukte hergestellt (Abb. 36). Diese haben nach Abspaltung des Signalpeptids eine extrazelluläre Domäne von 13-15 AS Länge. Werden diese Konstrukte in der Augenimaginalscheibe exprimiert, zeigt das Reportersystem für APP und APLP2 das selbe Signalmuster wie für die Proteine voller Länge. Ganz anders bei APPL: Während das Protein voller Länge kaum prozessiert wird, scheint APPL ^{Δ EC/LV} ein sehr gutes Substrat für RIP zu sein, da in fast allen Zellen ein starkes GFP-Signal detektiert wird (Abb. 37 und Tab. 6).

Tab. 6 Zusammenfassung der Resultate des Reportersystems im adulten Auge

	APP	APLP2	APPL
Volllänge	+ neuronale Zellen	+ neuronale Zellen	~
+ BACE	+ neuronale Zellen	+++ undifferenzierte Zellen	~
Δ EC	+ neuronale Zellen	+ neuronale Zellen	+++ alle Zellen

Die beschriebenen Resultate des Reportersystems zeigen, dass die Aktivität der γ -Sekretase von drei Faktoren abhängt:

- dem Zelltyp
- der exakten Länge der extrazellulären Domäne des Substrats
- der Aminosäuresequenz des Substrats

In verschiedenen Zellen und Geweben wird ein definiertes Substrat mit unterschiedlicher Effizienz prozessiert. Dies wird sowohl durch die unterschiedliche APP Prozessierung in Neuronen und undifferenzierten Zellen in der Augenimaginalscheibe gezeigt, als auch durch die unterschiedliche Effizienz, mit der β -Sekretase-geschnittenes APPL in der Augen- und Flügelimaginalscheibe erkannt wird.

Die Länge der extrazellulären Domäne des CTF beeinflusst die Effizienz, mit der es in einem bestimmten Zelltyp prozessiert wird. Dies wird durch die unterschiedlichen GFP-Signale belegt, die von APLP2^{AEC/LV} und dem β CTF von APLP2^{LV} erzeugt werden (Tab. 6). Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Konstrukten sind die zusätzlichen Aminosäuren in der extrazellulären Domäne des β CTF. Dabei ist zu beachten, dass beide CTF deutlich unter der postulierten Grenze von 50 AS liegen. Alternativ könnte diese Beobachtung durch den räumlichen Unterschied in der Produktion der beiden CTF erklärt werden. Während BACE wahrscheinlich erst in endozytotischen Kompartimenten aktiv ist (Huse et al. 2000), wird APLP2^{AEC/LV} bereits nach Abspaltung des Signalpeptids im endoplasmatischen Retikulum zum Substrat für die γ -Sekretase. Es sprechen allerdings verschiedene Argumente gegen diese Möglichkeit: Erstens führt die Koexpression der α -Sekretase Kuzbanian nicht zu einer Veränderung der Signale, obwohl die so erzeugten CTF auch erst auf der Plasmamembran oder in Endosomen entstehen. Zweitens ist der γ -Sekretasekomplex unter physiologischen Bedingungen erst nach der komplexen Maturierung im sekretorischen Weg aktiv (Chyung et al. 2004).

Aber auch die Aminosäuresequenz des Substrats ist für die Erkennung durch die γ -Sekretase von Bedeutung. Die drei Konstrukte APP^{AEC/LV}, APLP2^{AEC/LV} und APPL^{AEC/LV} unterscheiden sich in ihrer Länge nur um zwei Aminosäuren, aber nur APPL^{AEC/LV} wird in allen Zellen der Augenimaginalscheibe effizient umgesetzt (Tab. 6). Es wäre nun interessant zu wissen, welcher Teil des CTF für diesen Unterschied verantwortlich ist. Entsprechende Versuche mit schimären Konstrukten, in denen die Domänen verschieden kombiniert sind, werden momentan in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

3.2.4 Wie wird die Spezifität der γ -Sekretase reguliert?

Die beschriebenen Ergebnisse werfen die Frage auf, wie die Aktivität der γ -Sekretase reguliert werden kann. Eine Möglichkeit ist, dass eine unterschiedliche Zusammensetzung des Proteasekomplexes für die unterschiedliche Aktivität verantwortlich ist. In Säugetieren existieren neben den zwei Presenilin Paralogen auch zwei Formen von Aph-1 (Aph-1a und b). Biochemisch konnte gezeigt werden, dass durch Kombination der verschiedenen Proteinformen mindestens sechs verschiedene Komplexe entstehen können (Shirotani et al. 2004). In Mäusen werden die Komponenten der γ -Sekretase differentiell exprimiert. Da auch innerhalb einer Zelle verschiedene Komplexe nachgewiesen werden konnten, wird verdeutlicht, dass es sich bei der γ -Sekretase um eine heterogene Familie von Proteinkomplexen handelt (Hebert et al. 2004). Die unterschiedliche Zusammensetzung der Komplexe hat auch physiologische Auswirkungen (Serneels et al. 2005). Der Verlust von Aph-1a führt in Mäusen zu Letalität, der Phänotyp entspricht aber nur in einigen Geweben dem Verlust beider Presenilingene. In anderen Geweben ist die γ -Sekretaseaktivität weniger stark beeinträchtigt. Der Verlust von Aph-1b ist lebensfähig, zeigt aber einen sehr interessanten Einfluss auf die APP Prozessierung: In bestimmten Teilen des Gehirns kommt es zur Akkumulation der CTF, was auf eine Inhibition der γ -Sekretase-vermittelten Prozessierung schließen lässt. Das bedeutet, dass der Verlust des Aph-1b-enthaltenden Komplexes in diesem Fall stärkere Auswirkungen auf die APP Prozessierung im Gehirn als auf die Notch-Prozessierung während der Entwicklung hat. Ein weiteren Hinweis auf die physiologisch unterschiedliche Rolle der Komplexe liefert ein Rattenmodell für neurologische Krankheiten. Die verringerte Expression von Aph-1b durch eine Veränderung des genomischen Locus induziert in diesem System pathophysiologische Phänotypen und Verhaltensdefizite, die Aspekte der Schizophrenie widerspiegeln. Dabei konnte eine verringerte Aktivität des Proteasekomplexes festgestellt werden. (Coolen et al. 2005). Beide Studien legen also nahe, dass verschiedene γ -Sekretasekomplexe unterschiedliche biologische Funktionen ausüben.

In *Drosophila* existieren keine Paraloge der verschiedenen γ -Sekretasekomponenten, allerdings wurden verschiedene Spleißformen identifiziert (Nowotny et al. 2000; Krause et al. 2002). Für die alternativen Spleißformen von Presenilin ist bekannt, dass sie während der Entwicklung differentiell exprimiert werden (Nowotny et al. 2000). Es wurde daher untersucht, ob die unterschiedliche Aktivität der γ -Sekretase in der Augen- und Flügelimaginalscheibe mit dem alternativen Spleißen korreliert. In der RT-PCR konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 38). Da aber auch in der Augenimaginalscheibe

nur wenige Zellen erhöhte Prozessierung von APP zeigen, ist eine Methode mit höherer Auflösung, eventuell sogar die Analyse einzelner Zellen notwendig, um eine endgültige Aussage treffen zu können.

Neben der Zusammensetzung des Komplexes könnten auch posttranslationale Modifikationen die Aktivität der Protease regulieren. Presenilin zum Beispiel kann vor allem in der zytoplasmatischen Schleife phosphoryliert werden (De Strooper et al. 1997; Seeger et al. 1997). An dieser Stelle finden sich auch viele der FAD-Mutationen. Interessanterweise wird die Prozessierung von APP verringert, wenn Zellen mit dem Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK3 β) – Inhibitor Lithium behandelt werden. Die Prozessierung von Notch bleibt jedoch unverändert (Phiel et al. 2003). Dieses Beispiel zeigt, dass Phosphorylierung die Aktivität der γ -Sekretase modulieren können.

Eine Möglichkeit, die Eigenschaften eines definierten Komplexes zu untersuchen, ist die Überexpression der vier Kofaktoren. Wie in der Einleitung beschrieben, kann so in Zellkultur die γ -Sekretase rekonstituiert werden. Zur Rekonstitution *in-vivo* wurden die entsprechenden cDNAs unter Kontrolle von UAS zusammen mit dem Reportersystem exprimiert (Abb. 40).

Die gesteigerte Proteaseaktivität war gut an dem minimalen Notchkonstrukt N ^{Δ ECACT/LV} zu beobachten (Abb. 41). Aber der Vergleich der APP-Familie zeigte, dass dieser definiert rekonstituierte Komplex die verschiedene Substrate mit unterschiedlicher Effizienz bindet und umsetzt (Abb. 42 und Tab. 7). Während die Prozessierung von APP ^{Δ EC/LV} von der Überexpression nicht verändert wird, katalysiert dieser Komplex die effiziente Freisetzung der intrazellulären Domäne von APLP2 ^{Δ EC/LV} (Abb. 44). Dagegen verursacht er den Verlust des von APPL ^{Δ EC/LV} erzeugten GFP-Signals. Dies kann nur bedeuten, dass APPL ^{Δ EC/LV} zwar von der Protease gebunden, aber nicht mehr umgesetzt wird. Da der überexprimierte Komplex im Überschuss vorhanden ist, kompetitiert diese Bindung mit der endogenen Protease, so dass keine Freisetzung der intrazellulären Domäne mehr stattfinden kann (Abb. 44).

Tab. 7 Aktivität des Reportersystems nach Rekonstitution der γ -Sekretase

	APP ^{EC/LV}	APLP2 ^{EC/LV}	APPL ^{EC/LV}
endogene γ -Sekretase	+	+	+++
rekonstituierte γ -Sekretase	+	+++	--

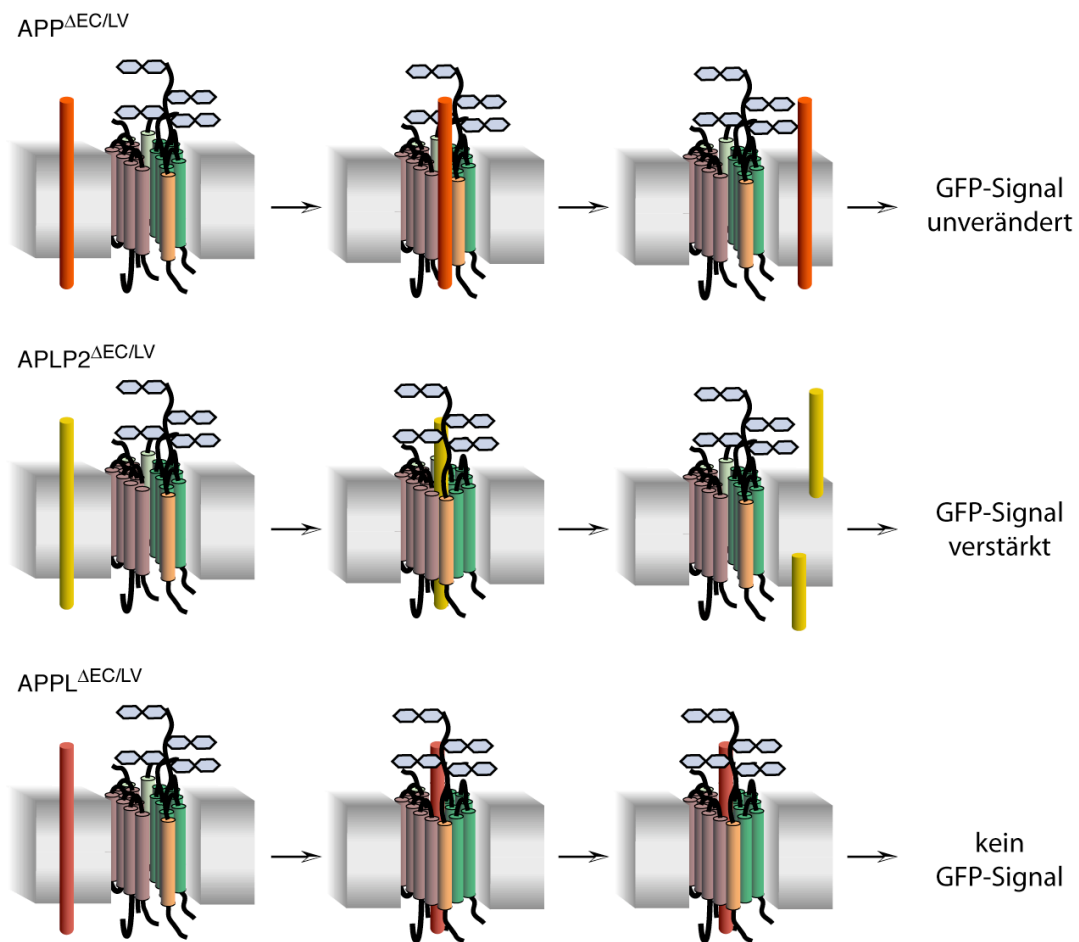


Abb. 44 Die rekonstituierte γ -Sekretase kann nur APLP2 prozessieren. Die durch Überexpression der vier Kofaktoren rekonstituierte γ -Sekretase erkennt $APP^{\Delta EC/LV}$ nicht als Substrat. $APLP2^{\Delta EC/LV}$ wird dagegen gebunden und prozessiert. $APPL^{\Delta EC/LV}$ wird zwar auch erkannt und gebunden, aber nicht umgesetzt.

Die präsentierten Ergebnisse legen zwei Modelle für die Regulation der γ -Sekretase nahe: Im ersten Modell werden durch alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifikationen Komplexe mit unterschiedlichen Substratbindestellen gebildet. Zelltyp-spezifische Kombinationen dieser Veränderungen erklären die unterschiedliche Effizienz, mit der die Substrate in verschiedenen Zellen prozessiert werden (Abb. 45). In Zellkultur konnten Studien mit Inhibitoren bereits die Existenz einer separaten Bindestelle zeigen, die räumlich vom aktiven Zentrum getrennt ist (Beher et al. 2003; Kornilova et al. 2005).

Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein zusätzlicher Faktor die Bindung des Substrats an den Proteasekomplex vermittelt. Verschiedene Faktoren sind für die Bindung der unterschiedlichen Substrate zuständig. Differentielle Expression der vermittelnden Faktoren verursacht die Zelltyp-Spezifität der Prozessierung. Zum Beispiel wäre dieser Faktor für APP nur in Neuronen in limitierender Menge vorhanden. Dadurch wäre erklärbar, warum trotz erhöhter Menge des Substrats (CTF) und der Protease keine verstärkte Freisetzung der intrazellulären Domäne erfolgt. Für andere Substrate wie APLP2 und Notch wäre ein

vermittelnder Faktor ubiquitär vorhanden, so dass verstärkte Prozessierung beobachtet werden kann. Auch eine Kombination der beiden Mechanismen ist nicht ausgeschlossen.

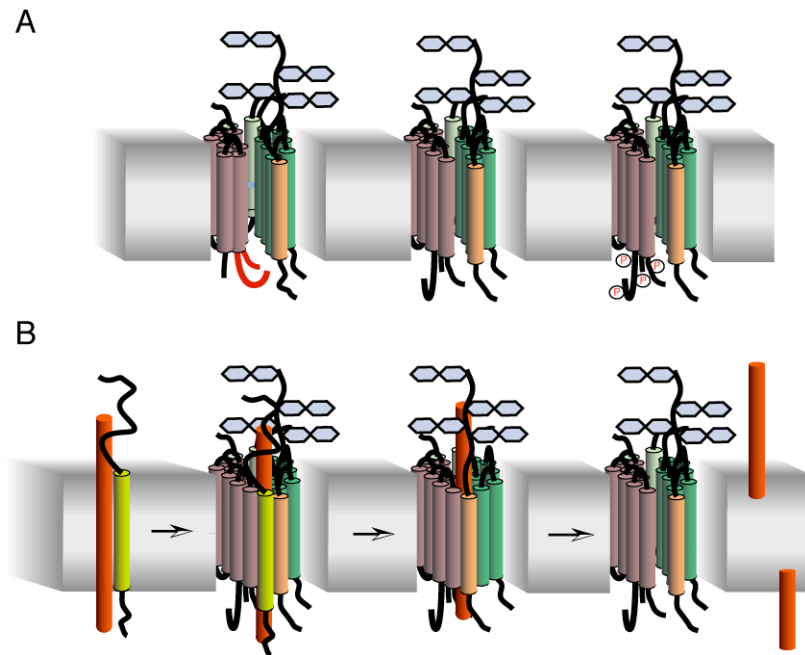


Abb. 45 Modell der zelltyp-spezifischen Modifikation der γ -Sekretase-vermittelten Intramembranproteolyse. A) Durch alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifikationen wird die Substratbindestelle des Komplexes verändert, so dass nur bestimmte Substrate gebunden werden können. B) Ein zusätzlicher Faktor vermittelt die Bindung des Substrats an den Komplex und ermöglicht so die Prozessierung. Dieser Faktor ist spezifisch für ein einzelnes oder eine Gruppe von Substraten.

Die verschiedenen Modelle könnten mit Hilfe des *in-vivo* Reportersystems in *Drosophila* untersucht werden. Zur Untersuchung des alternativen Spleißens und der posttranslationalen Modifikationen könnte die Rekonstitution der γ -Sekretase verwendet werden. Dazu müssten die cDNAs der verschiedenen Spleißformen, bzw. cDNAs mit Mutationen in den modifizierten Aminosäureresten zusammen mit dem Reportersystem exprimiert werden. Die Analyse der verschiedenen Kombinationen mit den unterschiedlichen Fusionskonstrukten sollte es erlauben, die Spezifität des jeweiligen Komplexes zu klären. Durch ein genomisches Rettungskonstrukt könnten dann die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die physiologische Funktion des Proteasekomplexes ermittelt werden.

Sollte es einen vermittelnden Faktor für die APP Prozessierung geben, ließe sich dieser durch einen genetischen Screen identifizieren. Mit Hilfe des Reportersystems könnte dabei spezifisch nach Mutationen gesucht werden, die nur die Proteolyse von APP hemmen, den Notch-Signalweg aber unbeeinflusst lassen. Dafür stehen bereits Fliegen zur Verfügung, die das gesamte Reportersystem auf einem Chromosom kombiniert haben. Dies erlaubt es, durch die FRT/Flp-Technik somatische Klone für Mutationen auf einem der anderen Chromosomen zu erzeugen und deren Effekt auf das GFP-Signal zu analysieren (Stowers et al. 1999).

3.3 Ausblick

Die Prozessierung von APP ist ein komplexer zellulärer Mechanismus, der an verschiedenen Stellen reguliert werden kann. Um therapeutische Eingriffe in diesen Prozess zu ermöglichen, müssen dessen molekulare Grundlagen verstanden werden. Dabei können Modellsysteme wie *Drosophila* von großem Wert sein. Ergebnisse, die aus der Untersuchung dieser Organismen resultieren, müssen jedoch auf ihre Übertragbarkeit auf das Säugetiersystem und vor allem auf ihre Gültigkeit im Menschen untersucht werden. Daher müssen auch dieser Arbeit weitere Studien folgen, die äquivalente Untersuchungen zum Beispiel im Mausmodell durchführen. Sollten sich die erhaltenen Ergebnisse als übertragbar erweisen, stellen sie jedoch ein großes Potential dar.

Die Identifizierung neuer Regulatoren der α -Sekretaseaktivität bietet die Möglichkeit, nach neuen pharmakologischen Angriffspunkten zu suchen. Hierbei bildet im Besonderen die Stimulation der α -Sekretase einen viel versprechenden Ansatz, um die Produktion von A β zu verhindern.

Lange Zeit fokussierte sich die Suche nach wirksamen Therapeutika auf Inhibitoren der γ -Sekretase. Leider stellte sich heraus, dass diese durch den negativen Einfluss auf Notch und andere Signalwege schwere Nebenwirkungen verursachen können. Die Resultate des Reportersystems zeigen jedoch, dass die Aktivität dieser Protease spezifisch für einzelne Substrate regulierbar ist. Dadurch entsteht neue Hoffnung, die Produktion von A β ohne die Beeinträchtigung lebenswichtiger Signalwege inhibieren zu können.

4 Material

4.1 Bakterienstämme

Epicurian Coli [®] XL1-Blue	Hersteller: Stratagene. Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^qZΔM15</i> TN10(Tet ^r)]
YZ2000	<i>E. coli</i> Stamm für die ET-Rekombination. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von F. Stewart (EMBL, Heidelberg). Genotyp: F <i>thr-1 leuB-6 phi-1 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 mtl-1 proA2 his-4 argE3 rpsL31 tsx-33 supE44 recB21 recC22 sbcA23 his-328 lambda⁻ sbcA, recBC, lacI-Z, mcrA, mcrBC, mrr, hsdMRS</i>
BL21(DE3)	Hersteller: Stratagene. Genotyp: B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal lambda</i> (DE3)

4.2 Fliegenstämme

B = *Drosophila* Stock Center Bloomington, Indiana, USA

P = Stammsammlung Labor Paro

M = Gunter Merdes (unveröffentlicht)

4.2.1 Wildtyp und Balancer

Genotyp	Donor
<i>w[1118]</i>	P
<i>w[1118]; Bc Gla/CyO</i>	B
<i>w[1118]; Sp/CyO; Sb/TM,Ubx</i>	P
<i>w[1118]; Sp/CyO,Gfp; Sb/TM,Ser Gfp</i>	B

4.2.2 Gal4-Treiberlinien

Gal4-Linie	Genotyp	Donor
ap-Gal4	<i>y[1] w[1118]; P{w⁺m^W.hs=GawB}ap^{md544}/CyO</i>	(Weihe et al. 2001)
GMR-Gal4 (II)	<i>w[1118]; P{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR}12</i>	B
GMR-Gal4 (III)	<i>w[1118];Bc Gla/CyO;P{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR}III</i>	M
Gal4 ^{231.4}	<i>w[1118]; P{w⁺m^W.hs=GawB}231.4/CyO; MKRS/TM,Tb</i>	J. Grosshans

4.2.3 UAS-Linien

Genotyp	Donor
<i>w[1118]; Bc Gla/CyO; P{UAS-Kuz}</i>	(Pan et al. 1997)
<i>w[1118]; +; P{UAS-Kuz.DN}</i>	(Pan et al. 1997)
<i>w[1118]; P{UAS-BACE}</i>	P. Soba
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP}</i>	(Fossgreen et al. 1998)

<i>w[1118]; P{UAS-APLP2}</i>	(Merdes et al. 2004)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APPL}</i>	(Torroja et al. 1999)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP.ΔBASS}</i>	(Soba 2004)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP.ΔGo}</i>	(Soba 2004)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP.ΔPEER}</i>	(Soba 2004)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP.ΔNPTY}2A</i>	(Soba 2004)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP.Y682A}1B</i>	(Soba 2004)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP.N684A}27B</i>	(Soba 2004)
<i>w[1118]; +; P{UAS-APP.Y687A}2B</i>	(Soba 2004)
<i>w[1118]; P{UAS-LacZ}</i>	M
<i>w[1118]; +; P{UAS-Rab7.QL}/CyO</i>	(Entchev et al. 2000)
<i>w[1118]; P{UAS-Dab}18</i>	(Gertler et al. 1993)
<i>w[1118]; P{UAS-Numb}/CyO</i>	(Frise et al. 1996)
<i>w[1118]; P{UAS-NmycPsn}P3L</i>	M. Fortini, unveröffentlicht
<i>w[1118]; +; P{UAS-NmycNct}P6L</i>	M. Fortini, unveröffentlicht
<i>w[1118]; P{UAS-Aph1V5}P3</i>	M. Fortini, unveröffentlicht
<i>w[1118]; +; P{UAS-Pen2FLAG}P3L</i>	M. Fortini, unveröffentlicht
<i>w[1118]; P{UAS-NmycPsn}P3L P{UAS-Aph1V5}P3/Cyo; Sb/TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; Sp/CyO; P{UAS-NmycNct}P6L P{UAS-Pen2FLAG}P3L</i>	M. Fortini, unveröffentlicht
<i>w[1118]; P{UAS-NmycPsn}P3L P{UAS-Aph1V5}P3/Cyo; P{UAS-NmycNct}P6L P{UAS-Pen2FLAG}P3L</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{UAS-Hops.FLAG} – verschiedene Linien</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{UAS-Hops.K956EFLAG} – verschiedene Linien</i>	diese Arbeit

4.2.4 EP-Elemente

Genotyp

<i>w[1118] P{EP}EP0355</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118] P{EP}EP1408</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118] P{EP}EP1595</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118]; P{EP}EP1221</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118]; P{EP}EP2002</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118]; P{EP}EP2054</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118]; P{EP}EP2105</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118]; P{EP}EP2299</i>	(Rorth et al. 1998)
<i>w[1118]; P{EP}EP2301 – zwei P-Elemente!</i>	(Rorth et al. 1998)

Donor

w[1118]; P{EP}EP2316 (Rorth et al. 1998)

w[1118]; P{EP}EP0816 (Rorth et al. 1998)

4.2.5 FAD-Psn-Linien

Genotyp

w[1118]; P{PEPC-Psn.WT}34; Psn[B3]/TM6c

w[1118]; P{PEPC-Psn.L235P}03; Psn[B3]/TM6c

w[1118]; P{PEPC-Psn.L235P}06; Psn[B3]/TM6c

w[1118] P{PEPC-Psn.E280A}1B; +; Psn[B3]/TM6c

w[1118]; P{PEPC-Psn.E280A}22; Psn[B3]/TM6c

w[1118]; +; Psn[B3]/TM6c

Donor

M. Fortini,
unveröffentlicht

M. Fortini,
unveröffentlicht

M. Fortini,
unveröffentlicht

M. Fortini,
unveröffentlicht

M. Fortini,
unveröffentlicht

M. Fortini,
unveröffentlicht

4.2.6 Mutanten und RNAi

Genotyp

w[1118]; P{GMR-NctRNAi}9/TM3

y[1] w[1118] P{hs-Flp}; +; ps^{Cl} FRT2A/TM3

y[1] w[1118] P{hs-Flp}; +; FRT82 nct^{R46}/TM,Tb

y[1] w[1118] P{hs-Flp}; +; ps^{Cl} FRT2A nct^{R46}/TM,Tb

w[1118]; P{EP}EP2299 dBeach1^{1-5c}

Donor

(Guo et al. 2003)

G. Struhl

G. Struhl

G. Struhl

diese Arbeit

4.2.7 Reportersystem

Genotyp

w[1118]; P{UAS-APP.LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-SPA4CT.LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-N.LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-N.ΔEGF/LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-LexAVP16} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-N.S2ACT/LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-APLP2.LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-APPL.LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-APP. ΔEC/LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-APLP2. ΔEC/LV} – verschiedene Linien

w[1118]; P{UAS-APPL. ΔEC/LV} – verschiedene Linien

Donor

(Loewer 2001)

(Loewer 2001)

(Loewer 2001)

(Loewer 2001)

(Loewer 2001)

(Kuttenkeuler 2003)

(Kuttenkeuler 2003)

(Kuttenkeuler 2003)

diese Arbeit

diese Arbeit

diese Arbeit

<i>w[1118]; P{UAS-N. ΔEACT/LV}</i> – verschiedene Linien	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{UAS-A2SP-APLP2. ΔEC/LV}</i> – verschiedene Linien	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}</i> – verschiedene Linien	(Loewer 2001)
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; Sb/TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{GAL4-ninaE.GMR}III</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APP.LV}IIIa</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-SPA4CT.LV}IIIa</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-N.LV}IIb; P{LexA-hrGFP}IIIb</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-N.ΔEGF/LV}IIIa</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-N.S2ΔCT/LV}14</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APLP2.LV}16</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APPL.LV}9</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-LexAVP16}2a</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APP. ΔEC/LV5.b}</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APLP2.ΔEC/LV}10</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APPL.ΔEC/LV}10</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-N.ΔEACT/LV}6.a</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-A2SP-APLP2.ΔEC/LV}4</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APP.LV}IIIa P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-SPA4CT.LV}IIIa P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APLP2.LV}16 P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APPL.LV}9 P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APP. ΔEC/LV5.b} P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APLP2. ΔEC/LV}10 P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-APPL. ΔEC/LV}10 P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-N. ΔEACT/LV}6.a P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb; P{UAS-A2SP-APLP2. ΔEC/LV}4 P{GAL4-ninaE.GMR}III/ TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb P{UAS-APP.LV}IIa P{GAL4-ninaE.GMR}12/Cyo; Sb/TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb P{UAS-APP.LV}IIa P{GAL4-ninaE.GMR}12/Cyo; ps^{C1} FRT2A/TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit
<i>w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb P{UAS-APP.LV}IIa P{GAL4-ninaE.GMR}12/Cyo; FRT82B nct^{R46}/TM,Ser Gfp</i>	diese Arbeit

*w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb P{UAS-APP.LV}IIa
P{GAL4-ninaE.GMR}12/Cyo; ps^{C1} FRT2A nct^{R46}/TM, Ser Gfp*

diese Arbeit

*w[1118]; P{LexA-hrGFP}IIa P{LexA-hrGFP}IIb;
P{GMR-NctRNAi}9/TM, Ser Gfp*

diese Arbeit

4.3 Antikörper

Name	Protein (Epitop)	Organismus	Quelle	WB	IF
22C11	APP (Ektodomäne)	Maus	(Weidemann et al. 1989)	1:10000	-
CT13	APP (NPTY-Motiv)	Kaninchen	(Grziwa et al. 2003)	1:10000	-
W0 ₂	A β (AS1-16)	Maus	(Ida et al. 1996)	1 μ g/ml	-
4G8	A β (AS17-24)	Maus	Sigma	-	1:500
#27576	APP (ICD)	Kaninchen	G. Mulhaupt	1:1000	-
CT12	APLP2 (ICD)	Kaninchen	Calbiochem	1:5000	-
#108 #110	APPL (ICD)	Kaninchen	A. Loewer (diese Arbeit)	1:10000	-
N ^{IC}	Notch (ICD)	Maus	DSHB	1:1000	1:50
#40 #41	Hops/Tlk (Fragment 2)	Kaninchen	A. Loewer (diese Arbeit)	1:2500	-
BeachF3	dBeach1 (AS846-1163)	Kaninchen	A. Loewer (diese Arbeit)	1:10000	-
BeachF4	dBeach1 (AS2327-2458)	Kaninchen	A. Loewer (diese Arbeit)	1:10000	-
BeachF5	dBeach1 (AS3200-3331)	Kaninchen	A. Loewer (diese Arbeit)	1:10000	-
PsnLoop	Presenilin CTF	Kaninchen	G. Merdes + A. Loewer	1:10000	1:100
PsnN	Presenilin NTF	Kaninchen	G. Merdes + A. Loewer	1:10000	-
VP16	VP16	Kaninchen	BD Bioscience	1:5000	1:50
VP16 (14-5)	VP16 (N-Terminus)	Maus	Santa Cruz Biotech	1:1000	1:50
7E810	ELAV	Ratte	DSHB	-	1:50
9F8A9	ELAV	Maus	DSHB	1:1000	1:50
3A9	α Spectrin	Maus	DSHB	-	1:50
E7	β -Tubulin	Maus	DSHB	1:5000	-
M2	FLAG Epitop	Maus	Sigma	1:5000	-
9E10	myc Epitop	Maus	Roche	1:1000	1:100
c-myc (A14)	myc Epitop	Kaninchen	Santa Cruz Biotech	1:1000	-
V5	V5 Epitop	Maus	Invitrogen	1:5000	-

DSHB = Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, WB = Western Blot, IF= Immunfärbung

Für die Detektion nach Western Blot mittels ECL-Reaktion wurden entsprechende mit Meerrettich-Peroxidase („Horseradish-Peroxidase“, HRP) gekoppelte Antikörper (Amersham) in der Verdünnung 1:10000 verwendet.

Für Immunfärbungen wurden entsprechende mit Alexa564, Alexa647 (beide Molecular Probes) oder Cy3 (Dianova) gekoppelte Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:200 eingesetzt.

4.4 Lösungen

4.4.1 Nährmedien

LB-Medium: 1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
1% NaCl
pH 7
ad 1 Liter H₂O

LB-Agar: LB-Medium
1,5% Agar

SOB-Medium: 2% Trypton
0,5% Hefeextrakt
0,05% NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
pH 7,5 einstellen
mit H₂O ad 1 Liter

SOC-Medium: SOB-Medium
20 mM Glucose

Fliegenfutter 8 l Wasser
64 g Fadenagar
144 g Trockenhefe
80 g Sojamehl
176 g Rübensirup
640 g Maismehl
640 g Malzextrakt
19,2 g Nipagin in Ethanol (95 %)
Propionsäure (Volumen abhängig vom pH: 16,8 ml bei pH 5; 61,2 ml bei pH 5,5; 105 ml bei pH 6)

Essig-Agarplatten 1 l Wasser
20 g Fadenagar
5 ml Essigsäure
10 g Sucrose

4.4.2 Antibiotika (Stammlösungen)

Ampicillin: 100 mg/ml in H₂O
Chloramphenicol: 34 mg/ml in Ethanol

4.4.3 Selektionsmedien

LB-Amp:	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin
LB-Chlor:	LB-Medium 100 µg/ml Chloramphenicol
LB-Amp/Chlor:	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin 75 µg/ml Chloramphenicol

4.4.4 Größenmarker

DNA:	1kb DNA-Ladder, New England BioLabs
RNA:	Marker I, Roche
Protein:	SeeBlue, SeeBlue Plus2, Invitrogen

4.4.5 Sonstige Lösungen

PBS	137,0 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,0 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Phosphatpuffer (Injektion)	49,7 ml 1 M K ₂ HPO ₄ 50,3 ml 1M KH ₂ PO ₄ ad 1 Liter H ₂ O
dNTP's	2,5 mM dATP 2,5 mM dGTP 2,5 mM dCTP 2,5 mM dTTP

4.5 Fliegenhaltung

Zur Zucht standen Inkubatoren (RuMed) mit 18°C, 21°C und 25°C und ein 25°C-Klimaraum zur Verfügung. Die Luftfeuchtigkeit betrug 65%. Die Haltung der Fliegen erfolgte in folgenden Polystyrolröhrchen (Greiner), die zu ca. 1/5 mit Futter gefüllt waren.

klein:	6,4 x 2,6 cm
mittel:	8,3 x 3,6 cm
groß:	10 x 5,3 cm

Flugkäfige bestanden aus großen mit Luftlöchern versehenen Polystyrolröhrchen, die mit Essig-Agarplatten (6 cm Durchmesser, Greiner) verschlossen wurden.

4.6 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England BioLabs Roche Biochemicals
T4 DNA-Ligase	Roche Biochemicals
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase, Roche Biochemicals

Tgo Polymerase	Roche Biochemicals
Taq Polymerase	Qiagen
Expand HighFidelity	Roche Biochemicals
Pfu Polymerase	Stratagene, USA
Benzonase	Merck

4.7 Geräte

4.7.1 Mikroskopie

Mikroskope	Olympus BX60 Leica TCS SP2
Stereomikroskope	Leica MS5 Leica MZ7,5 Leica MZFLIII
Kamera	Olympus DP50
Kaltlichtleuchte	Leica KL1500 LCD

4.7.2 Mikroinjektion

Femtotips	Eppendorf
Mikroloader Plastikspitzen	Eppendorf
Mikroinjektor	FemtoJet [®] , Eppendorf
Mikromanipulator	Leitz
Mikroskop	Leitz Labovert

4.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer	ZMBH Feinmechanikwerkstatt, Heidelberg
----------------------	--

4.7.4 Elektrophorese und Westerntransfer

Elektrophoresekammer	Invitrogen XCell SureLock Hofer Mighty Small II
Spannungsquellen	Pharmacia EPS 500/400
Western Transferkammer	Hofer TE series Transphor Electrophoresis unit

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Reinigung von DNA-Fragmente

DNA-Fragmente wurden entweder durch Verwendung des “QIAquick PCR Purification (Gel Extraction) Kit” nach Herstellerangaben oder durch Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt. Dazu wurde ein äquivalentes Volumen Phenol/Chloroform zu der DNA-Lösung gegeben und durch Vortexen gemixt. Durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (13000 Upm, 5', RT) wurden die Phasen getrennt und die obere, wässrige Phase abgenommen. Die Extraktion wurde mit Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (im Verhältnis 24:1) wiederholt. Die gereinigte DNA wurde durch Zugabe von eiskaltem 100% Ethanol und Ammoniumacetat in einer Endkonzentration von 0,3 M für 30 min bei -20°C präzipitiert. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 10', 4°C) wurde das Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und anschließend in H_2O aufgenommen.

5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,7-1,2%ige Agarosegele mit 1 μl / 100ml Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Gellauf wurden die DNA Proben mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer mit 90-120 V für 1-2 h oder mit 30 V über Nacht durchgeführt. Zur Dokumentation wurde ein Transilluminator und ein digitales Kamerasystem verwendet.

1x TAE:	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
6x Ladepuffer:	30% Glycerol in Wasser 0,25% Bromphenolblau

5.1.3 Restriktionsverdau

Für einen analytischen Verdau wurden 100 – 300 ng DNA, für einen präparativen Verdau 1-5 μg DNA eingesetzt. Die Enzymmenge wurde auf 5-10fachen Überverdau eingestellt. Die Reaktion erfolgte in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer. BSA wurde entsprechend den Angaben zugesetzt. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 20 μl für analytische und 50 μl für präparative Ansätze für 1-4 h bei 37°C durchgeführt. Die verdaute DNA wurde abschließend durch Reinigung mit dem PCR Purification Kit vom Reaktionsansatz getrennt und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert, oder es wurden bestimmte Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

5.1.4 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Um zu verhindern, dass ein Vektor in einer Ligationsreaktion rezirkularisiert, wurden die Phosphatreste an den freien 5'-Enden entfernt. Es wurden 1 μl (1 U/ μl) Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) zu dem entsprechenden Restriktionsansatz gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Deaktivierung der Phosphatase erfolgte durch 20minütiges Erhitzen auf 65°C .

5.1.5 Ligation

Für Ligationen wurde ca. 100 ng Vektor DNA und die 2-3fache molare Menge des zu klonierenden Fragments in 10 µl Reaktionsansatz mit 1 µl (1 U/µl) T4-Ligase verwendet. Dieser Ansatz wurde entweder bei 18°C über Nacht oder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Rezirkularisierung nach dem Entfernen des CAT-Gens erfolgte in 100 µl Reaktionsvolumen mit 2 U Ligase. Dabei wurden 1-10 ng DNA eingesetzt.

5.1.6 Plasmid-Isolierung durch Minipräp

Plasmid-DNA wurde in kleinem Maßstab durch alkalischen Lyse isoliert. Es wurden einzelne Kolonien von einer Platte gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Kulturen wurden in Eppendorfröhrchen überführt und zentrifugiert (5000 Upm, 5', RT). Das Pellet wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert, durch Zugabe von 300 µl P2 lysiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Neutralisation mit 300 µl eiskalten Puffer P3 und 5 minütiger Inkubation auf Eis, wurde das Präzipitat abzentrifugiert (13000 Upm, 10', 4°C). 850 µl des Überstands wurden in neue Röhrchen überführt und die DNA mit 600 µl Isopropanol (RT) gefällt. Die DNA wurde pelletiert (13000 Upm, 30', 4°C) und anschließend mit 500 µl 70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für 1-3 min in der Speed Vac getrocknet und in 30-50 µl H₂O aufgenommen.

Puffer P1:	50 mM Tris/Cl; pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3:	3,0 M Kaliumacetat; pH 5,5

5.1.7 Plasmid-Isolierung durch Midipräp

Zur Isolation von DNA in größerem Maßstab wurde das Highspeed Midi Kit von Qiagen eingesetzt. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet, die DNA wurde standardmäßig in 500 µl H₂O eluiert.

5.1.8 Sequenzierung von Plasmiden

Die korrekte Sequenz von klonierten Plasmiden wurde durch Sequenzierung verifiziert, die die Firmen MWG-Biotech AG oder GATC Biotech AG durchführten. Dazu wurden 1-4 µg der Plasmid-DNA (Qiagen Midipräp, > 0,1 µg/µl) und 30 pmol (10 pmol/µl) der entsprechenden Primer eingeschickt.

5.1.9 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

DNA-Fragmente wurden je nach Anwendung mit den Polymerasen Taq, Pfu oder Tgo oder mit dem „Expand High Fidelity“ Kit amplifiziert.

Für die PCR-Reaktionen wurde folgender Standardansatz verwendet:

0,1-10 ng	DNA
5 µl	10x Puffer (Polymerasen-spezifisch)
5 µl	dNTP's (10 nM)
1 µl	Primer 1 (0,1 µg/µl)
1 µl	Primer 2 (0,1 µg/µl)
1 U	Polymerase
auf 50µl	H ₂ O

Die anschließende PCR erfolgte bei folgenden Bedingungen, jeweils angepasst an die verwendeten Primer, die Größe des zu amplifizierenden Fragmentes und die benötigte Menge des Produkts:

3 Minuten	94°C	
30-45 Sekunden	94°C	
30-45 Sekunden	55-61°C	25-35 Zyklen
60-90 Sekunden	72°C	
10 Minuten	72°C	

5.1.10 Kolonie-PCR

Die PCR wurde zur Identifikation positiver Klone verwendet. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher gepickt, in den PCR-Ansatz getaucht, leicht geschwenkt und dann in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt. In der anschließenden PCR wurden die Bakterien durch 5minütige Erhitzung auf 94°C aufgeschlossen. Positive Kolonien konnten durch das amplifizierte DNA-Fragment identifiziert werden. Die vorbereiteten Kulturen wurden dann zum Animpfen einer Midipröp verwendet.

5.1.11 Herstellung elektrokompetenter XL1-blue Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit Bakterien aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden zu 1 l SOC-Medium gegeben und bei 37°C inkubiert. Bei einem OD_{600nm}-Wert von 0,6 wurde die Bakterienkultur auf zehn 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und abzentrifugiert (4000 Upm, 15', 4°C). Der Vorgang wurde mit der restlichen Kultur wiederholt, die Pellets auf Eis in 10 ml eiskaltem H₂O resuspendiert, auf 4 Falcon-Röhrchen verteilt und mit eiskaltem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Es folgten drei weitere Waschschrirte mit eiskaltem H₂O. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Pellets in 5 ml 10% Glycerol aufgenommen und aliquotiert. 50 µl oder 100 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

5.1.12 Herstellung elektrokompetenter YZ2000 Zellen

10 ml LB-Medium wurden aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Kultur wurde 1 l SOC-Medium angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 – 0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden in vier 250 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min in Eiswasser gekühlt. Während dieser Inkubation wurde der Rotor und die Zentrifuge vorgekühlt (4000 Upm, 10' -7°C). Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (7000 Upm, 10', -7°C), die Pellets in 2 x 250 ml eiskaltem H₂O aufgenommen und auf zwei 250 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Es folgten zwei Waschschrirte mit 250 ml eiskaltem

10% Glycerol (mind. 3h vorgekühlt). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Röhren mit einem Kleenex getrocknet und die Zellen im zurückfließendem Restvolumen aufgenommen. Das Volumen wurde mit 10% Glycerol auf ca. 2,4 ml aufgefüllt, die Zellen in 50 oder 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Alle Schritte wurden möglichst kalt (auf Eis und im Kühlraum) durchgeführt.

5.1.13 Herstellung chemisch-kompetenter BL21 Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit Bakterien aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in 25 ml SOB-Medium verdünnt und bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,3 wurden 2 x 10 ml der Kultur in zwei eisgekühlte Corex-Röhren überführt und zentrifugiert (2500 Upm, 10', 4°C). Die Pellets wurden in je 3,5 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (2500 Upm, 10', 4°C). Die Pellets wurden in insgesamt 2 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert. Im Abstand von 5 min wurden zweimal 70 μ l DMSO zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

FSB-Puffer: 10 mM KOAc, pH7
 100 mM KCl
 45 mM MnCl_2
 10 mM CaCl_2
 3 mM Hexamin- CoCl_3
 pH 6,4 steril filtrieren, 4°C

5.1.14 Elektroporation

Pro Transformationsansatz wurden 50 μ l Zellen verwendet, die auf Eis aufgetaut und mit der DNA gemischt wurden. Diese Mischung wurde in eine gekühlte Küvette überführt und im Elektroporator einem Feld von 1250 V (XL1-blue) bzw. 2000 V (YZ2000) ausgesetzt. Sofort danach wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) zugefügt und die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar Platten mit entsprechende Antibiotika ausplattiert.

5.1.15 Transformation chemisch-kompetenter BL21 Zellen

10-100 ng Plasmid-DNA wurden vorsichtig mit 100 μ l kompetenter Zellen gemischt. Der Ansatz wurde 5-30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 45 sek auf 42°C erwärmt und sofort wieder 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurden 900 μ l LB-Medium zugefügt und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Da der verwendete BL21-Stamm zusätzliche tRNAs von einem Plasmid exprimiert, wurde auch auf Chloramphenicol-Resistenz selektioniert.

5.1.16 ET-Cloning

Zur Klonierung der Fusionskonstrukte wurde eine auf homologer Rekombination in E. coli basierende Technik zur Manipulierung von DNA verwendet. Die Rekombination wird von den Enzymen RecE und RecT vermittelt, die von einem Prophagen im Genom des Stamms YZ200 exprimiert werden. Dadurch können lineare PCR-Produkte über homologe Enden in Plasmide integriert werden. Die Primer für die PCR wurden so designed, dass die

Homologien 45-50 Nukleotide betragen. Zusätzlich enthielten die Primer Sequenzen zur spezifischen Bindung an das zu amplifizierende DNA-Fragment. Mit der Software Oligo 6.6 wurden die Primer auf interne Strukturen überprüft. Die Primer wurden von der Firma BioSpring hergestellt.

Das amplifizierte PCR Produkt wurde mit dem PCR Purification Kit gereinigt und mit 2x 50 μ l H₂O eluiert. Die Template-DNA wurde durch einen DpnI-Verdau und/oder durch präparative Gelelektrophorese entfernt. Das gereinigte DNA-Fragment wurde zusammen mit dem Zielploid in YZ2000 Zellen kotransformiert. Dabei wurden standardmäßig 0,2 pmol Vektor-DNA und die 1-2fache molare Menge an PCR-Produkt eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte in 50 μ l Zellen bei 2000V. Der gesamte Ansatz wurde dann auf LB-Agar Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Als Kontrolle wurde jeweils das PCR-Produkt alleine unter den selben Bedingungen transformiert.

Um weitere Rekombinationen zu vermeiden, wurde die DNA in einen Klonierungsstamm überführt. Dazu wurden je 4 Kolonien gepickt und zusammen in 3 ml selektivem LB 4 h bei 37°C wachsen gelassen. Die DNA wurde über Minipräparation isoliert, je nach Menge in 30-50 μ l H₂O aufgenommen und 1 μ l davon in XL1-blue Zellen transformiert. 10 μ l und 100 μ l dieser Transformation wurden dann wieder ausplattiert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf positive Klone untersucht

5.1.17 Isolierung von RNA

Die Gewebe des entsprechenden Entwicklungsstadiums wurden in 1 ml Trizol (Invitrogen) in einem Eppendorfgefäß mit einem Ultraturrax (Kinematica AG) homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 0,2 ml Chloroform zugegeben und für 15 sek kräftig geschüttelt wurde. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch zentrifugiert (11200 Upm, 15', 4°C). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 0,5 ml Isopropanol wurden zugesetzt, 15 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (11200 Upm, 10', 4°C). Das Präzipitat wurde mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

5.1.18 RT-PCR

Zum Entfernen von kontaminierender genomischer DNA wurden 20 μ g RNA mit 2,5 μ l Rnasin (20 U/ μ l) und 2,5 μ l DnaseI Rnase frei (10 U/ μ l) in 50 μ l Volumen (NEB Puffer 2) bei 37°C 1 h in der PCR-Maschine inkubiert. Anschließend wurden 5 μ l 3 M NaOAc und 1 μ l Glykogen (20 mg/ml) zugegeben, die RNA mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert (jeweils 50 μ l Volumen), mit 100% Ethanol gefällt und in 20 μ l H₂O aufgenommen.

Als Primer für die reverse Transkriptase wurden zufällige Nonamere ("Random Primer", 3 μ g/ μ l, NEB) verwendet. 2 μ g RNA wurden mit 0,5 μ l Primern in 10,5 μ l H₂O verdünnt, 10' bei 65°C in der PCR-Maschine inkubiert und danach auf Eis gestellt. Zu diesem Ansatz wurden 4 μ l 5x RT-Puffer, 2 μ l 100 mM DTT, 2 μ l 10 mM dNTP's (Roche), 0,5 μ l RNasin (20 U/ μ l, Promega) und 1 μ l reverse Transkriptase (200 U/ μ l, Promega) zugefügt. Der Ansatz wurde für 10' bei 30°C, 60' bei 42°C und 10' bei 55°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein entsprechender Ansatz ohne Enzym verwendet. In der anschließenden PCR wurden direkt 2 μ l des Ansatzes verwendet.

5.1.19 Northern Blot

Für alle Entwicklungsstadien wurde aus 10 mg RNA mit Hilfe des „mRNAeasy“ Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben mRNA isoliert. Die mRNA wurde mit Ethanol in Anwesenheit von 20 μg Glykogen präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5,4 μl H_2O aufgenommen. Anschließend wurden 5,6 μl deionisiertes Glyoxal, 16 μl DMSO und 3 μl 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0 hinzugegeben, 1 h bei 50°C inkubiert und dann auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 4 μl Ladepuffer wurden die Proben auf ein 1% Agarosegel (10 mM Phosphatpuffer pH 7,0) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 3 Stunden, wobei der Puffer mit einer Pumpe vom – Pol zum + Pol zirkuliert wurde. Die erste Spur, die den RNA Marker enthielt, wurde vom restlichen Gel abgetrennt, mit EtBr (0,5 mg/ml in 0,5 M Ammoniumazetat) für 40 min gefärbt und fotografiert. Das restliche Gel wurde für 30 min in 20 x SSC inkubiert.

Eine Transferapparatur wurde nach den Standardprotokollen aufgebaut. Das Gel wurde umgekehrt auf Whatmanpapiere gelegt, deren Enden in 2 x SSC eintauchten. Auf die glatte Seite des Gels wurde die mit 2 x SSC angefeuchtete Membran (Hybond NX) gelegt; die Seiten der Apparatur wurden mit Parafilm abgedichtet. Auf die Membran wurden angefeuchtete Whatmanpapiere gelegt und darüber 5-10 cm hoch Papierhandtücher, deren Größe genau der Membran angepasst waren. Zum Schluß wurden die Papierhandtücher mit einer Glasplatte fixiert mit einem Behälter beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Am nächsten Morgen wurde der Blot in 20 x SSC gewaschen, um Reste der Agarose zu entfernen. Danach wurde die Membran auf ein Whatmanpapier gelegt und durch UV-Strahlung fixiert (Stratalinker, Autocross). Anschließend wurde die Membran für 30 min bei 80°C gebacken.

Um das Glyoxal zu entfernen, wurde die Membran 10 min bei 65°C in 20 mM Tris pH 8,0 inkubiert. Die Prähybridisierung erfolgte bei 42°C für 2 Stunden. Die Proben wurden mit Hilfe des „RediPrime II“ Kits (Amersham) nach Angaben des Herstellers radioaktiv mit ^{32}P markiert. Die Probe und Heringssperma DNA (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, zu dem Hybridisierungspuffer gegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC, 0,1% SDS, danach dreimal für je 30 min mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Membran wurde in Klarsichtfolie gewickelt und ein Röntgenfilm für 5-6 h bei –80°C exponiert.

Als Sonden wurden das Acc65I/XbaI-Fragment von pMT-HopsFlag, ein mit den Primern Tub for und rev amplifiziertes Fragment von Tubulin und das Fragment BeachF2 verwendet.

Prähybridisierungspuffer: 5 x Denhardt's

5 x SSC

0,5% SDS

50% Formamid

Hybridisierungspuffer: 5 x Denhardt's

5 x SSC

0,5% SDS

50% Formamid

0,1 mg/ml Heringssperma DNA (10 mg/ml, Roche)

5.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.1 Herstellung von Proteinextrakten adulter Köpfe

Soweit nicht anders beschrieben, wurden für die Herstellung von Proteinextrakten Fliegen verwendet, die jünger als 12 Stunden waren. Die Köpfe konnten durch Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff und anschließendes starkes Schütteln der Röhren vom Thorax getrennt und direkt in 3 μ l 1x SDS-Ladepuffer pro Kopf transferiert werden. Nach Zugabe von 1 μ l Benzonase (25 U/ μ l, Merck) wurden sie mit einem Pistill homogenisiert und für 5 min auf 95°C erhitzt. Da Presenilin bei diesen Konditionen unlösliche Aggregate bildet, enthielt der Probenpuffer zur Extraktion dieses Proteins 4M Urea und die Proteinextrakte wurden für 15' bei 37°C inkubiert. Die unlösliche Kutikula wurde durch Zentrifugation (13000 Upm, 3', RT) entfernt, der Überstand in ein neues Röhren überführt und entweder gleich zur Gelelektrophorese verwendet oder bei -20°C gelagert.

SDS-Ladepuffer: 100 mM Tris/Cl (pH 6,8)
 200 mM DTT
 4% SDS
 0,2% Bromphenolblau
 20% Glycerol

5.2.2 Herstellung von Proteinextrakten larvaler Imaginalscheiben

Die Larven wurden aus dem Futterröhren in eiskaltes Wasser überführt und gegebenenfalls nach GFP-markierten Balancern sortiert. Die Imaginalscheiben wurden in PBS so präpariert, dass sie noch mit dem Mundhaken verbunden waren. Nach Entfernung des Gehirns wurden sie am Mundhaken in 15 μ l 2x SDS-Ladepuffer überführt und auf Eis gelagert. Die Imaginalscheiben von 15 Larven wurden gesammelt, mit 1 μ l Benzonase (25 U/ μ l, Merck) versetzt, mit einem Pistill homogenisiert und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Die unlösliche Kutikula wurde durch Zentrifugation (13000 Upm, 3', RT) entfernt und der Überstand in ein neues Röhren überführt. Gegebenenfalls wurde das Volumen mit PBS auf 30 μ l aufgefüllt. Die Proben wurden entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

5.2.3 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkulturzellen

Embryonale *Drosophila* S2-Zellkulturen wurden mit Effectene (Qiagen) nach Herstellerangaben transient mit 1 μ g Plasmid-DNA pro Konstrukt in 6er-Zellkulturplatten transfiziert. 48h nach der Transfektion wurde die Expression mit 0,5 mM CuSO₄ induziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen im Medium resuspendiert und abzentrifugiert (5000 Upm, 4', 4°C). Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und in 100 μ l Lysispuffer aufgenommen. Die Lyse erfolgte für 30' auf Eis, die Kerne und unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (13000 Upm, 10', 4°C). Die Lysate wurden entweder sofort verwendet oder bei -80°C gelagert. Die Proteinmenge wurde mit dem „DC Protein Assay“ (BioRad) nach Herstellerangaben bestimmt. Für die nachfolgende Gelelektrophorese wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein in 1x SDS-Ladepuffer verwendet.

Für die Tranfektion wurden die Vektoren pMT (Invitrogen), pMT-APP (Merdes et al. 2004), pMT-Hops oder pMT-Hops^{K956E} verwendet.

Lysispuffer: 25 mM Tris (pH 7,8)
 150 mM NaCl
 2 mM EDTA
 1% NP40

5.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western-Transfer

5.2.4.1 Tris-Glycin SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte mit dem Tris-Glycin Puffersystem (Laemmli 1970). Sie wurde mit dem "Mighty Small II" –System (Hoefer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In der Regel wurden 10% Trenn- und 5% Sammelgele verwendet. Pro Spur wurden 25-40 µl der Proben oder 5 µl des Größenmarkers geladen. Der Lauf wurde mit 20 mA begonnen und nach Erreichen des Trenngels mit 35-40 mA beendet.

5.2.4.2 Bis-Tris PAGE

Für die Bis-Tris PAGE wurden 4-12% Bis-Tris-Acrylamidgele (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in „XCell SureLock“-Kammern (Invitrogen) mit MES-Puffer verwendet. Pro Spur wurden 30 µl der Proben oder 5 µl des Größenmarkers geladen. Der Lauf erfolgte für 35 min bei konstanten 200 V, bis der Farbmarder das untere Ende des Gels erreichte.

20x MES-Laufpuffer: 1 M MES (2-(N-morpholino) ethansulfonsäure)
 1 M Tris Base
 0,0693 M SDS
 0,0205 M EDTA

5.2.4.3 Tris-Acetat PAGE

Um Proteine über 200 kDa aufzutrennen wurden 3-8% Tris-Acetat-Acrylamidgele (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in „XCell SureLock“-Kammern (Invitrogen) mit „Tris-Acetate SDS Running Buffer“ (Invitrogen) verwendet. Pro Spur wurden 30 µl der Proben oder 5 µl des Größenmarkers geladen. Der Lauf erfolgte für 1 h bei konstanten 150 V, bis der Farbmarder das untere Ende des Gels erreichte.

5.2.4.4 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20' mit Entfärbelösung fixiert. Anschließend wurde es für 20' mit Coomassie-Lösung inkubiert und danach solange mit Entfärbelösung behandelt, bis sich die Proteinbanden gut vom Hintergrund abhoben. Das gefärbte Gel wurde in 4% Glycerol für mehrere Stunden äquibriert und auf Whatmannpapier im Vakuum-Geltrockner getrocknet.

Coomassie-Lösung: 0,2% Coomassie R250
 10% Essigsäure
 45% Methanol
 Entfärbelösung: 10% Essigsäure
 45% Methanol

5.2.4.5 Western Blot

Der Transfer wurde entweder mit Bis-Bicin Transferpuffer oder für große Proteine nach Tris-Acetat-Gelelektrophorese mit CAPS-Transferpuffer durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in Transferpuffer überführt, auf drei Lagen feuchtes Blottingpapier gelegt und mit einer Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) bedeckt. Nachdem dieser Stapel mit drei weiteren Lagen Blottingpapier abgeschlossen wurde, wurden sorgfältig alle Luftblasen durch Rollen mit einem Wassermannröhrchen entfernt. Der Transfer wurde mit 200 mA für 1,5 h in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer durchgeführt. Bei Verwendung von CAPS-Transferpuffer wurde der Transfer für 16 h bei 200 mA durchgeführt. Der erfolgreiche Transfer konnte durch Färbung mit Ponceau S für 1 min und anschließendem Waschen mit PBST überprüft werden. Die Membran wurde 1 h bei RT in Blockpuffer und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper in Blocklösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 15 min mit PBST bei RT) wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach abschließendem Waschen mit PBST (3 x 15 min bei RT) wurden die gebundenen Antikörper durch Chemolumineszenz ("ECL Western Blotting Detection System", Amersham) detektiert. Dazu wurden 1 ml Lösungen 1 und 2 gemischt und für 1 min auf die Membran aufgetragen. Die Membran wurde luftblasenfrei in Klarsichtfolie verpackt und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilmes detektiert. Zur Quantifizierung wurden die Röntgenfilme digitalisiert und mit der Software Aida (Raytest) analysiert.

Transferpuffer: (Bis-Bicin)	25 mM Bicin 25 mM Bis-Tris 0,029 % EDTA (w/v) 10 % MeOH (w/v) (bei zwei Gelen: 20%)
Transferpuffer: (CAPS)	10 mM CAPS 15 % MeOH (w/v) pH 11 (mit NaOH einstellen)
PBST:	PBS 0,05 % Tween 20 (v/v)
Blockpuffer	PBST 5 % Milchpulver (w/v)

5.2.4.6 Entfernen der Antikörper von Nitrozellulosemembranen

Um den Western Blot mit weiteren Antikörpern analysieren zu können, wurde die Membran 30' bei 50-60°C in Stripplösung inkubiert. Dabei lösen sich die gebundene Antikörperkomplexe. Nach drei Waschschritten in PBST (je 10', RT) konnte die Membran erneut mit Blockierlösung und anschließend mit Antikörpern inkubiert werden (siehe 5.2.4.5).

Stripplösung:	2% SDS 100 mM β -Mercaptoethanol 62,5 mM Tris (pH 6,7)
---------------	--

5.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde entweder mit dem "Protein Assay" (BioRad) nach der Bradford-Methode oder durch Messung der OD_{280nm} bestimmt.

Für die Bestimmung nach Bradford wurden geeignete Mengen der Proteinlösung (1-5 μl) in 800 μl H_2O verdünnt. Anschließend wurden 200 μl der Bradford-Lösung zugegeben und vermischt. Nach 15' Inkubation wurde die $\text{OD}_{595\text{nm}}$ gemessen. Die erhaltenen Werte wurden mit einer parallel vermessenen BSA-Eichkurven (0,5-5 mg/ml) verglichen.

Ist die Aminosäuresequenz eines Proteins bekannt, kann die Konzentration einer reinen Lösung durch direkte Messung der $\text{OD}_{280\text{nm}}$ bestimmt werden. Mit dem theoretisch berechneten Extinktionskoeffizienten (Lasergene Protean Software) läßt sich die Proteinmenge berechnen.

5.2.6 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

5.2.6.1 Bestimmung der Löslichkeit

Die Plasmide mit entsprechenden Fusionskonstrukten wurden frisch in BL21-Zellen transformiert. Um die Löslichkeit des Proteins zu ermitteln, wurden 3 ml LB-Amp/Chlor angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Kultur wurde 1:10 verdünnt und 1 h bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot (100 μl) wurde abgenommen und die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h bei 37°C wurde ein weiteres Aliquot (100 μl) abgenommen und 2 ml der Kultur abzentrifugiert (5000 Upm, 5', RT), Das Zellpellet wurde in 500 μl PBS aufgenommen, sonifiziert (2 ml Eppendorfgefäß, 3x30'', Stufe 4-5, auf Eis) und zentrifugiert (13000 Upm, 15', 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 250 μl PBS resuspendiert. Durch SDS-Gelelektrophorese von äquivalenten Mengen der verschiedenen Aliquots und anschließender Färbung mit Coomassie konnte die Löslichkeit des Fusionsproteins bestimmt werden. Gegebenenfalls wurden die Bedingungen (IPTG-Menge, Induktionsdauer, Temperatur) angepaßt, um die Löslichkeit zu optimieren.

5.2.6.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

1 l LB-Amp/Chlor wurde mit 10 ml ÜNK angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Die Expression wurde unter den ermittelten Bedingungen induziert (Standard: 1 mM IPTG, 3h, 37°C). Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 Upm, 10', 4°C) und das Pellet eingefroren. Zur Lyse wurden die Zellen in 2x20 ml PBS aufgenommen und 2x in der French Press oder mit dem Mikrofluidizer aufgeschlossen. Anschließend wurde Lysozym (2 mg/ml) zugefügt, sonifiziert (50 ml Falcon, 3x30'', Stufe 4-5), Triton-X 100 (1% Endkonzentration) zugefügt und 15' auf Eis inkubiert. Unlösliche Proteine und DNA wurden durch Zentrifugation pelletiert (10000 g, 15', 4°C). Die Fusionsproteine wurde in 50 ml Volumen für 1 h bei 4°C an GST-Sepharose (5 ml, Amersham) gebunden. Die Sepharose wurde 2x mit PBS/1% Triton und 2x mit PBS (je 50 ml, 10'; Zentrifugation 500 g, 5', 4°C) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3x 2,5 ml Elutionspuffer. Das gereinigte Protein wurde abschließend gegen 1x PBS dialysiert und in Aliquots lyophilisiert.

Elutionspuffer: 50 mM Tris (pH 8,0)
 10 mM Glutathion

5.2.6.3 Reinigung von Proteinen durch Ni-Affinitätschromatographie

1 l LB-Amp/Chlor wurde mit 10 ml ÜNK angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde mit 1 mM IPTG induziert und für 3 h bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 Upm, 10', 4°C) und ein-

gefroren. Zur Lyse wurden sie in 10 ml Lysispuffer aufgenommen, mit Lysozym (1 mg/ml) versetzt und sonifiziert (50 ml Falcon, 5x10'', Stufe 4). Unlösliche Proteine und DNA wurden durch Zentrifugation pelletiert (10000 g, 15', 4°C). Zur Reinigung der Fusionsproteine wurden 3 ml Ni-NTA Superflow (Qiagen) verwendet. Die Matrix wurde mit 2x10 ml Lysispuffer äquilibriert und dann für 1 h bei 4°C in einer Chromatographiesäule (BioRad) mit dem Bakterienlysate inkubiert. Nach drei Waschschrritten (je 15 ml Waschpuffer) wurden die gebundenen Proteine mit 6 ml Elutionspuffer in 0,5 ml Aliquots eluiert. Die Proteinmenge in den Fraktionen wurde durch Bradford-Assay bestimmt und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Das gereinigte Protein wurde abschließend gegen 1x PBS dialysiert und in Aliquots lyophilisiert.

Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0
Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0

5.2.6.4 Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern

Da das Protein BeachF3 nach der Lyse unlöslich war, wurde es aus Einschlusskörpern unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und anschließend *in-vitro* gefaltet.

1 l LB-Amp/Chlor wurde mit 20 ml ÜNK angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37°C inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde mit 1 mM IPTG induziert und für 3 h bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 Upm, 10', 4°C) und das Pellet in Lysispuffer aufgenommen. Nach 30' Lyse bei RT wurde Triton-X 100 bis zu einer Konzentration von 1% zugefügt und sonifiziert (50 ml Falcon, 5x30', Stufe 4). Bakterielle DNA wurde durch Inkubation mit DNaseI (20 mg/l) für 1 h bei 37°C verdaut, anschließend wurden die unlöslichen Proteine pelletiert (30000 Upm (JA17), 30', 4°C). Die pelletierten Einschlusskörper wurden 2x mit Waschpuffer gewaschen und dann in 2-6 ml Ureapuffer für 1 h bei 4°C gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (100000g (TLA45), 10', 4°C) und die gelösten Proteine über Nacht gegen Ureapuffer ohne DTT dialysiert. Für die *in-vitro* Faltung wurde das Protein 150fach in Faltungspuffer verdünnt. Dieser Schritt wurde 10x im Abstand von 1-1,5 h bei RT wiederholt, so dass am Ende eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Anschließend wurde gegen 5% Glycerin in PBS und gegen den Lysispuffer für die Ni-Affinitätschromatographie (5.2.6.3) dialysiert, so dass das nun lösliche Protein weiter gereinigt werden konnte.

Lysispuffer:	50 mM Hepes pH 7,5 500 mM NaCl 1 mM PMSF 5 mM DTT 0,35 mg/ml Lysozym
Waschpuffer:	PBS 1% Triton
Ureapuffer:	50 mM Tris pH 7,5 6M Harnstoff 25 mM DTT
Faltungspuffer:	1 M Arginin 100 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA 5 mM β -Mercaptoethanol

5.2.7 Immunisierung von Kaninchen

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern wurden jeweils zwei Kaninchen mit Fusionsproteinen immunisiert. Vor der Immunisierung wurden 10 ml Präimmunserum abgenommen. Für die Erstimmunisierung wurden 0,5-1 mg Protein in 200 μ l 1x PBS mit 200 μ l "complete Freund's Adjuvants" (Sigma) durch ca. 10' Vortexen vermischt. Die Suspension wurde in eine 1 ml Spritze geladen und injiziert. Die Kaninchen wurden alle 3-4 Wochen mit der gleichen Menge Protein und "incomplete Freund's Adjuvants" (Sigma) geboostet. Beginnend mit dem dritten Boost wurden jeweils 10 Tage nach der Injektion 10 ml Blut abgenommen, um die Spezifität der Antikörper zu testen. Nach 6-8 Boosts wurde das gesamte Serum der Kaninchen gewonnen.

Um das Serum zu gewinnen, wurde das Blut für 3-4 h bei RT gelagert, um die Gerinnung zu induzieren. Die geronnenen Bestandteile wurden mit einer Pasteurpipette vom Gefäßrand entfernt und über Nacht bei 4°C gelagert. Dadurch trennen sich die festen Bestandteile vom Serum, das nun einfach mit einer Pipette abgenommen werden kann. Das Serum wurde getestet, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

5.2.8 Affinitätsreinigung der Antikörper

10 mg des lyophilisierten Antigens wurden in insgesamt 2 ml H₂O aufgenommen und über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert. Am nächsten Morgen wurden 500 mg CnBr-aktivierte Sepharose (Roche) in einer Chromatographiesäule in 5 ml 1 M HCl resuspendiert, 30' auf einem Überkopfschüttler inkubiert, mit 30 ml eiskaltem 1 M HCl und 2x mit 15 ml Kopplungspuffer gewaschen. Währenddessen wurde das dialysierte Protein zentrifugiert (13000 Upm, 5', 4°C) und anschließend über Nacht bei 4°C mit der Sepharose inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch Waschen mit 10 ml 1 M Ethanolamin und Inkubation mit 5 ml 1 M Ethanolamin für 3-4 h bei RT gestoppt. Die Matrix wurde mit 10 ml PBS, 4x abwechselnd mit 5 ml Waschpuffer und mit 10 ml Elutionspuffer und abschließend 3x mit 10 ml PBS gewaschen.

10 ml Serum wurden mit PBS auf 45 ml aufgefüllt, zentrifugiert (5000 Upm, 10', 4°C), mit einem Spritzenfilter (0,4 μ m Porendurchmesser, Schleicher&Schuell) filtriert und der pH überprüft (Sollwert: pH 7,5-8). Anschließend wurde das Serum in einem 50 ml Falcon für 1 h

bei 4°C mit der Antigen-gekoppelten Sepharose inkubiert. Nach Überführen in eine Chromatographiesäule wurde die Matrix 2x mit 3 ml und 3x mit 10 ml PBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit 12 ml Elutionspuffer in Eppendorfgefäße eluiert, in die 100 µl 1 M Tris pH 8,0 vorgelegt wurden. Es wurden jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Menge des Antikörpers wurde durch Messung der OD_{280nm} bestimmt. Eine OD_{280nm} von 1 entspricht dabei 0,8 mg/ml Antikörper. Abschließend wurden die Antikörper enthaltenden Fraktionen vereint, gegen 1x PBS dialysiert und in Aliquots lyophilisiert.

Die Matrix wurde mit 15 ml 100 mM Glycin pH 2.8 und mit 10 ml PBS gewaschen und in in PBS + 0,02% NaN₃ bei 4°C gelagert. Wurden mehrere Fusionsproteine zum Immunisieren verwendet, wurde die spezifischen Antikörper durch aufeinander folgende Affinitätsreinigung getrennt. Antikörper gegen GST wurden durch vorherige Reinigung mit GST-Sepharose entfernt.

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO₃
0,5 M NaCl
pH 8.3

Waschpuffer: 50mM Tris
1M NaCl
pH 8,0

Elutionspuffer: 100mM Glycin
pH 2.8

5.3 *Drosophila*-spezifische Techniken

5.3.1 P-Element vermittelte Keimbahntransformation

Die Zucht und Haltung der zur Injektion verwendeten Fliegen erfolgte 25°C in großen Zuchtröhrchen. Um eine möglichst große Anzahl gesunder Embryonen für die Transformation zu erhalten, wurden zur Eiablage Fliegen benutzt, die ungefähr 7 Tage alt waren. Mehrere Tage vor der Eiablage wurden die Fliegen aus 4-6 großen Röhrchen in Ablagekäfige (9 cm Durchmesser, 12 cm Höhe) umgesetzt und gut gefüttert. Zur Injektion wurde der Stamm w¹¹¹⁸ verwendet. Die Vorbereitung und Injektion der *Drosophila*-Embryonen erfolgte in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von 18 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50–70 %.

Zur Injektion wurden 9 µg der DNA zusammen mit 3 µg des Transposase kodierenden Helferplasmids (pUCHsΔ2-3) durch Ethanol gefällt und in 30 µl Injektionspuffer aufgenommen. Um die Gefahr des Verstopfens der Injektionsnadel durch Verunreinigungen zu reduzieren, wurde die Injektionslösung vor der Befüllung der Injektionsnadel zentrifugiert (12000 Upm, 10', 4°C). 2 µl der Injektionslösung wurde mit einer Mikroloader-Pipettenspitze entnommen und in die Injektionsnadel gefüllt. Die Injektionsnadel wurde vorsichtig in den Kapillarenhalter eingeschraubt und in einem Tropfen Voltaef 10S-Öl auf einem Deckglas (40 x 18 mm) gelagert.

Die Ablage der Eier erfolgte auf Essig-Agarplatten. Alle 20 min wurden die Embryonen mit Wasser und einem Pinsel in Siebchen überführt, gründlich mit H₂O gespült und mit Zellstoff getrocknet. Die Embryonen wurde mit Natronbleiche für 2–3 min dechorionisiert und anschließend mit H₂O gewaschen. 50-100 dechorionisierte Embryonen wurden mit einer Präpariernadel vorsichtig in einer Reihe auf einen Essig-Agar-Streifen (0,5 cm x 4 cm)

angeordnet, so dass die am anterioren Pol gelegene Mikropyle der Embryonen zum Rand zeigt. Embryonen, die zu alt oder beschädigt waren, wurden bei diesem Schritt entfernt. Anschließend wurden die aufgereihten Embryonen auf ein Deckgläschen (18 mm x 40 mm) transferiert, dessen eine Längsseite mit doppelseitigem Klebeband versehen war. Vor der Injektion wurden die Embryonen für 8 min in einer mit Silikagel gefüllten Trockenkammer dehydriert, um den hydrostatischen Druck zu vermindern. Unverzüglich nach der Dehydrierung wurden die Embryonen mit Voltalef 10S-Öl überschichtet, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern.

Das Injektionsvolumen wurde so justiert, dass die DNA-Lösung eine kleine, gerade noch wahrnehmbare Verwirbelung innerhalb des Embryos auslöste. Der dazu notwendige Druck variierte je nach Größe der Nadelöffnung zwischen 100 und 800 hPa. Die Injektionszeit wurde manuell gesteuert. Ein konstanter Druck von 50-100 hPa verhinderte ein Eindringen der umgebenden Flüssigkeit in die Nadel. Durch eine kurze, schnelle Bewegung wurde die Nadel durch die Vitellinmembran des Embryos gestoßen und die DNA in das Polplasma injiziert. Zu alte oder beschädigte Embryonen wurden durch kurzzeitiges Ausblasen der Nadel mit maximalen Druck (ca. 5000 hPa) entfernt. Alle Arbeitsschritte wurden innerhalb von 1 1/2 h nach der Eiablage durchgeführt.

Nach der Injektion wurden die injizierten Embryonen in feuchten Kammern 2–3 Tage bei 18 °C bis zum Schlüpfen der Larven der G₀-Generation gelagert. Die geschlüpften Larven wurden vorsichtig mittels einem Pinsel mit möglichst wenig Öl in ein Futterröhrchen überführt, das vorher mit einer Kanüle etwas aufgelockert wurde. In diesem schlüpfte nach 10–12 Tage bei 25 °C die adulten Tiere der G₀-Generation.

Injektionspuffer:	5 mM KCl 0,1 mM Phosphatpuffer (pH 6,8)
Natronbleiche:	7,5 ml Natriumhypochlorit-Lösung (12% Cl) 3,5 ml 10xPBS ad 35 ml H ₂ O

5.3.2 Etablierung transformierter homozygoter *Drosophila*-Linien

Die geschlüpften Tiere der G₀-Generation wurden mit einer Fliegenlinie verkreuzt, die die 2. Chromosom-Balancer Bc Gla und CyO enthielt. Jedes geschlüpfte Männchen wurde mit 3-5 virginellen Weibchen und je 3 geschlüpfte Weibchen mit 3-5 Männchen verkreuzt und in kleinen Futterröhrchen bei 25°C gehalten. Die Nachkommen dieser Kreuzung (G₁) konnten auf das Vorhandensein des Transformationsmarkers *white* untersucht werden. Die Färbung der Augen variierte je nach Insertionsstelle des Transgens von hellgelb bis rot. Die heterozygot transgenen Fliegen wurden erneut mit Bc Gla/CyO-Fliegen gekreuzt. Deren Nachkommen (G₂) konnten untereinander gekreuzt werden, um homozygote Linien zu erhalten.

5.3.3 Kartierung der Insertion

Das Chromosom, auf dem das Transgen inseriert ist, wurde durch genetische Kartierung bestimmt. Dazu wurden Männchen der transgenen Linie zweimal mit dem Stamm Bc Gla/CyO gekreuzt. Durch das Segregationsmuster nach der zweiten Kreuzung läßt sich das Chromosom bestimmen:

	gefärbte Augen	weiße Augen
X Chromosom	w/P;+/Bc Gla	w/-;+/Bc Gla
	w/P;+/CyO	w/-;+/CyO
	w/P;Bc Gla/CyO	w/-;Bc Gla/CyO
2. Chromosom	w;P/Bc Gla	w;Bc Gla/CyO
	w;P/CyO	
3. Chromosom	w;+/Bc Gla;P/+	w/-;+/Bc Gla;+
	w;+/CyO;P/+	w/-;+/CyO;+
	w;Bc Gla/CyO;P/+	w/-;Bc Gla/CyO;+

5.3.4 PCR von einzelnen Fliegen

Für jede Linie wurden zwei einzelne Männchen getrennt untersucht. Die Fliegen wurden in einem 0,5 ml PCR-Gefäß mit 50 μ l Gloor-Engel's-Puffer homogenisiert und in der PCR-Maschine für 30' bei 37°C und für 2' bei 95°C inkubiert. Das Homogenisat wurde bei 4°C gelagert. Für die anschließende PCR wurden standardmäßig 2 μ l des Extrakts eingesetzt.

Gloor-Engel's-Puffer: 10 mM Tris pH 8,2
 1 mM EDTA
 25 mM NaCl
 200 μ g/ml Proteinase K (verdünnt aus 20 mg/ml Lsg.)

5.3.5 Mutagenese von EP(2)2299

Für die Mutagenese wurden 400 Männchen der Linie EP(2)2299 verwendet, die nicht älter als eine Woche waren. Je 200 Männchen wurden morgens in ein großes Röhrchen ohne Futter transferiert, wobei der Stopfen mit feuchtem Küchenpapier umwickelt wurde. Sie wurden für 4h ohne Futter gelassen, wobei darauf geachtet wurde, dass sie genug Feuchtigkeit bekamen, ohne dass das Innere des Röhrchens nass wurde. Für die EMS Behandlung wurde jeweils in ein Röhrchen ein halbiertes Stopfen gegeben, der mit Küchenpapier umwickelt war. Pro Röhrchen wurden 5 ml 25 mM EMS-Lösung in 1% Sucrose vorbereitet. Alle Schritte mit EMS wurden in einem abgetrennten Raum durchgeführt. Die EMS-Lösung wurde mit einer 10 ml Spritze gut gemischt, da EMS schwerer ist als Wasser, und auf die vorbereiteten Röhrchen verteilt. Die hungernden Fliegen wurden in die Röhrchen mit EMS-Lösung transferiert und dort über Nacht gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Fliegen in Futterröhrchen transferiert, damit sie das EMS abstreifen konnten. Nach ca. 6 h wurden die Kreuzungen angesetzt: Jeweils 50 Männchen wurden zu 50 virginellen Weibchen der Linie GMR-Gal4 gekreuzt. Die Kreuzung wurde im Kühlraum durchgeführt: Futterröhrchen, die mehrere Stunden vorher kalt gestellt wurden, wurden kurz vorher mit CO₂-Gas getrocknet. Die Jungfrauen wurden auf die kalten Futterröhrchen verteilt, ein leeres Röhrchen wurde in einem Eistopf kalt gestellt. Die mutagenisierten Männchen wurden in das leere Vial transferiert, kurz auf Eis gekühlt und anschließend auf eine große Karteikarte mit einer Präpariernadel in Häufchen von 50 Individuen verteilt. Diese wurden dann zu den virginellen Weibchen gegeben. Diese Kreuzung wurde bei 25°C durchgeführt, die Futterröhrchen wurden

alle 2-3 Tage gewechselt. Um die Eiablage anzuregen, wurde etwas Trockenhefe zugesetzt. Am 6. Tag wurden die Männchen aussortiert und die Weibchen alleine in neue Futterröhrchen transferiert.

Die Nachkommen der Kreuzung wurden auf Individuen untersucht, die keinen Augenphänotyp mehr zeigten. Diese Fliegen wurden mit der Linie Bc Gla/CyO gekreuzt, um die Mutation zu stabilisieren. Da EMS nur Veränderungen in einem Strang der DNA induziert, entstehen chimäre Tiere und es werden nicht alle Mutationen in der Keimbahn weitergeben. Von 22 isolierten Mutationen wurde nur *dBeach*¹⁻⁵ vererbt. Um Mutationen an anderen Stellen des Genoms zu entfernen, wurde *dBeach*¹⁻⁵ für 5 Generationen über einem Wildtyp-Chromosom gehalten. Dabei wurde auf das Vorhandensein des *white*-Gens des EP-Elements selektioniert.

5.3.6 Immunfärbung von larvalen Geweben

Für die Immunfärbungen wurden Larven des späten dritten Larvenstadiums verwendet. Die Larven wurden aus dem Futterröhrchen in eiskaltes Wasser überführt und gegebenenfalls nach GFP-markierten Balancern sortiert. Die Präparation wurde in PBS durchgeführt. Mit zwei Pinzetten wurden die Larven geteilt und durch Festhalten des Mundhakens und Ziehen der Kutikula umgestülpt. Nach Entfernen des Darms und des Fettkörpers konnte die gesamte Kutikula mit den anhängenden Imaginalscheiben fixiert werden. Alternativ wurden Augenimaginalscheiben oder die Speicheldrüsen durch Entfernen des Mundhakens präpariert. Die Gewebe wurden in einem kleinen Sieb in einer 48er-Platte in PBS auf Eis gesammelt. Zum Wechseln der Lösungen wurden die Siebe jeweils in die nächste Vertiefung überführt. Die Fixierung erfolgte mit Fixierpuffer für 30' bei RT. Anschließend wurden die Gewebe zweimal mit PBS gespült und 5' mit PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Wechselwirkungen wurde 3x 10' mit Blockpuffer bei RT gewaschen. Die Inkubation mit den Erstantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C in Waschpuffer. Am nächsten Tag wurden die Gewebe 2x mit Waschpuffer gespült und 3x 15' gewaschen. Die Zweitantikörper waren mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt und wurden für 1h in Waschpuffer + 2% Ziegen Serum bei RT im Dunkeln mit den Geweben inkubiert. Danach wurden diese 2x mit Waschpuffer gespült und 3x 15' gewaschen. Abschließend wurde mit PBS gewaschen, die Gewebe mit einer Kapillare auf einen Objektträger transferiert und dort fertig präpariert. Nach Entfernen des PBS wurden sie in Mowiol eingebettet.

Fixierpuffer:	3% Paraformaldehyd PBS
Blockpuffer:	5% BSA 0,3% Triton-X 100 PBS
Waschpuffer:	1% BSA 0,1% Triton-X 100 PBS

5.4 Klonierungsstrategien

5.4.1 Expressionsvektoren

5.4.1.1 pET-HopsF2

Die Nukleotide 2511 - 2915 der cDNA BcDNA:GH07910 (NCBI GeneBank AF181637) wurden von dem Vektor pOT2-GH07910 (Invitrogen) mit den Primern HopsF2 up und down amplifiziert und über die Schnittstellen XhoI und Nde I in den Vektor pET21b (Novagen) kloniert.

5.4.1.2 pET-BeachF3

Aus 20 µg RNA (adulte Köpfe) wurde durch reverse Transkription mit zufälligen Nonameren cDNA erzeugt. Von dieser cDNA wurde mit den Primern BeachF3 up und down ein 954 Bp langes Fragment des dBeach1-Transkripts amplifiziert. Dieses wurde durch TOPO-TA Klonierung (Invitrogen) in den Vektor pCRII kloniert. Aus diesem Vektor wurde es mit BamHI und XhoI ausgeschnitten und in den Vektor pET21b (Novagen) kloniert.

5.4.1.3 pGEX-BeachF4

Ein 411 Bp langes Fragment des dBeach1-Transkripts wurde mit den Primern BeachF4 up und down von cDNA (5.4.1.2) amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pGEX-4T2 (Amersham) kloniert.

5.4.1.4 pGEX-BeachF5

Ein 411 Bp langes Fragment des dBeach1-Transkripts wurde mit den Primern BeachF5 up und down von cDNA (5.4.1.2) amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pGEX-4T2 (Amersham) kloniert.

5.4.1.5 pGEX-APPL

Die Nukleotide 5869 – 6023 des Vektors pSL-APPL (Kuttenkeuler 2003) wurden mit den Primern APPLc up und down amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pGEX-4T2 (Amersham) kloniert.

5.4.2 P-Element-Vektoren

5.4.2.1 pUAST7

In den Vektor pUAST (Brand et al. 1993) wurde ein T7-Promoter eingefügt, so dass die Expression des klonierten Konstruktes durch *in-vitro* Translation überprüft werden kann. Dazu wurden die Primer pUAST7 sense und antisense aneinander gelagert und in pUAST ligiert, der mit Eco RI und BglII geschnitten war.

5.4.2.2 pUAST7-Hops

Die kodierende Sequenz von Hops/Tlk wurde mit den Primern Hops-Flag up und down von dem Vektor pOT2-GH07910 amplifiziert und durch TOPO-TA Klonierung (Invitrogen) in den

Vektor pCRII kloniert. Dabei wurde ein C-terminaler Flag-Tag eingeführt. Durch *in-vitro* Translation und Western Blot mit einem Antikörper gegen den Flag-Tag wurde die klonierte Sequenz auf Leseraster-Mutationen überprüft. Anschließend wurde das Fragment über die Schnittstellen Acc65I und XbaI in den Vektor pUAST7 kloniert.

5.4.2.3 pUAST7-Hops^{K956E}

Die Punktmutation K956E wurde durch einen veränderten Primer in die Sequenz von Hops/Tlk eingeführt. Dazu wurde ein Fragment der kodierenden Sequenz mit den Primern HopsK956E und Hops-Flag down amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde danach zusammen mit Hops-Flag up als Primer verwendet, um die gesamte kodierende Sequenz von Hops/Tlk zu amplifizieren. Dabei diente ein 3300 Bp langes Eco RI-Fragment von pOT2-GH07910 als Template. Das resultierende Produkt wurde mit XbaI und StuI verdaut und ein 1100 Bp langes Fragment durch Gelelektrophorese isoliert. Dieses Fragment wurde in XbaI und StuI geschnittenen pCRII-Hops (5.4.2.2) ligiert und sequenziert. Klone mit der gewünschten Mutation wurden abschließend über die Schnittstellen Acc65I und XbaI in pUAST7 kloniert.

5.4.2.4 pMT-Hops

Die kodierende Sequenz von Hops wurde aus dem Vektor pUAST7-Hops über die Schnittstellen Acc65I und XbaI in den Vektor pMT kloniert.

5.4.2.5 pMT-Hops^{K956E}

Die kodierende Sequenz von Hops wurde aus dem Vektor pUAST7-Hops^{K956E} über die Schnittstellen Acc65I und XbaI in den Vektor pMT kloniert.

5.4.3 Reportersystem

Die extrazellulär verkürzten Konstrukte für das Reportersystem (2.2.2.4) wurden durch ET-Klonierung erzeugt. Dazu wurde zuerst die Sequenz des APP- und des APLP2-Signalpeptids vor ein Chloramphenicol-Resistenzgen kloniert. Dies geschah durch Amplifikation mit den Primern APP-SP up und down bzw. APLP2-SP up und down von den Vektoren pUAST-APP^{LV} (Loewer 2001) bzw. pUAST-APLP2^{LV} (Kuttenkeuler 2003) und anschließender Ligation über die Schnittstellen XbaI und XhoI in den Vektor pSLfa-CAT (Loewer 2001). Von den erzeugten Vektoren (pSLCAT-APP-SP und pSLCAT-APLP2-SP) wurden die Signalpeptide und das Resistenzgen mit Primern amplifiziert, die Homologien zu den entsprechenden Zielvektoren haben (Tab. 8). Als zweiter Primer diente für alle PCR ET-alpha up. Durch Rekombination in YZ2000-Zellen (5.1.16) wurde die Ektodomäne bis zur (putativen) α -Schnittstelle deletiert. Das Resistenzgen wurde durch Verdau mit AscI und Religation entfernt.

Tab. 8 Schema der verschiedenen ET-Klonierung

PCR		Vektor	erzeugter Vektor
spezifischer Primer	Template		
ET-APP down	pSLCAT-APP-SP	pUAST-APP ^{LV}	pUAST-APP ^{AEC/LV}
ET-APLP2 down	pSLCAT-APP-SP	pUAST-APLP2 ^{LV}	pUAST-APLP2 ^{AEC/LV}
ET-APPL down	pSLCAT-APP-SP	pUAST-APPL ^{LV}	pUAST-APPL ^{AEC/LV}
ET-N down	pSLCAT-APP-SP	pUAST-N ^{AEGF/LV}	pUAST-N ^{AEC/LV}
ET-A2SP down	pSLCAT-APLP2-SP	pUAST-APLP2 ^{LV}	pUAST-A2SP-APLP2 ^{AEC/LV}

5.5 Oligonukleotide

5.5.1 Klonierungen

HopsF2 NdeI
 up: GACGGATCCGAATTCCAACCTCGAACGATTCCACGCAGC
 down: GACCTCGAGGTAGGCACCCGATACGGGGTCTG
XhoI

BeachF3 BamHI
 up: GACGGATCCGACAACCTTTGCGATCGCCGAGTAAAGAGC
 down: GACCTCGAGCAAAAGATCAGGACACCATATGCGAGCG
XhoI

Beach F4 BamHI
 up: GACGGATCCACCGAAGGACCCACCGTATGC
 down: GACCTCGAGTTAATTATCGCTGGTCATCGAAGTATCCTC
XhoI

BeachF5 BamHI
 up: GACGGATCCCCCATCGATCGCAAATTGAAGCGAGG
 down: GACCTCGAGTTAGAGGCTTGTATCTGATTTGCTCGGTC
XhoI

APPLc BamHI
 up: GACGGATCCGCCAAATGGCGAACATCGCGC
 down: GACCTCGAGTTACTCTTCACTTCGAAATACTTGTAGGTCGG
XhoI

pUAST7 AseI Eco RI
 sense: AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGCGCCGAATTCGACA
 antisense: GATCTGTCGAATTCGGCGCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC
Eco RI AseI

Hops-Flag Acc65I
 up: GACGGTACCATGGGATCAATTTCAAACCTCACTAAATCCGCG
 down: GACTCTAGACCTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATGGACGAACTCGACTGATTC
XbaI
 ATAT TGCC

HopsK956E

CGCTATGTCGCATGTGAGGTGCACCAATTAAC

APP-SP

up: GAC^{XbaI}TCTAGA^{AscI}GGCGCGCCACTAGTGGATCCCCGGGAGACGdown: GAC^{XhoI}CTCGAGCGCCCCGAGCCGTCCAGGC

APLP2-SP

up: GAC^{XbaI}TCTAGA^{AscI}GGCGCGCCGGCACGAGGGTGTGCTAAGCGAGdown: GAC^{XhoI}CTCGAGCGCCAAGGCAGGCGCCGTGA

ET-alpha up:

TTATTGAATACAAGAAGAGAACTCTGAATAGGGAATTGGG^{AscI}GGCGCGCCTAGGCCGGCCCCG
AATTC

ET-APP down:

GATTGCACCTTTGTTTGAACCCACATCTTCTGCAAAGAACACCAACCGCCCCGAGCCGTCCA
GGC

ET-APLP2 down:

TACTCAGACTGAAGTCCTCCCGCAGTGGGCCACGGATTCCCGCCCCGAGCCGTCCAGGC

ET-APPL down:

GACGTTGCGGCCCTCTTTGGCCGCGTGTGCATGTTGCGCGAACTCCGCCCCGAGCCGTCCA
GGC

ET-N down:

CGGCTCACCATTGTCCTCATCCCCGGGATTCTTGATGCCCTAACCGCCCCGAGCCGTCCAG
GC

ET-A2SP down:

TACTCAGACTGAAGTCCTCCCGCAGTGGGCCACGGATTCCCGCCAAGGCAGGCGCCGTGA

5.5.2 RT-PCR:

PsnAS

up: TTGTAAACACTGTTACGCCG

down: AACTTCAATCTGGCGACGAG

5.5.3 Northern Blot

Tub

for: GAAACGCCTGCTGGGAGCTCTAC

rev: TCGACGATCTCCTTGCCGATGGTG

5.5.4 Sequenzierungen:

pUAST-5': AAAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGC

pUAST-3': TCTCTGTAGGTAGTTTGTCCAATTATGTCACACCAC

Hops3000: AGGACGCCGACCTGCAGCTGG

6 Referenzen

- Abdelilah-Seyfried, S., Y. M. Chan, C. Zeng, N. J. Justice, S. Younger-Shepherd, L. E. Sharp, S. Barbel, S. A. Meadows, L. Y. Jan and Y. N. Jan (2000). "A Gain-of-Function Screen for Genes That Affect the Development of the Drosophila Adult External Sensory Organ." *Genetics* **155**(2): 733-752.
- Allinquant, B., P. Hantraye, P. Maillieux, K. Moya, C. Bouillot and A. Prochiantz (1995). "Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro." *J Cell Biol* **128**(5): 919-27.
- Allinson, T. M., E. T. Parkin, A. J. Turner and N. M. Hooper (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J Neurosci Res* **74**(3): 342-52.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtlich. Med* **64**: 146-148.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* **431**(7006): 350-5.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* **284**(5415): 770-6.
- Asai, M., C. Hattori, B. Szabo, N. Sasagawa, K. Maruyama, S. Tanuma and S. Ishiura (2003). "Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(1): 231-5.
- Baek, S. H., K. A. Ohgi, D. W. Rose, E. H. Koo, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2002). "Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein." *Cell* **110**(1): 55-67.
- Baonza, A. and A. Garcia-Bellido (2000). "Notch signaling directly controls cell proliferation in the Drosophila wing disc." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2609-14.
- Behr, D., M. Fricker, A. Nadin, E. E. Clarke, J. D. Wrigley, Y. M. Li, J. G. Culvenor, C. L. Masters, T. Harrison and M. S. Shearman (2003). "In vitro characterization of the presenilin-dependent gamma-secretase complex using a novel affinity ligand." *Biochemistry* **42**(27): 8133-42.
- Berdnik, D., T. Torok, M. Gonzalez-Gaitan and J. A. Knoblich (2002). "The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila." *Dev Cell* **3**(2): 221-31.
- Bergman, A., D. Religa, H. Karlstrom, H. Laudon, B. Winblad, L. Lannfelt, J. Lundkvist and J. Naslund (2003). "APP intracellular domain formation and unaltered signaling in the presence of familial Alzheimer's disease mutations." *Exp Cell Res* **287**(1): 1-9.
- Bilic, M. V. (2005). DFER Protein-Tyrosine Kinase – Its involvement in the Amyloid Precursor Protein (APP)-induced blistered wing phenotype and its functional characterization in Drosophila melanogaster. *ZMBH*. Heidelberg, University of Heidelberg: 191.
- Blobel, C. P. and J. M. White (1992). "Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain." *Curr Opin Cell Biol* **4**(5): 760-5.
- Borg, J. P., J. Ooi, E. Levy and B. Margolis (1996). "The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6229-41.
- Bradley, P. L., A. S. Haberman and D. J. Andrew (2001). "Organ formation in Drosophila: specification and morphogenesis of the salivary gland." *Bioessays* **23**(10): 901-11.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* **118**(2): 401-415.
- Breen, K. C., M. Bruce and B. H. Anderton (1991). "Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion." *J Neurosci Res* **28**(1): 90-100.
- Brickman, J. M., M. Adam and M. Ptashne (1999). "Interactions between an HMG-1 protein and members of the Rel family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19): 10679-83.
- Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black and A. Israel (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Mol Cell* **5**(2): 207-16.
- Brown, M. S., J. Ye, R. B. Rawson and J. L. Goldstein (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." *Cell* **100**(4): 391-8.

- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti and R. A. Black (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." *J Biol Chem* **273**(43): 27765-7.
- Cabaniols, J. P., V. Ravichandran and P. A. Roche (1999). "Phosphorylation of SNAP-23 by the novel kinase SNAK regulates t-SNARE complex assembly." *Mol Biol Cell* **10**(12): 4033-41.
- Cai, H., Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price and P. C. Wong (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." *Nat Neurosci* **4**(3): 233-4.
- Caille, I., B. Allinquant, E. Dupont, C. Bouillot, A. Langer, U. Muller and A. Prochiantz (2004). "Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone." *Development* **131**(9): 2173-81.
- Campion, D., A. Brice, et al. (1996). "A novel presenilin 1 mutation resulting in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years." *Neuroreport* **7**(10): 1582-4.
- Cao, X. and T. C. Sudhof (2001). "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." *Science* **293**(5527): 115-20.
- Cao, X. and T. C. Sudhof (2004). "Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation." *J Biol Chem* **279**(23): 24601-11.
- Capell, A., L. Meyn, R. Fluhrer, D. B. Teplow, J. Walter and C. Haass (2002). "Apical sorting of beta-secretase limits amyloid beta-peptide production." *J Biol Chem* **277**(7): 5637-43.
- Carrera, P., Y. M. Moshkin, S. Gronke, H. H. Sillje, E. A. Nigg, H. Jackle and F. Karch (2003). "Tousled-like kinase functions with the chromatin assembly pathway regulating nuclear divisions." *Genes Dev* **17**(20): 2578-90.
- Cataldo, A. M., J. L. Barnett, C. Pieroni and R. A. Nixon (1997). "Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis." *J Neurosci* **17**(16): 6142-51.
- Cataldo, A. M., C. M. Peterhoff, J. C. Troncoso, T. Gomez-Isla, B. T. Hyman and R. A. Nixon (2000). "Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations." *Am J Pathol* **157**(1): 277-86.
- Cervantes, S., C. A. Saura, E. Pomares, R. Gonzalez-Duarte and G. Marfany (2004). "Functional implications of the presenilin dimerization: reconstitution of gamma-secretase activity by assembly of a catalytic site at the dimer interface of two catalytically inactive presenilins." *J Biol Chem* **279**(35): 36519-29.
- Chyung, J. H., D. M. Raper and D. J. Selkoe (2004). "gamma -secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage." *J Biol Chem*.
- Citron, M. (2004). "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* **5**(9): 677-85.
- Coolen, M. W., K. M. Van Loo, N. N. Van Bakel, D. J. Pulford, L. Serneels, B. De Strooper, B. A. Ellenbroek, A. R. Cools and G. J. Martens (2005). "Gene dosage effect on gamma-secretase component Aph-1b in a rat model for neurodevelopmental disorders." *Neuron* **45**(4): 497-503.
- Cupers, P., I. Orlans, K. Craessaerts, W. Annaert and B. De Strooper (2001). "The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture." *J Neurochem* **78**(5): 1168-78.
- Daigle, I. and C. Li (1993). "apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24): 12045-9.
- De Strooper, B., M. Beullens, B. Contreras, L. Levesque, K. Craessaerts, B. Cordell, D. Moechars, M. Bollen, P. Fraser, P. S. George-Hyslop and F. Van Leuven (1997). "Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins." *J Biol Chem* **272**(6): 3590-8.
- Dejardin, J., A. Rappailles, O. Cuvier, C. Grimaud, M. Decoville, D. Locker and G. Cavalli (2005). "Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1." *Nature* **434**(7032): 533-8.

- Doan, A., G. Thinakaran, D. R. Borchelt, H. H. Slunt, T. Ratovitsky, M. Podlisny, D. J. Selkoe, M. Seeger, S. E. Gandy, D. L. Price and S. S. Sisodia (1996). "Protein topology of presenilin 1." *Neuron* **17**(5): 1023-30.
- Driscoll, M. and B. Gerstbrein (2003). "Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration." *Nat Rev Genet* **4**(3): 181-94.
- Duering, M., M. O. Grimm, H. S. Grimm, J. Schroder and T. Hartmann (2005). "Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42." *Neurobiol Aging* **26**(6): 785-8.
- Edbauer, D., E. Winkler, J. T. Regula, B. Pesold, H. Steiner and C. Haass (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." *Nat Cell Biol* **5**(5): 486-8.
- Eggert, S., K. Paliga, P. Soba, G. Evin, C. L. Masters, A. Weidemann and K. Beyreuther (2004). "The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation." *J Biol Chem* **279**(18): 18146-56.
- Ehehalt, R., P. Keller, C. Haass, C. Thiele and K. Simons (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." *J Cell Biol* **160**(1): 113-23.
- Engqvist-Goldstein, A. E. and D. G. Drubin (2003). "Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 287-332.
- Enright, A. J., B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander and D. S. Marks (2003). "MicroRNA targets in Drosophila." *Genome Biol* **5**(1): R1.
- Entchev, E. V., A. Schwabedissen and M. Gonzalez-Gaitan (2000). "Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp." *Cell* **103**(6): 981-91.
- Esch, F. S., P. S. Keim, E. C. Beattie, R. W. Blacher, A. R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure and P. J. Ward (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." *Science* **248**(4959): 1122-4.
- Esler, W. P., W. T. Kimberly, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, C. L. Moore, J. Y. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D. J. Selkoe and M. S. Wolfe (2000). "Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1." *Nat Cell Biol* **2**(7): 428-34.
- Esler, W. P. and M. S. Wolfe (2001). "A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces." *Science* **293**(5534): 1449-54.
- Evin, G., L. D. Canterford, D. E. Hoke, R. A. Sharples, J. G. Culvenor and C. L. Masters (2005). "Transition-State Analogue gamma-Secretase Inhibitors Stabilize a 900 kDa Presenilin/Nicastrin Complex." *Biochemistry* **44**(11): 4332-41.
- Farmery, M. R., L. O. Tjernberg, S. E. Pursglove, A. Bergman, B. Winblad and J. Naslund (2003). "Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain." *J Biol Chem* **278**(27): 24277-84.
- Farzan, M., C. E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung and H. Choe (2000). "BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9712-7.
- Finley, K. D., P. T. Edeen, R. C. Cumming, M. D. Mardahl-Dumesnil, B. J. Taylor, M. H. Rodriguez, C. E. Hwang, M. Benedetti and M. McKeown (2003). "blue cheese mutations define a novel, conserved gene involved in progressive neural degeneration." *J Neurosci* **23**(4): 1254-64.
- Fortini, M. E. (2002). "Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 673-84.
- Fortini, M. E., M. P. Skupski, M. S. Boguski and I. K. Hariharan (2000). "A survey of human disease gene counterparts in the Drosophila genome." *J Cell Biol* **150**(2): F23-30.
- Fossgreen, A., B. Bruckner, C. Czech, C. L. Masters, K. Beyreuther and R. Paro (1998). "Transgenic Drosophila expressing human amyloid precursor protein show gamma-secretase activity and a blistered-wing phenotype." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13703-8.
- Francis, R., G. McGrath, et al. (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." *Dev Cell* **3**(1): 85-97.
- Frankfort, B. J. and G. Mardon (2002). "R8 development in the Drosophila eye: a paradigm for neural selection and differentiation." *Development* **129**(6): 1295-306.

- Frise, E., J. A. Knoblich, S. Younger-Shepherd, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1996). "The Drosophila Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11925-32.
- Fryer, C. J., E. Lamar, I. Turbachova, C. Kintner and K. A. Jones (2002). "Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex." Genes Dev **16**(11): 1397-411.
- Furriols, M. and S. Bray (2000). "Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function." Dev Biol **227**(2): 520-32.
- Geling, A., H. Steiner, M. Willem, L. Bally-Cuif and C. Haass (2002). "A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish." EMBO Rep **3**(7): 688-94.
- Gertler, F. B., K. K. Hill, M. J. Clark and F. M. Hoffmann (1993). "Dosage-sensitive modifiers of Drosophila abl tyrosine kinase function: prospero, a regulator of axonal outgrowth, and disabled, a novel tyrosine kinase substrate." Genes Dev **7**(3): 441-53.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-90.
- Gonzalez-Quevedo, R., M. Shoffer, L. Horng and A. E. Oro (2005). "Receptor tyrosine phosphatase-dependent cytoskeletal remodeling by the hedgehog-responsive gene MIM/BEG4." J Cell Biol **168**(3): 453-63.
- Goutte, C., W. Hepler, K. M. Mickey and J. R. Priess (2000). "aph-2 encodes a novel extracellular protein required for GLP-1-mediated signaling." Development **127**(11): 2481-92.
- Goutte, C., M. Tsunozaki, V. A. Hale and J. R. Priess (2002). "APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in Caenorhabditis elegans embryos." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 775-9.
- Grbovic, O. M., P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, R. Dinakar, N. B. Summers-Terio, B. P. Ceresa, R. A. Nixon and A. M. Cataldo (2003). "Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production." J Biol Chem **278**(33): 31261-8.
- Greeve, I., D. Kretschmar, J. A. Tschape, A. Beyn, C. Brellinger, M. Schweizer, R. M. Nitsch and R. Reifegerste (2004). "Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic Drosophila." J Neurosci **24**(16): 3899-906.
- Groth, A., J. Lukas, E. A. Nigg, H. H. Sillje, C. Wernstedt, J. Bartek and K. Hansen (2003). "Human Tousled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint." Embo J **22**(7): 1676-87.
- Grziwa, B., M. O. Grimm, C. L. Masters, K. Beyreuther, T. Hartmann and S. F. Lichtenthaler (2003). "The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted." J Biol Chem **278**(9): 6803-8.
- Gunawardena, S. and L. S. Goldstein (2001). "Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila." Neuron **32**(3): 389-401.
- Guo, M., E. J. Hong, J. Fernandes, S. L. Zipursky and B. A. Hay (2003). "A reporter for amyloid precursor protein gamma-secretase activity in Drosophila." Hum Mol Genet **12**(20): 2669-78.
- Gupta-Rossi, N., E. Six, O. LeBail, F. Logeat, P. Chastagner, A. Olry, A. Israel and C. Brou (2004). "Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor." J Cell Biol **166**(1): 73-83.
- Haass, C. (2004). "Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." Embo J **23**(3): 483-8.
- Haass, C., E. H. Koo, A. Capell, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1995). "Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals." J Cell Biol **128**(4): 537-47.
- Haass, C., M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, D. B. Teplow and et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." Nature **359**(6393): 322-5.
- Han, Z., J. R. Saam, H. P. Adams, S. E. Mango and J. M. Schumacher (2003). "The C. elegans Tousled-like kinase (TLK-1) has an essential role in transcription." Curr Biol **13**(22): 1921-9.
- Hardy, J. (1997). "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease." Trends Neurosci **20**(4): 154-9.

- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-6.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura and P. Saftig (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." *Hum Mol Genet* **11**(21): 2615-24.
- Hasegawa, H., N. Sanjo, et al. (2004). "Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes." *J Biol Chem* **279**(45): 46455-63.
- Hayashi, Y., K. Kashiwagi, J. Ohta, M. Nakajima, T. Kawashima and K. Yoshikawa (1994). "Alzheimer amyloid protein precursor enhances proliferation of neural stem cells from fetal rat brain." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(1): 936-43.
- Heber, S., J. Herms, et al. (2000). "Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members." *J Neurosci* **20**(21): 7951-63.
- Hebert, S. S., L. Serneels, T. Dejaegere, K. Horre, M. Dabrowski, V. Baert, W. Annaert, D. Hartmann and B. De Strooper (2004). "Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity." *Neurobiol Dis* **17**(2): 260-72.
- Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretschmar, S. Sisodia and U. Muller (2004). "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members." *Embo J* **23**(20): 4106-15.
- Herreman, A., L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans and B. De Strooper (2000). "Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells." *Nat Cell Biol* **2**(7): 461-2.
- Ho, A. and T. C. Sudhof (2004). "Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2548-53.
- Hu, Y. and M. E. Fortini (2003). "Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex." *J Cell Biol* **161**(4): 685-90.
- Hung, A. Y., C. Haass, R. M. Nitsch, W. Q. Qiu, M. Citron, R. J. Wurtman, J. H. Growdon and D. J. Selkoe (1993). "Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein." *J Biol Chem* **268**(31): 22959-62.
- Huse, J. T., D. S. Pijak, G. J. Leslie, V. M. Lee and R. W. Doms (2000). "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." *J Biol Chem* **275**(43): 33729-37.
- Hussain, I., D. Powell, et al. (1999). "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." *Mol Cell Neurosci* **14**(6): 419-27.
- Ida, N., T. Hartmann, J. Pantel, J. Schroder, R. Zerfass, H. Forstl, R. Sandbrink, C. L. Masters and K. Beyreuther (1996). "Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay." *J Biol Chem* **271**(37): 22908-14.
- Iijima, K., H. P. Liu, A. S. Chiang, S. A. Hearn, M. Konsolaki and Y. Zhong (2004). "Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in Drosophila: a potential model for Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6623-8.
- Jogl, G., Y. Shen, D. Gebauer, J. Li, K. Wiegmann, H. Kashkar, M. Kronke and L. Tong (2002). "Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain." *Embo J* **21**(18): 4785-95.
- Kaether, C., A. Capell, D. Edbauer, E. Winkler, B. Novak, H. Steiner and C. Haass (2004). "The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity." *Embo J* **23**(24): 4738-48.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* **325**(6106): 733-6.
- Kerr, M. L. and D. H. Small (2005). "Cytoplasmic domain of the beta-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease: Function, regulation of proteolysis, and implications for drug development." *J Neurosci Res*.

- Kidd, S., T. Lieber and M. W. Young (1998). "Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos." Genes and Development **12**(23): 3728-3740.
- Kim, S. H., T. Ikeuchi, C. Yu and S. S. Sisodia (2003). "Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the "gamma-secretase" complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates." J Biol Chem **278**(36): 33992-4002.
- Kimberly, W. T., M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, W. Ye, M. S. Wolfe and D. J. Selkoe (2003). "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6382-7.
- Kitazume, S., Y. Tachida, R. Oka, K. Shirotani, T. C. Saido and Y. Hashimoto (2001). "Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13554-9.
- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, T. C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki and S. Ishiura (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." Biochem J **343 Pt 2**: 371-5.
- Kopan, R. and M. X. Ilagan (2004). "Gamma-secretase: proteasome of the membrane?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 499-504.
- Kornilova, A. Y., F. Bihel, C. Das and M. S. Wolfe (2005). "The initial substrate-binding site of gamma-secretase is located on presenilin near the active site." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3230-5.
- Krause, A., S. A. Haas, E. Coward and M. Vingron (2002). "SYSTEMS, GeneNest, SpliceNest: exploring sequence space from genome to protein." Nucleic Acids Res **30**(1): 299-300.
- Kraut, R., K. Menon and K. Zinn (2001). "A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*." Curr Biol **11**(6): 417-30.
- Kuttenkeuler, D. (2003). Untersuchung der Prozessierung von APP und Notch mit einem in-vivo Reportersystem in *Drosophila melanogaster*. ZMBH. Heidelberg, University of Heidelberg: 95.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass and F. Fahrenholz (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3922-7.
- LaVoie, M. J., P. C. Fraering, B. L. Ostaszewski, W. Ye, W. T. Kimberly, M. S. Wolfe and D. J. Selkoe (2003). "Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin." J Biol Chem **278**(39): 37213-22.
- Le Borgne, R. and F. Schweisguth (2003). "Notch signaling: endocytosis makes delta signal better." Curr Biol **13**(7): R273-5.
- Lee, M. S., S. C. Kao, C. A. Lemere, W. Xia, H. C. Tseng, Y. Zhou, R. Neve, M. K. Ahljianian and L. H. Tsai (2003). "APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation." J Cell Biol **163**(1): 83-95.
- Lee, S. F., S. Shah, et al. (2004). "A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex." J Biol Chem **279**(6): 4144-52.
- Lemere, C. A., F. Lopera, et al. (1996). "The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology." Nat Med **2**(10): 1146-50.
- Li, X. and I. Greenwald (1996). "Membrane topology of the *C. elegans* SEL-12 presenilin." Neuron **17**(5): 1015-21.
- Li, X., X. Zhao, Y. Fang, X. Jiang, T. Duong, C. Fan, C. C. Huang and S. R. Kain (1998). "Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter." J Biol Chem **273**(52): 34970-5.
- Li, Y., R. DeFatta, C. Anthony, G. Sunavala and A. De Benedetti (2001). "A translationally regulated Tousled kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed." Oncogene **20**(6): 726-38.

- Li, Y., H. Wang, S. Wang, D. Quon, Y. W. Liu and B. Cordell (2003). "Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 259-64.
- Li, Y. M., M. T. Lai, M. Xu, Q. Huang, J. DiMuzio-Mower, M. K. Sardana, X. P. Shi, K. C. Yin, J. A. Shafer and S. J. Gardell (2000). "Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6138-43.
- Li, Y. M., M. Xu, et al. (2000). "Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1." *Nature* **405**(6787): 689-94.
- Lichtenthaler, S. F., D. I. Dominguez, G. G. Westmeyer, K. Reiss, C. Haass, P. Saftig, B. De Strooper and B. Seed (2003). "The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1." *J Biol Chem* **278**(49): 48713-9.
- Lichtenthaler, S. F., G. Multhaup, C. L. Masters and K. Beyreuther (1999). "A novel substrate for analyzing Alzheimer's disease gamma-secretase." *FEBS Lett* **453**(3): 288-92.
- Lieber, T., S. Kidd and M. W. Young (2002). "kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch." *Genes Dev* **16**(2): 209-21.
- Loewer, A. (2001). Etablierung eines in-vivo Reportersystems für die Prozessierung von APP und Notch. *Faculty of Biology*. Heidelberg, University of Heidelberg: 110.
- Luo, L., T. Tully and K. White (1992). "Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene." *Neuron* **9**(4): 595-605.
- Luo, L. Q., L. E. Martin-Morris and K. White (1990). "Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor." *J Neurosci* **10**(12): 3849-61.
- Luo, W. J., H. Wang, H. Li, B. S. Kim, S. Shah, H. J. Lee, G. Thinakaran, T. W. Kim, G. Yu and H. Xu (2003). "PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1." *J Biol Chem* **278**(10): 7850-4.
- Luo, Y., B. Bolon, et al. (2001). "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation." *Nat Neurosci* **4**(3): 231-2.
- Maillet, M., S. J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien, J. Bertoglio, J. L. Zugaza, R. Fischmeister and F. Lezoualc'h (2003). "Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha." *Nat Cell Biol* **5**(7): 633-9.
- Masters, C. L., G. Multhaup, G. Simms, J. Pottgiesser, R. N. Martins and K. Beyreuther (1985). "Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels." *Embo J* **4**(11): 2757-63.
- Mattila, P. K., M. Salminen, T. Yamashiro and P. Lappalainen (2003). "Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain." *J Biol Chem* **278**(10): 8452-9.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." *Nature* **430**(7000): 631-9.
- McGuire, S. E., G. Roman and R. L. Davis (2004). "Gene expression systems in Drosophila: a synthesis of time and space." *Trends Genet* **20**(8): 384-91.
- Merdes, G., P. Soba, A. Loewer, M. V. Bilic, K. Beyreuther and R. Paro (2004). "Interference of human and Drosophila APP and APP-like proteins with PNS development in Drosophila." *Embo J* **23**(20): 4082-95.
- Micchelli, C. A., W. P. Esler, W. T. Kimberly, C. Jack, O. Berezovska, A. Kornilova, B. T. Hyman, N. Perrimon and M. S. Wolfe (2003). "Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in Drosophila." *Faseb J* **17**(1): 79-81.
- Mills, J., D. Laurent Charest, F. Lam, K. Beyreuther, N. Ida, S. L. Pelech and P. B. Reiner (1997). "Regulation of amyloid precursor protein catabolism involves the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." *J Neurosci* **17**(24): 9415-22.
- Mills, J. and P. B. Reiner (1999). "Regulation of amyloid precursor protein cleavage." *J Neurochem* **72**(2): 443-60.
- Mishra, S. K., P. A. Keyel, M. J. Hawryluk, N. R. Agostinelli, S. C. Watkins and L. M. Traub (2002). "Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor." *Embo J* **21**(18): 4915-26.
- Moehlmann, T., E. Winkler, X. Xia, D. Edbauer, J. Murrell, A. Capell, C. Kaether, H. Zheng, B. Ghetti, C. Haass and H. Steiner (2002). "Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect

- the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8025-30.
- Moore, C. L., T. S. Diehl, D. J. Selkoe and M. S. Wolfe (2000). "Toward the characterization and identification of gamma-secretases using transition-state analogue inhibitors." *Ann N Y Acad Sci* **920**: 197-205.
- Mosrin-Huaman, C., L. Canaple, D. Locker and M. Decoville (1998). "DSP1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development." *Dev Genet* **23**(4): 324-34.
- Muller, U., N. Cristina, Z. W. Li, D. P. Wolfer, H. P. Lipp, T. Rulicke, S. Brandner, A. Aguzzi and C. Weissmann (1994). "Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene." *Cell* **79**(5): 755-65.
- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray and R. Kopan (2000). "A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1." *Molecular Cell* **5**(2): 197-206.
- Muqit, M. M. and M. B. Feany (2002). "Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach?" *Nat Rev Neurosci* **3**(3): 237-43.
- Muralidhar, M. G. and J. B. Thomas (1993). "The *Drosophila* bendless gene encodes a neural protein related to ubiquitin-conjugating enzymes." *Neuron* **11**(2): 253-66.
- Nagle, D. L., M. A. Karim, et al. (1996). "Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome." *Nat Genet* **14**(3): 307-11.
- Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." *J Biol Chem* **270**(48): 28495-8.
- Niimura, M., N. Isoo, N. Takasugi, M. Tsuruoka, K. Ui-Tei, K. Saigo, Y. Morohashi, T. Tomita and T. Iwatsubo (2005). "Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma - secretase complex through mechanisms involving inter- and intramolecular interactions." *J Biol Chem*.
- Nishimoto, I., T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, Y. Murayama and E. Ogata (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)." *Nature* **362**(6415): 75-9.
- Nitsch, R. M., B. E. Slack, R. J. Wurtman and J. H. Growdon (1992). "Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors." *Science* **258**(5080): 304-7.
- Nixon, R. A. (2004). "Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up." *Am J Pathol* **164**(3): 757-61.
- Nowotny, P., S. M. Gorski, S. W. Han, K. Philips, W. J. Ray, V. Nowotny, C. J. Jones, R. F. Clark, R. L. Cagan and A. M. Goate (2000). "Posttranslational modification and plasma membrane localization of the *Drosophila melanogaster* presenilin." *Mol Cell Neurosci* **15**(1): 88-98.
- Nyborg, A. C., A. Y. Kornilova, K. Jansen, T. B. Ladd, M. S. Wolfe and T. E. Golde (2004). "Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed gamma-secretase inhibitor." *J Biol Chem* **279**(15): 15153-60.
- O'Connor-Giles, K. M. and J. B. Skeath (2003). "Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*." *Dev Cell* **5**(2): 231-43.
- Oh, C. E., R. McMahon, S. Benzer and M. A. Tanouye (1994). "bendless, a *Drosophila* gene affecting neuronal connectivity, encodes a ubiquitin-conjugating enzyme homolog." *J Neurosci* **14**(5 Pt 2): 3166-79.
- Okado, H. and H. Okamoto (1992). "A *Xenopus* homologue of the human beta-amyloid precursor protein: developmental regulation of its gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* **189**(3): 1561-8.
- Okochi, M., H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, M. Takeda and C. Haass (2002). "Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1." *Embo J* **21**(20): 5408-16.
- Ono, Y., T. Kinouchi, H. Sorimachi, S. Ishiura and K. Suzuki (1997). "Deletion of an endosomal/lysosomal targeting signal promotes the secretion of Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP)." *J Biochem (Tokyo)* **121**(3): 585-90.

- Pan, D. and G. M. Rubin (1997). "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis." *Cell* **90**(2): 271-280.
- Parks, A. L., F. R. Turner and M. A. Muskavitch (1995). "Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during Drosophila eye development." *Mech Dev* **50**(2-3): 201-16.
- Pasternak, S. H., R. D. Bagshaw, M. Guiral, S. Zhang, C. A. Ackerley, B. J. Pak, J. W. Callahan and D. J. Mahuran (2003). "Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane." *J Biol Chem* **278**(29): 26687-94.
- Pedrini, S., T. L. Carter, G. Prendergast, S. Petanceska, M. E. Ehrlich and S. Gandy (2005). "Modulation of Statin-Activated Shedding of Alzheimer APP Ectodomain by ROCK." *PLoS Med* **2**(1): e18.
- Perez, R. G., S. Soriano, J. D. Hayes, B. Ostaszewski, W. Xia, D. J. Selkoe, X. Chen, G. B. Stokin and E. H. Koo (1999). "Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42." *J Biol Chem* **274**(27): 18851-6.
- Periz, G. and M. E. Fortini (2004). "Functional reconstitution of gamma-secretase through coordinated expression of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." *J Neurosci Res* **77**(3): 309-22.
- Phiel, C. J., C. A. Wilson, V. M. Lee and P. S. Klein (2003). "GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides." *Nature* **423**(6938): 435-9.
- Postina, R., A. Schroeder, et al. (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." *J Clin Invest* **113**(10): 1456-64.
- Qiu, W. Q., A. Ferreira, C. Miller, E. H. Koo and D. J. Selkoe (1995). "Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner." *J Neurosci* **15**(3 Pt 2): 2157-67.
- Ramelot, T. A., L. N. Gentile and L. K. Nicholson (2000). "Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors." *Biochemistry* **39**(10): 2714-25.
- Ratovitski, T., H. H. Slunt, G. Thinakaran, D. L. Price, S. S. Sisodia and D. R. Borchelt (1997). "Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin." *J Biol Chem* **272**(39): 24536-41.
- Rawson, R. B. (2002). "Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus." *Essays Biochem* **38**: 155-68.
- Roberts, S. B., J. A. Ripellino, K. M. Ingalls, N. K. Robakis and K. M. Felsenstein (1994). "Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase." *J Biol Chem* **269**(4): 3111-6.
- Roe, J. L., T. Durfee, J. R. Zupan, P. P. Repetti, B. G. McLean and P. C. Zambryski (1997). "TOUSLED is a nuclear serine/threonine protein kinase that requires a coiled-coil region for oligomerization and catalytic activity." *J Biol Chem* **272**(9): 5838-45.
- Roe, J. L., C. J. Rivin, R. A. Sessions, K. A. Feldmann and P. C. Zambryski (1993). "The Tousled gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development." *Cell* **75**(5): 939-50.
- Rogge, R. D., C. A. Karlovich and U. Banerjee (1991). "Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases." *Cell* **64**(1): 39-48.
- Roncarati, R., N. Sestan, M. H. Scheinfeld, B. E. Berechid, P. A. Lopez, O. Meucci, J. C. McGlade, P. Rakic and L. D'Adamio (2002). "The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 7102-7.
- Rooke, J., D. Pan, T. Xu and G. M. Rubin (1996). "KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis." *Science* **273**(5279): 1227-1231.
- Rorth, P. (1996). "A modular misexpression screen in Drosophila detecting tissue-specific phenotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12418-12422.

- Rorth, P., K. Szabo, A. Bailey, T. Lavery, J. Rehm, G. M. Rubin, K. Weigmann, M. Milan, V. Benes, W. Ansorge and S. M. Cohen (1998). "Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*." Development **125**(6): 1049-57.
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, et al. (2000). "Comparative genomics of the eukaryotes." Science **287**(5461): 2204-15.
- Sabo, S. L., A. F. Ikin, J. D. Buxbaum and P. Greengard (2001). "The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement." J Cell Biol **153**(7): 1403-14.
- Sakata, T., H. Sakaguchi, L. Tsuda, A. Higashitani, T. Aigaki, K. Matsuno and S. Hayashi (2004). "*Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation." Curr Biol **14**(24): 2228-36.
- Scheinfeld, M. H., E. Ghersi, K. Laky, B. J. Fowlkes and L. D'Adamio (2002). "Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription." J Biol Chem **277**(46): 44195-201.
- Scheuner, D., C. Eckman, et al. (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." Nat Med **2**(8): 864-70.
- Schmid, S. L. (1997). "Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process." Annu Rev Biochem **66**: 511-48.
- Schroeter, E. H., M. X. Ilagan, et al. (2003). "A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 13075-80.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork and C. P. Ponting (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5857-64.
- Schweisguth, F. (2004). "Notch signaling activity." Curr Biol **14**(3): R129-38.
- Seeger, M., C. Nordstedt, et al. (1997). "Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5090-4.
- Selkoe, D. J. (2004). "Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases." Nat Cell Biol **6**(11): 1054-61.
- Selkoe, D. J., T. Yamazaki, M. Citron, M. B. Podlisny, E. H. Koo, D. B. Teplow and C. Haass (1996). "The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein." Ann N Y Acad Sci **777**: 57-64.
- Serneels, L., T. Dejaegere, et al. (2005). "Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1719-24.
- Seubert, P., T. Oltsersdorf, M. G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D. L. Davis, K. Bryant, L. C. Fritz, D. Galasko, L. J. Thal and e. al. (1993). "Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide." Nature **361**(6409): 260-3.
- Shellenbarger, D. L. and J. D. Mohler (1978). "Temperature-sensitive periods and autonomy of pleiotropic effects of l(1)Nts1, a conditional notch lethal in *Drosophila*." Dev Biol **62**(2): 432-46.
- Shirotani, K., D. Edbauer, S. Prokop, C. Haass and H. Steiner (2004). "Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants." J Biol Chem **279**(40): 41340-5.
- Sillje, H. H. and E. A. Nigg (2001). "Identification of human Asf1 chromatin assembly factors as substrates of Tousled-like kinases." Curr Biol **11**(13): 1068-73.
- Sillje, H. H., K. Takahashi, K. Tanaka, G. Van Houwe and E. A. Nigg (1999). "Mammalian homologues of the plant Tousled gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication." Embo J **18**(20): 5691-702.
- Simonsen, A., H. C. Birkeland, D. J. Gillooly, N. Mizushima, A. Kuma, T. Yoshimori, T. Slagsvold, A. Brech and H. Stenmark (2004). "Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes." J Cell Sci **117**(Pt 18): 4239-51.
- Sinha, S., J. P. Anderson, et al. (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." Nature **402**(6761): 537-40.
- Slack, B. E., R. M. Nitsch, E. Livneh, G. M. Kunz, Jr., J. Brey, H. Eldar and R. J. Wurtman (1993). "Regulation by phorbol esters of amyloid precursor protein release from Swiss 3T3 fibroblasts overexpressing protein kinase C alpha." J Biol Chem **268**(28): 21097-101.

- Slunt, H. H., G. Thinakaran, C. Von Koch, A. C. Lo, R. E. Tanzi and S. S. Sisodia (1994). "Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP)." *J Biol Chem* **269**(4): 2637-44.
- Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena and E. J. Neer (1999). "The WD repeat: a common architecture for diverse functions." *Trends Biochem Sci* **24**(5): 181-5.
- Soba, P. (2004). Studies of the cell biological function of the Amyloid Precursor Protein (APP) family in *Drosophila melanogaster* and mammals. *Faculty of Natural Sciences, Heidelberg, University of Heidelberg*: 135.
- Soba, P., S. Eggert, H. Zentgraf, S. Kreger, A. Loewer, G. Merdes, R. Paro, C. L. Masters, U. Müller, S. Kins and K. Beyreuther (2005). "Cell interactions are promoted by trans-dimerization of APP family members, arranged as homo- or heterocomplexes in synaptic membranes." *Embo J* **under Revision**.
- Somsel Rodman, J. and A. Wandinger-Ness (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 183-92.
- Song, W., P. Nadeau, M. Yuan, X. Yang, J. Shen and B. A. Yankner (1999). "Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6959-63.
- Songyang, Z., B. Margolis, M. Chaudhuri, S. E. Shoelson and L. C. Cantley (1995). "The phosphotyrosine interaction domain of SHC recognizes tyrosine-phosphorylated NPXY motif." *J Biol Chem* **270**(25): 14863-6.
- Stark, A., J. Brennecke, R. B. Russell and S. M. Cohen (2003). "Identification of *Drosophila* MicroRNA targets." *PLoS Biol* **1**(3): E60.
- Steiner, H., M. Kostka, et al. (2000). "Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases." *Nat Cell Biol* **2**(11): 848-51.
- Steiner, H., E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka and C. Haass (2002). "PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin." *J Biol Chem* **277**(42): 39062-5.
- Stenmark, H. and R. Aasland (1999). "FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid." *J Cell Sci* **112 (Pt 23)**: 4175-83.
- Stenmark, H., R. Aasland and P. C. Driscoll (2002). "The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger." *FEBS Lett* **513**(1): 77-84.
- Stowers, R. S. and T. L. Schwarz (1999). "A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype." *Genetics* **152**(4): 1631-9.
- Struhl, G. and A. Adachi (1998). "Nuclear access and action of notch in vivo." *Cell* **93**(4): 649-660.
- Struhl, G. and A. Adachi (2000). "Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins." *Molecular Cell* **6**(3): 625-636.
- Struhl, G. and I. Greenwald (2001). "Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 229-34.
- Suzuki, N., T. T. Cheung, X. D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, Jr., C. Eckman, T. E. Golde and S. G. Younkin (1994). "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants." *Science* **264**(5163): 1336-40.
- Takasugi, N., T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran and T. Iwatsubo (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." *Nature* **422**(6930): 438-41.
- Tchernev, V. T., T. A. Mansfield, et al. (2002). "The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins." *Mol Med* **8**(1): 56-64.
- Thackeray, J. R., P. C. Gaines, P. Ebert and J. R. Carlson (1998). "small wing encodes a phospholipase C-(gamma) that acts as a negative regulator of R7 development in *Drosophila*." *Development* **125**(24): 5033-42.
- Thinakaran, G., C. L. Harris, T. Ratovitski, F. Davenport, H. H. Slunt, D. L. Price, D. R. Borchelt and S. S. Sisodia (1997). "Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors." *J Biol Chem* **272**(45): 28415-22.
- Torroja, L., H. Chu, I. Kotovsky and K. White (1999). "Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport." *Curr Biol* **9**(9): 489-92.

- Torroja, L., L. Luo and K. White (1996). "APPL, the Drosophila member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons." *J Neurosci* **16**(15): 4638-50.
- Torroja, L., M. Packard, M. Gorczyca, K. White and V. Budnik (1999). "The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction." *J Neurosci* **19**(18): 7793-803.
- Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* **286**(5440): 735-41.
- von Koch, C. S., H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L. H. van der Ploeg, D. L. Price and S. S. Sisodia (1997). "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice." *Neurobiol Aging* **18**(6): 661-9.
- Walsh, D. M., J. V. Fadeeva, M. J. LaVoie, K. Paliga, S. Eggert, W. T. Kimberly, W. Wasco and D. J. Selkoe (2003). "gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins." *Biochemistry* **42**(22): 6664-73.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J. F. Gusella, R. E. Tanzi and F. Solomon (1992). "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10758-62.
- Weidemann, A., S. Eggert, F. B. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C. L. Masters, K. Beyreuther and G. Evin (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." *Biochemistry* **41**(8): 2825-35.
- Weidemann, A., G. Konig, D. Bunke, P. Fischer, J. M. Salbaum, C. L. Masters and K. Beyreuther (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." *Cell* **57**(1): 115-26.
- Weihe, U., M. Milan and S. M. Cohen (2001). "Regulation of Apterous activity in Drosophila wing development." *Development* **128**(22): 4615-22.
- Weihofen, A., K. Binns, M. K. Lemberg, K. Ashman and B. Martoglio (2002). "Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease." *Science* **296**(5576): 2215-8.
- Weskamp, G., H. Cai, T. A. Brodie, S. Higashiyama, K. Manova, T. Ludwig and C. P. Blobel (2002). "Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life." *Mol Cell Biol* **22**(5): 1537-44.
- Wilkin, M. B., A. M. Carbery, M. Fostier, H. Aslam, S. L. Mazaleyrat, J. Higgs, A. Myat, D. A. Evans, M. Cornell and M. Baron (2004). "Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins." *Curr Biol* **14**(24): 2237-44.
- Wolfe, M. S., W. Xia, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, W. T. Kimberly and D. J. Selkoe (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature* **398**(6727): 513-7.
- Wolff, T. and D. F. Ready (1993). Pattern Formation in the Drosophila Retina. *The Development of Drosophila melanogaster*. M. Bate and A. Martinez Arias. Plainview, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2**: 1277-1326.
- Xu, T. and G. M. Rubin (1993). "Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues." *Development* **117**(4): 1223-37.
- Ye, Y. and M. E. Fortini (1999). "Apoptotic activities of wild-type and Alzheimer's disease-related mutant presenilins in Drosophila melanogaster." *J Cell Biol* **146**(6): 1351-64.
- Ye, Y., N. Lukinova and M. E. Fortini (1999). "Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants." *Nature* **398**(6727): 525-9.
- Yu, G., M. Nishimura, et al. (2000). "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing." *Nature* **407**(6800): 48-54.
- Yun, M., L. Keshvara, C. G. Park, Y. M. Zhang, J. B. Dickerson, J. Zheng, C. O. Rock, T. Curran and H. W. Park (2003). "Crystal structures of the Dab homology domains of mouse disabled 1 and 2." *J Biol Chem* **278**(38): 36572-81.
- Zheng, H., M. Jiang, M. E. Trumbauer, D. J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D. W. Smith, R. P. Heavens, G. R. Dawson, S. Boyce, M. W. Conner and et al. (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell* **81**(4): 525-31.

7 Eigene Veröffentlichungen:

- Loewer, A.**, P. Soba, K. Beyreuther, R. Paro and G. Merdes (2004). "Cell-type-specific processing of the amyloid precursor protein by Presenilin during *Drosophila* development." *EMBO Rep* **5**(4): 405-11.
- Merdes, G., P. Soba, **A. Loewer**, M. V. Bilic, K. Beyreuther and R. Paro (2004). "Interference of human and *Drosophila* APP and APP-like proteins with PNS development in *Drosophila*." *EMBO J* **23**(20): 4082-95.
- Soba, P., S. Eggert, H. Zentgraf, S. Kreger, **A. Loewer**, G. Merdes, R. Paro, C. L. Masters, U. Müller, S. Kins and K. Beyreuther (2005). "Cell interactions are promoted by trans-dimerization of APP family members, arranged as homo- or heterocomplexes in synaptic membranes." *EMBO J* **under Revision**.
- Bilic, M. V., **A. Loewer**, R. Paro and G. Merdes (2004). "Drosophila und humane Krankheitsgene." *BIOforum* **5**

8 Abkürzungen

Aminosäuren:

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

Gene, Proteine und Proteindomänen:

ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
A ^{ICD}	APP intrazelluläre Domäne
Ap	Apterous
Aph1	Anterior Pharynx defective - 1
APLP	Amyloid Precursor Like Protein
APP	Amyloid-Vorläuferprotein, Amyloid Precursor Protein
APPL	Amyloid Precursor Protein Like
BACE	Beta-site APP-Cleaving Enzyme
CSL	CBF1/Su(H)/Lag-1
Psn	<i>Drosophila</i> Presenilin
EGF	Epidermal Growth Factor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
iCLiP	Intramembrane-Cleaving Protease
Kuz	Kuzbanian
LNR	Lin-12/Notch Motiv, Lin-12/Notch repeat
Nct	Nicastrin
N ^{ICD}	Notch, intrazelluläre Domäne
NLS	Nuclear Localisation Signal
Pen2	Presenilin Enhancer 2
PKC	Proteinkinase C
PS	humanes Presenilin
Su(H)	Suppressor of Hairless
TACE	TNF α -Converting Enzyme

Drosophila Balancer-Chromosomen und dominante Marker

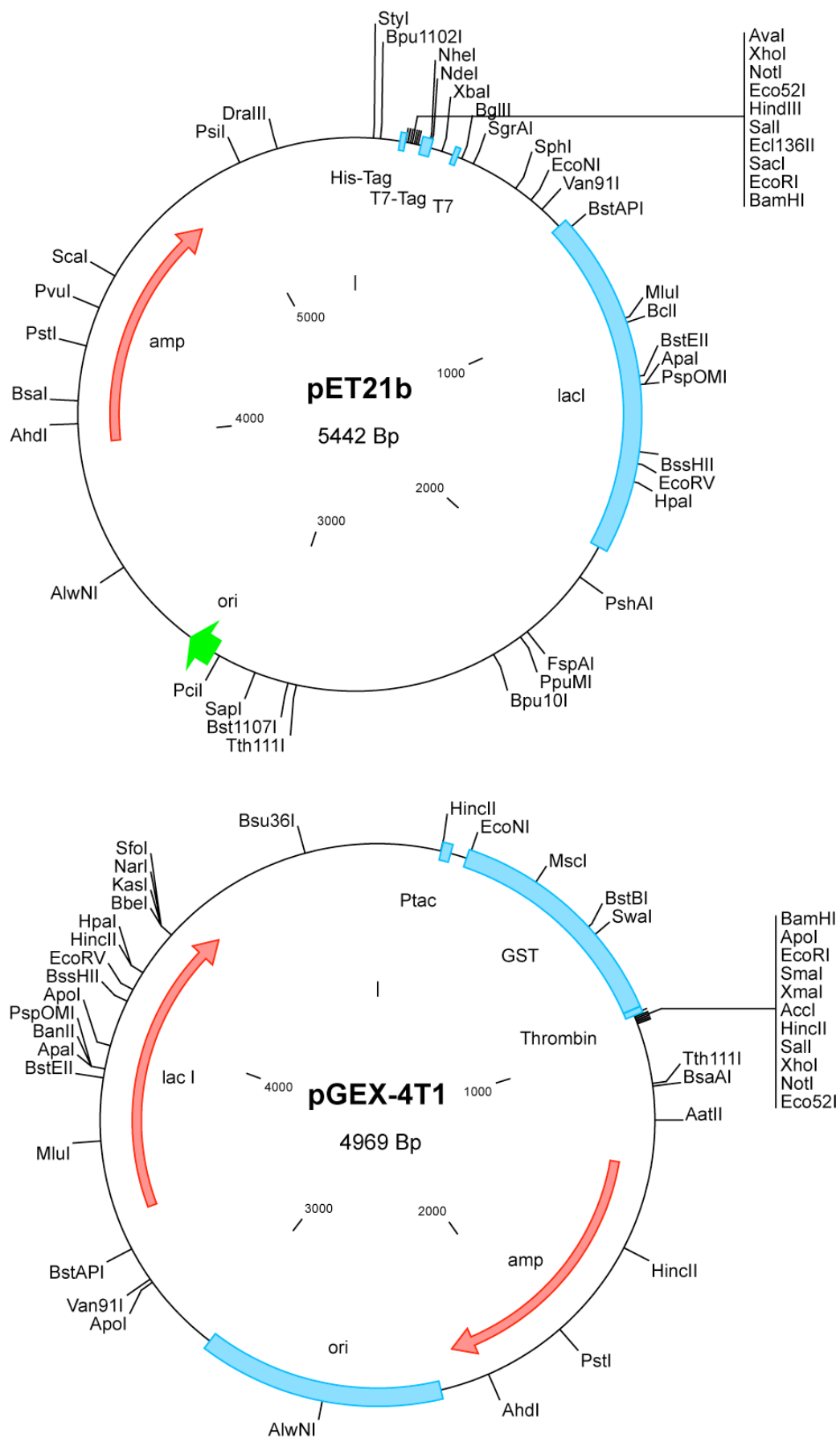
Bc	Black cells
Gla	Glazed
CyO	Curly of Oster, 2. Chromosom-Balancer
Bc Gla	In(2LR)Gla, Bc ¹ Gla ¹ , 2. Chromosom-Balancer
Sb	Stubble
Ser	Serrate
Sp	Sternopleural
TM	Third Multiple, 3. Chromosom-Balancer
Ubx	Ultrabithorax

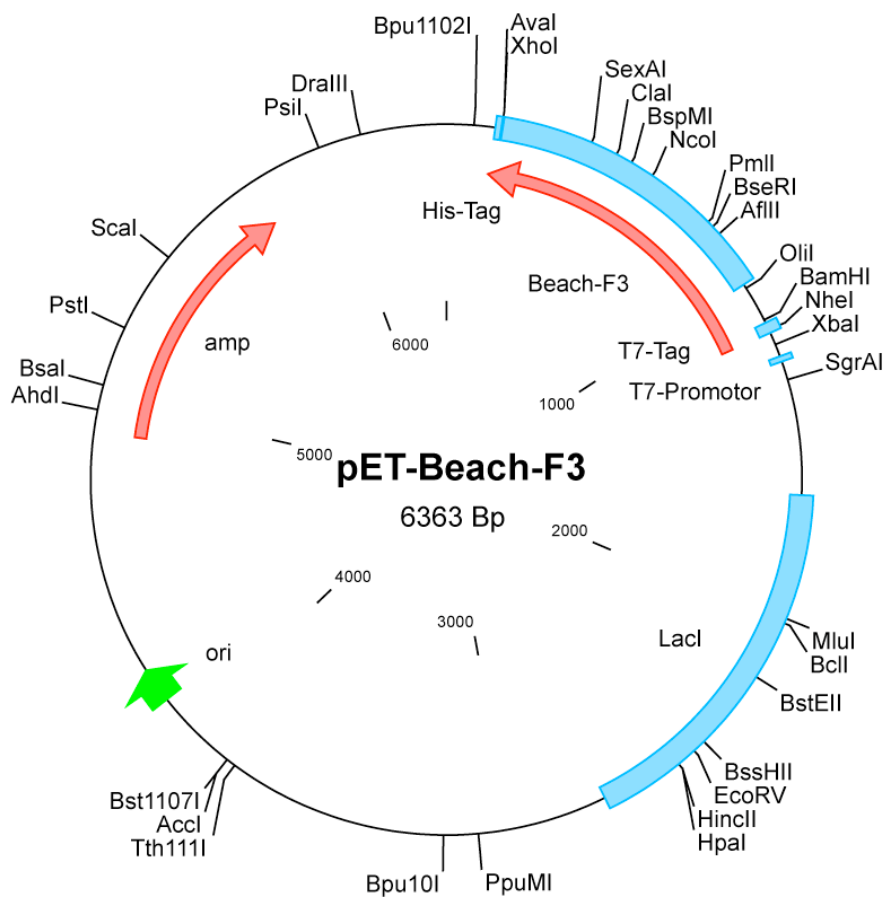
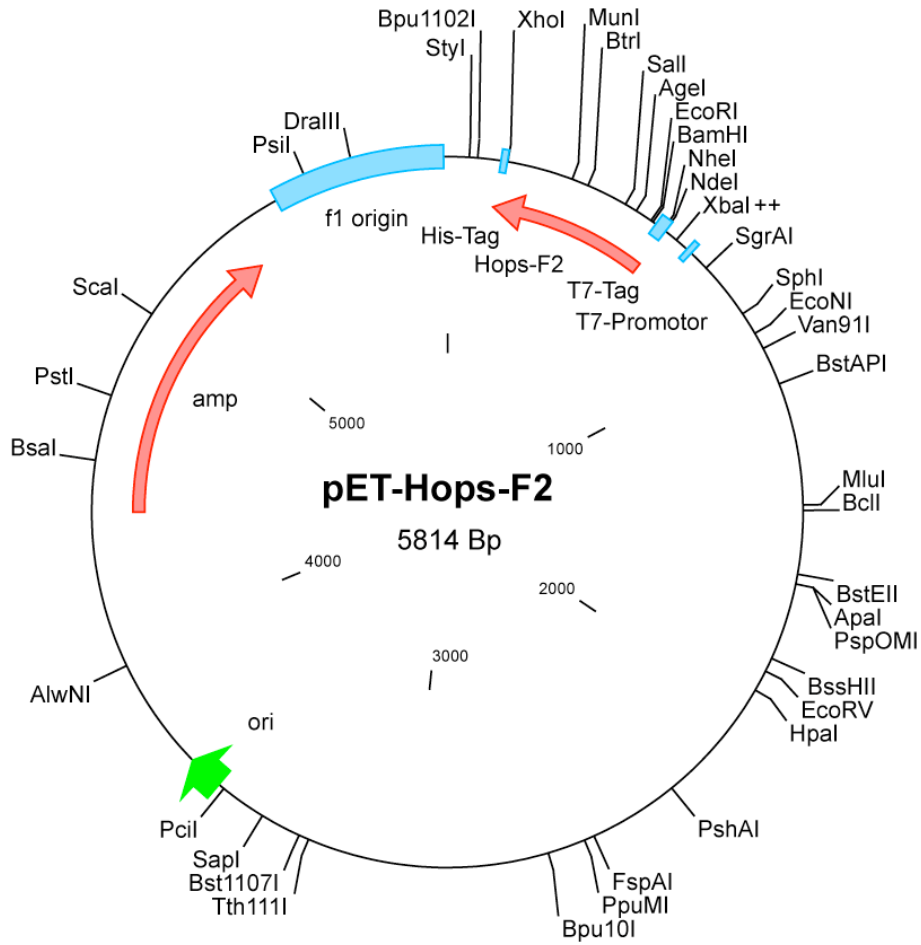
Sonstige:

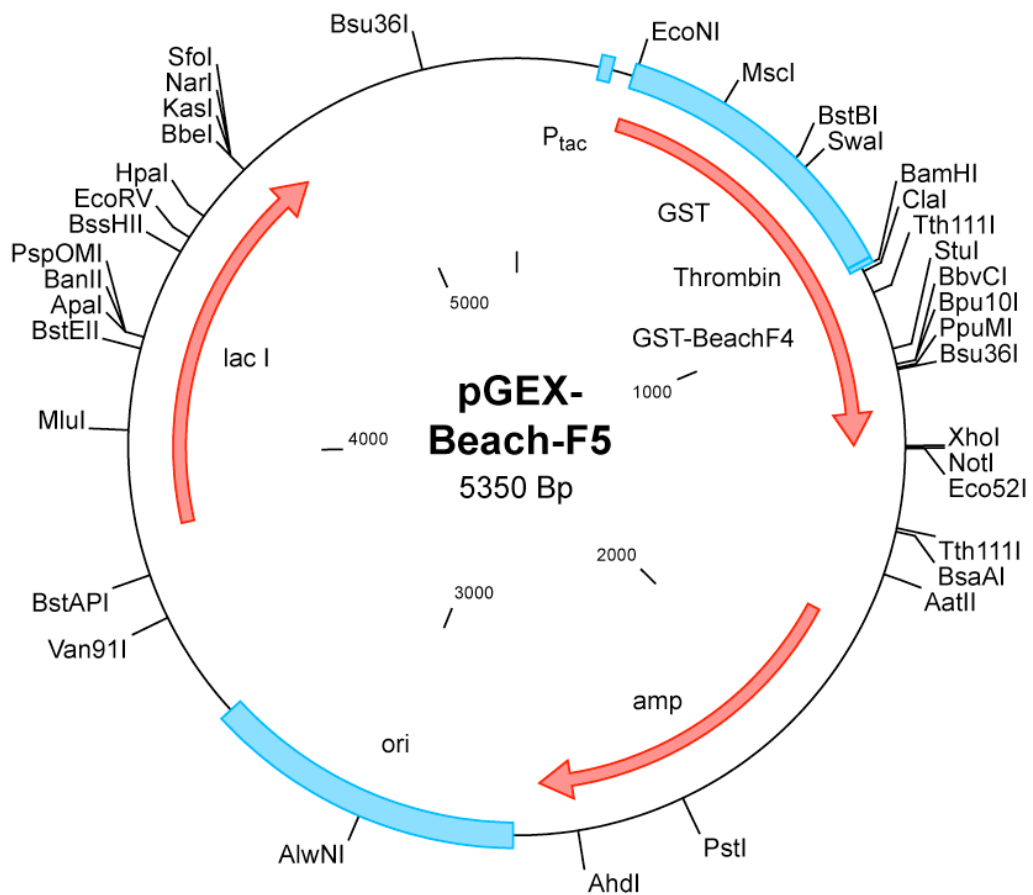
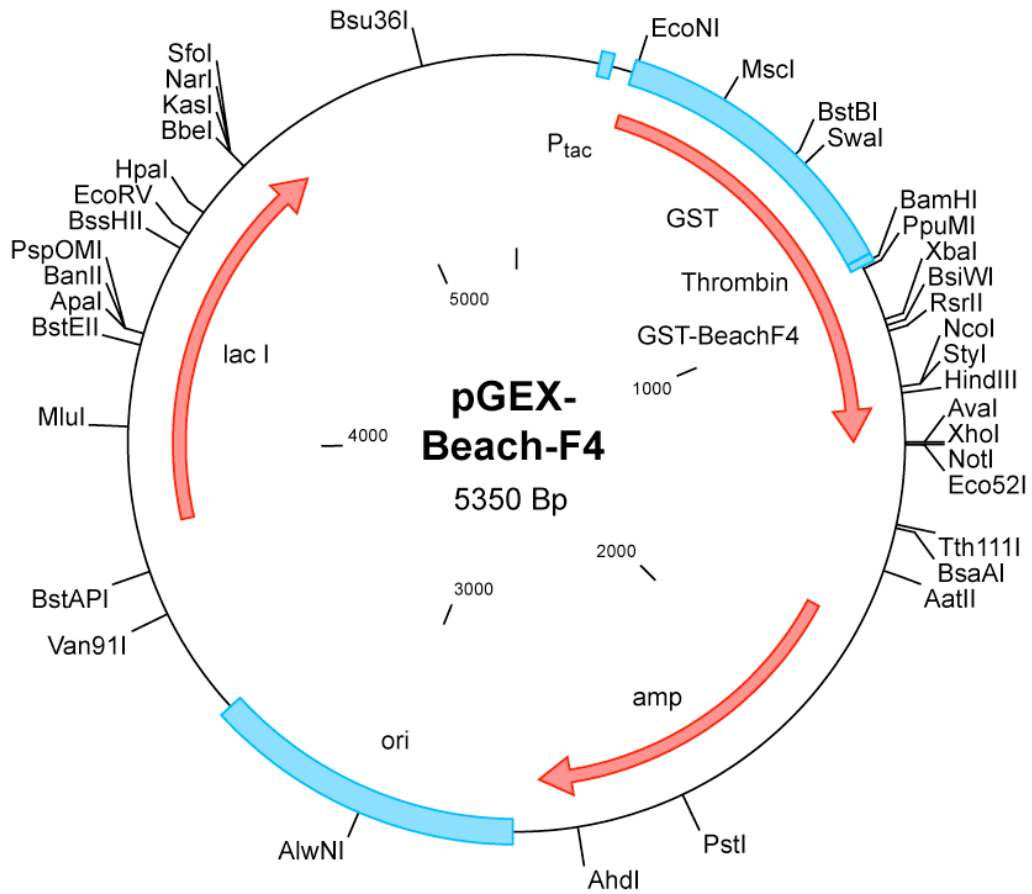
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Krankheit, Alzheimer disease
AS	Aminosäuren
BSA	Bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaare

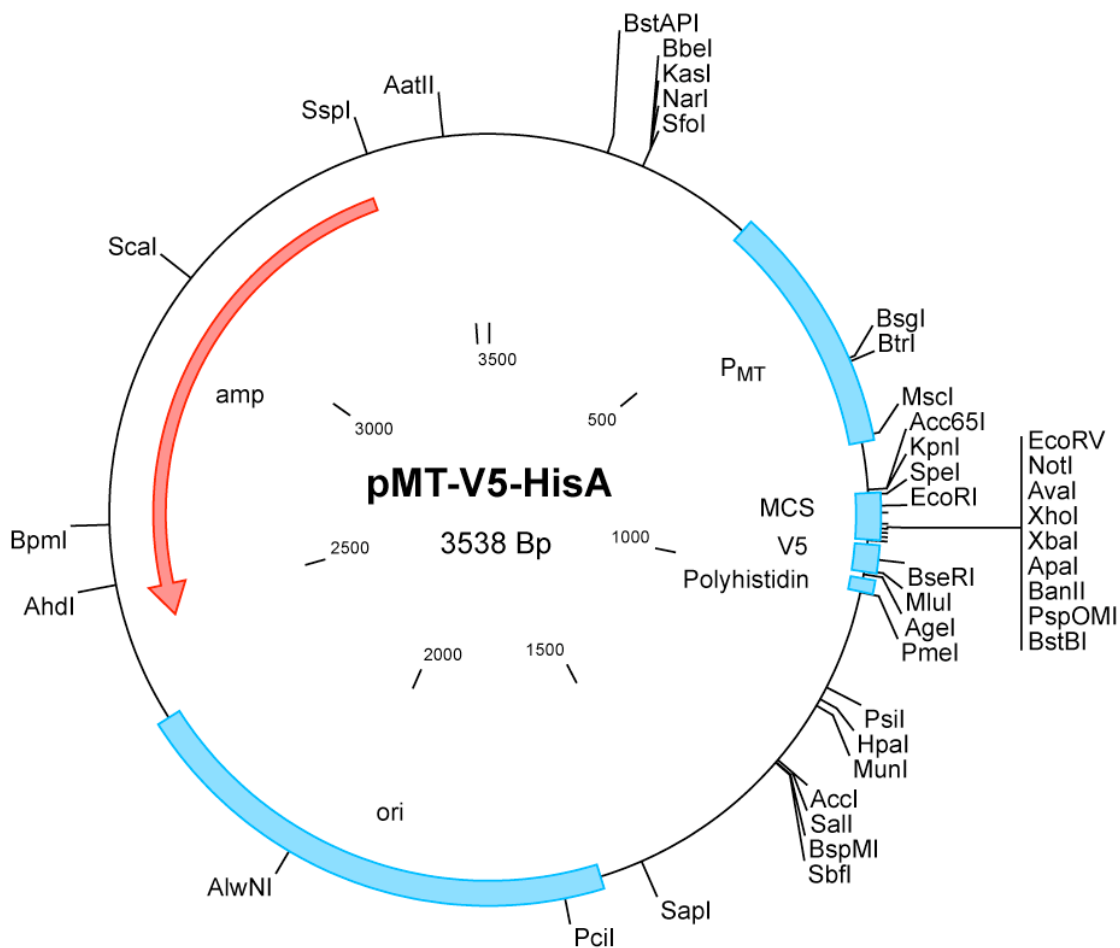
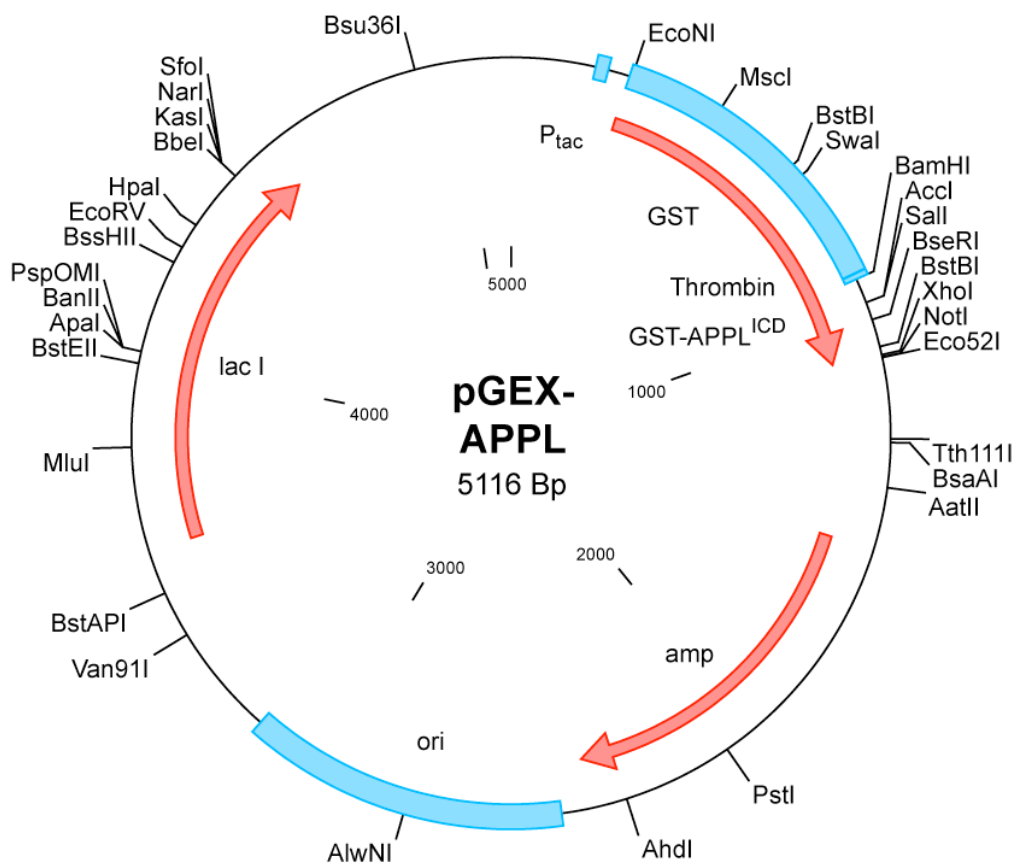
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CTF	C-terminales Fragment
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Extrazelluläre Domäne
EP	Enhancer/Promoter
EZ	Extrazellulär
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP-Element	Enhancer-Promoter Element
EST	Expressed Sequence Tag
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familiar Alzheimer's Disease
h	Stunde
hPa	Hektopascal
HRP	Horseradish peroxidase
IC	Intrazellulär
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalactosid
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
mV	Millivolt
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OP	Operator
PBS	Phosphate buffered saline
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interference
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TM	Transmembran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAS	Upstream activating sequence
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

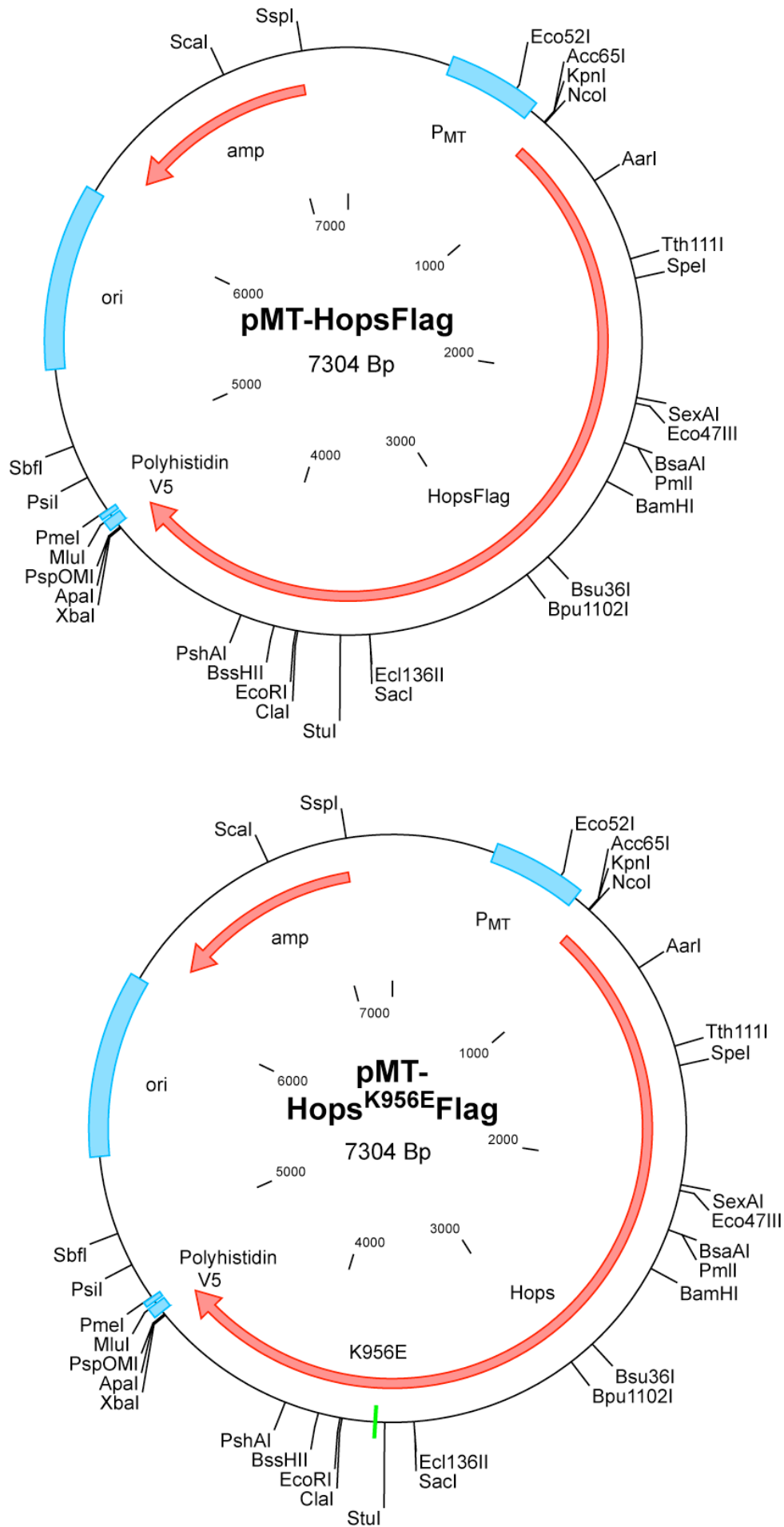
9 Vektorkarten

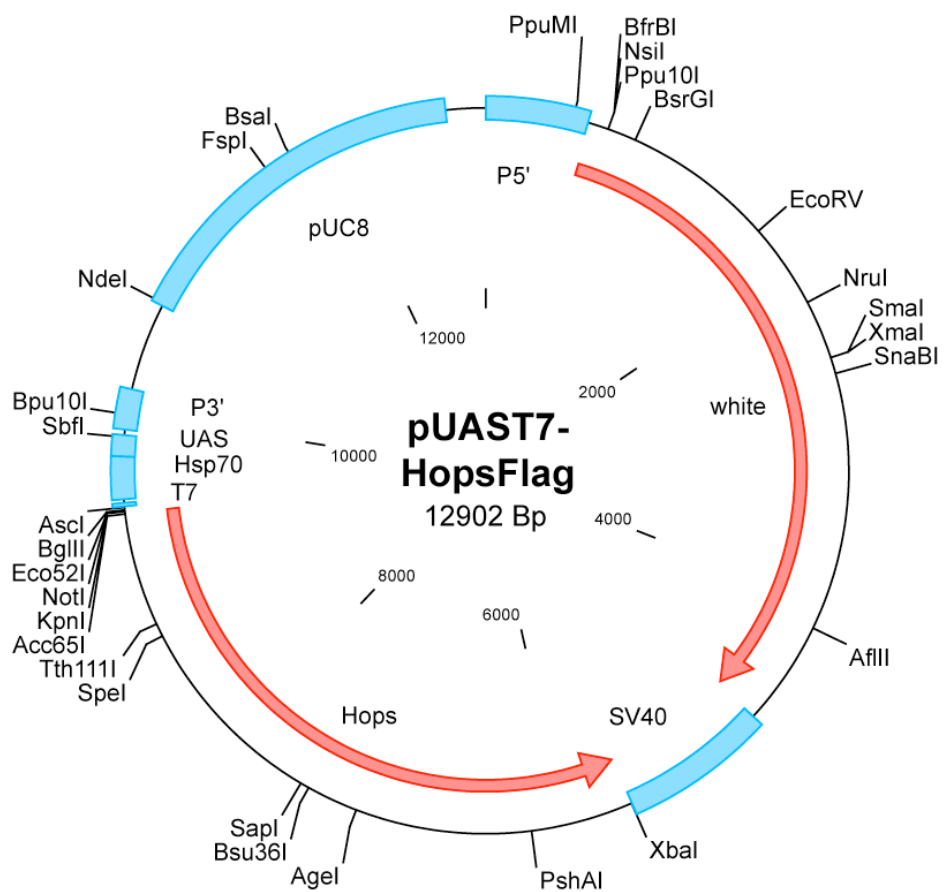
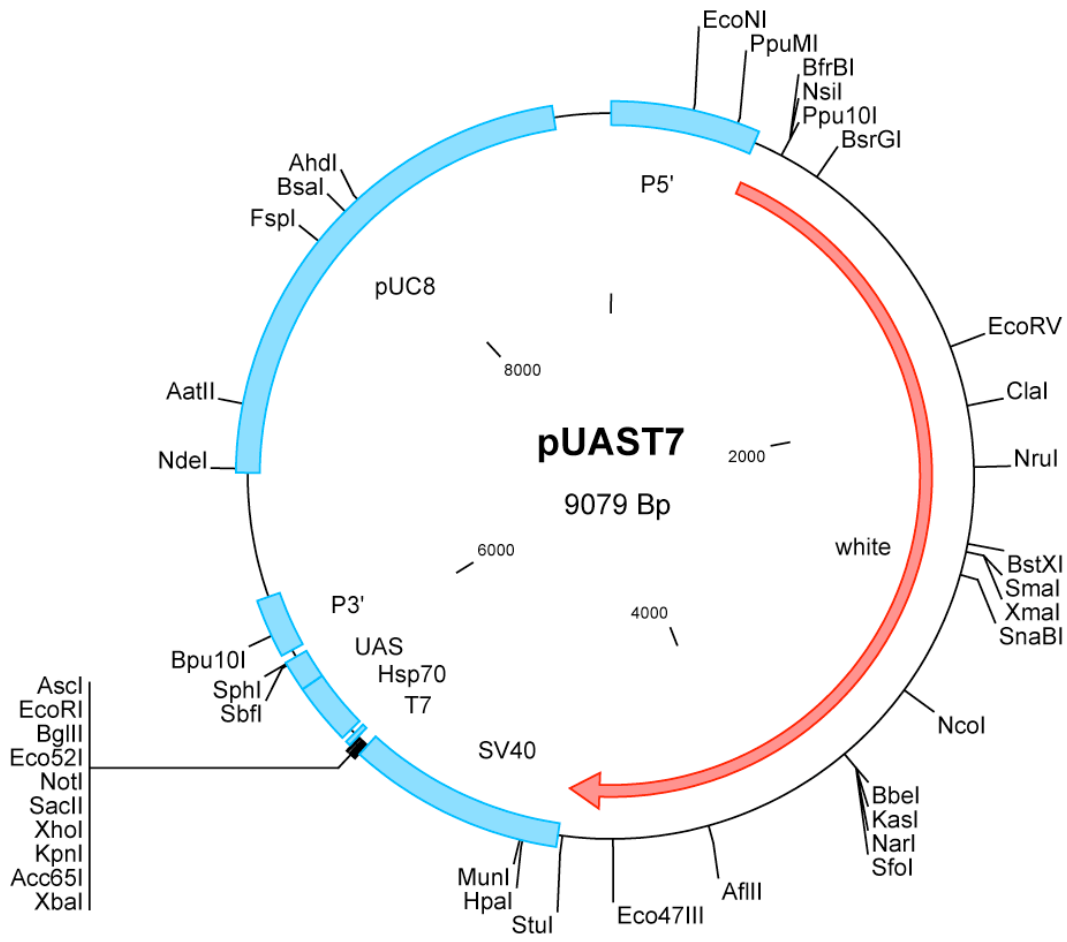


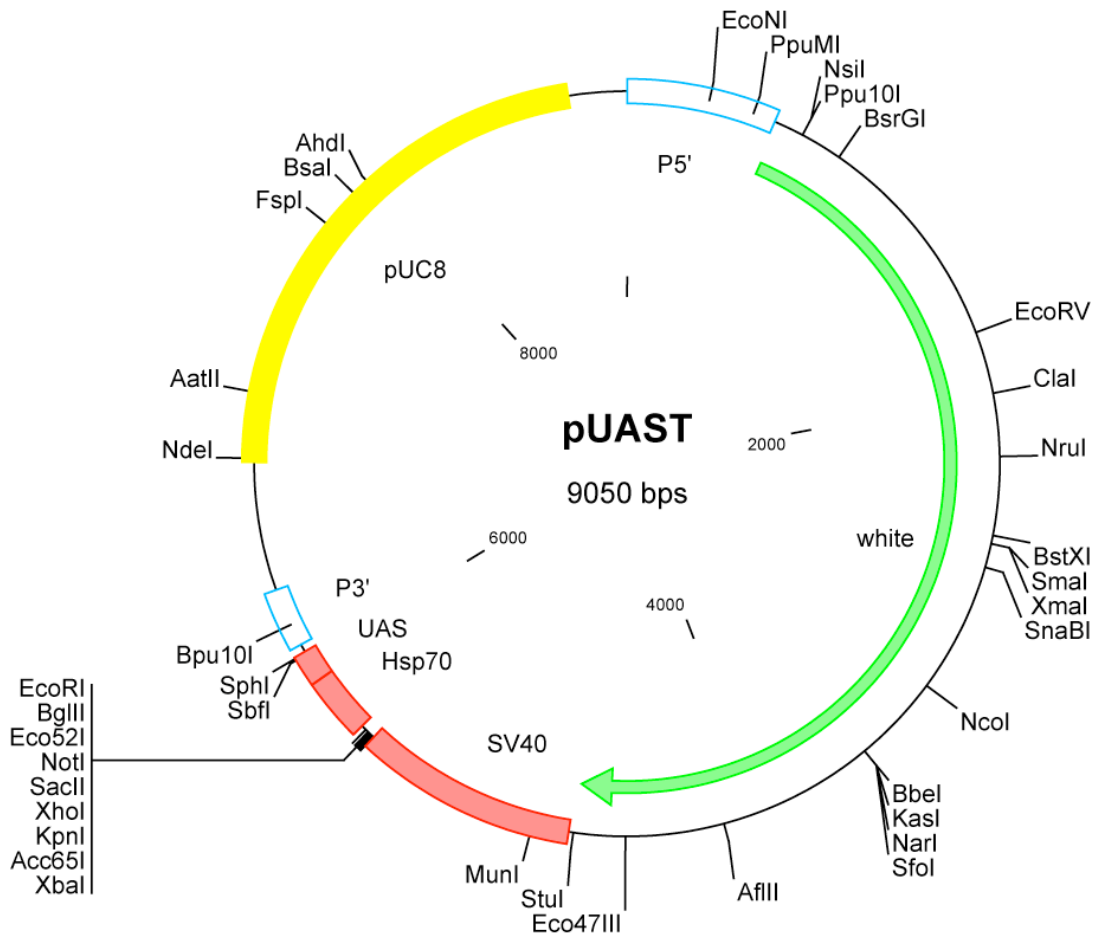
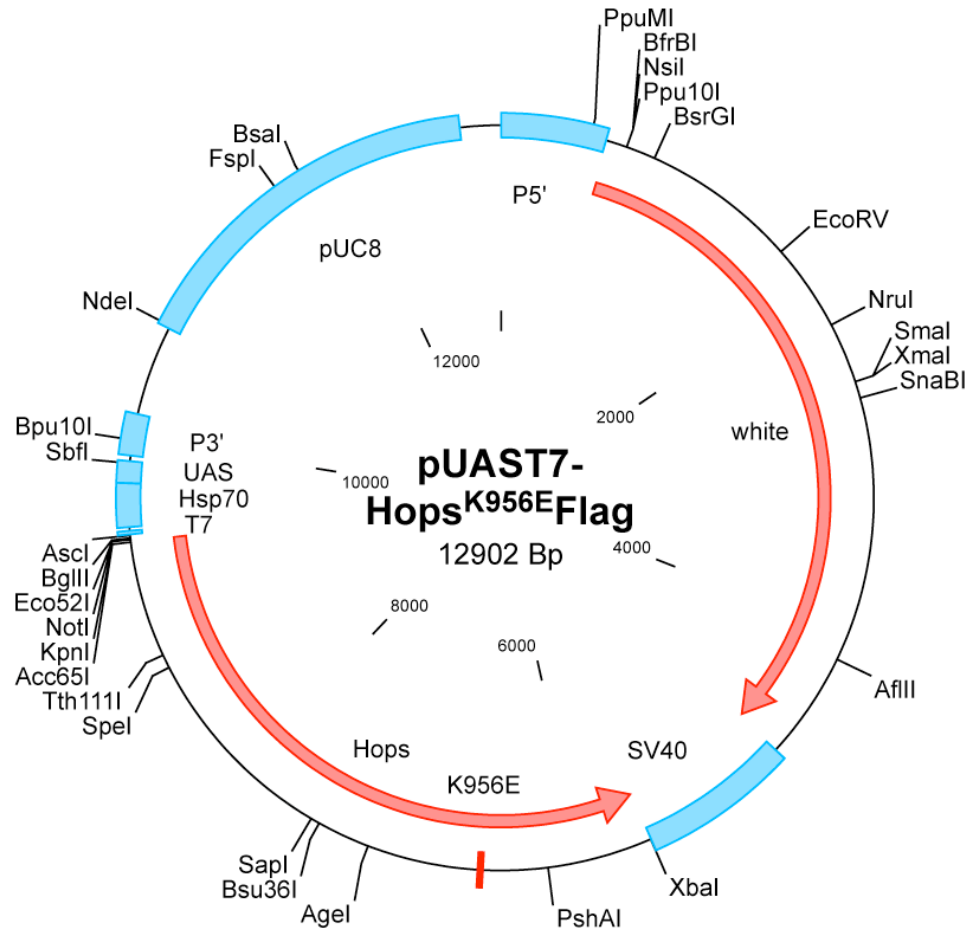


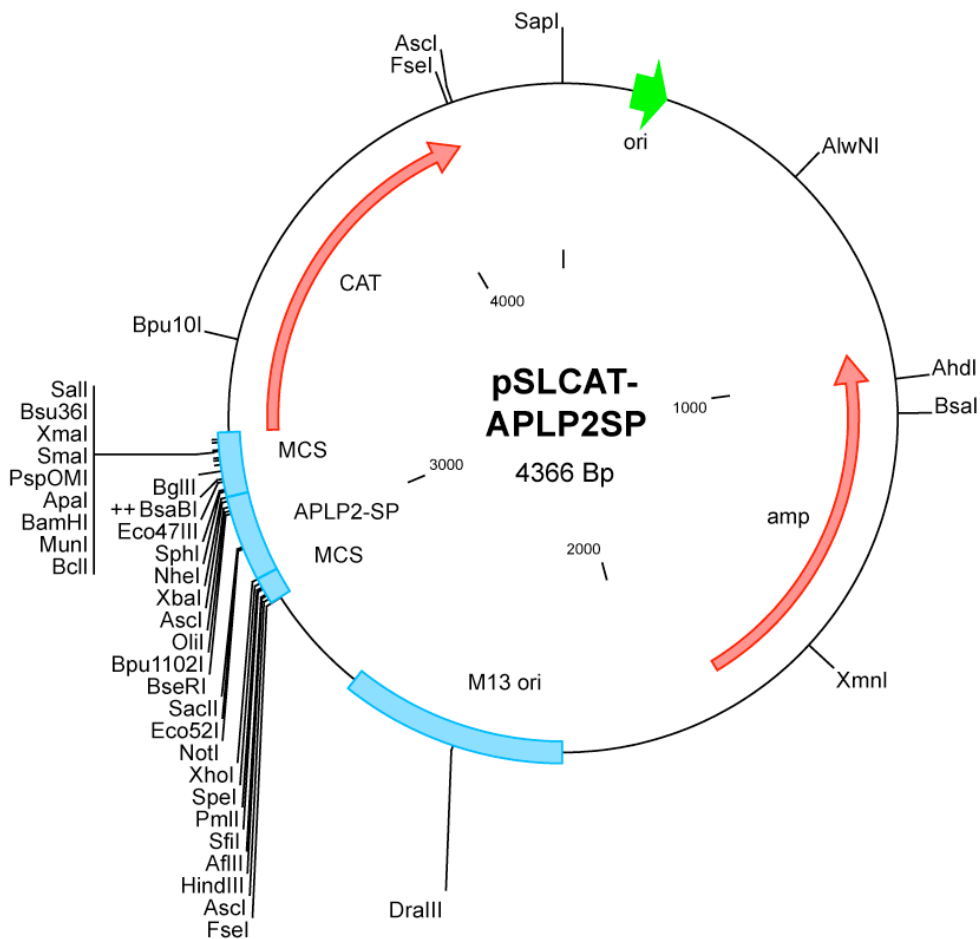
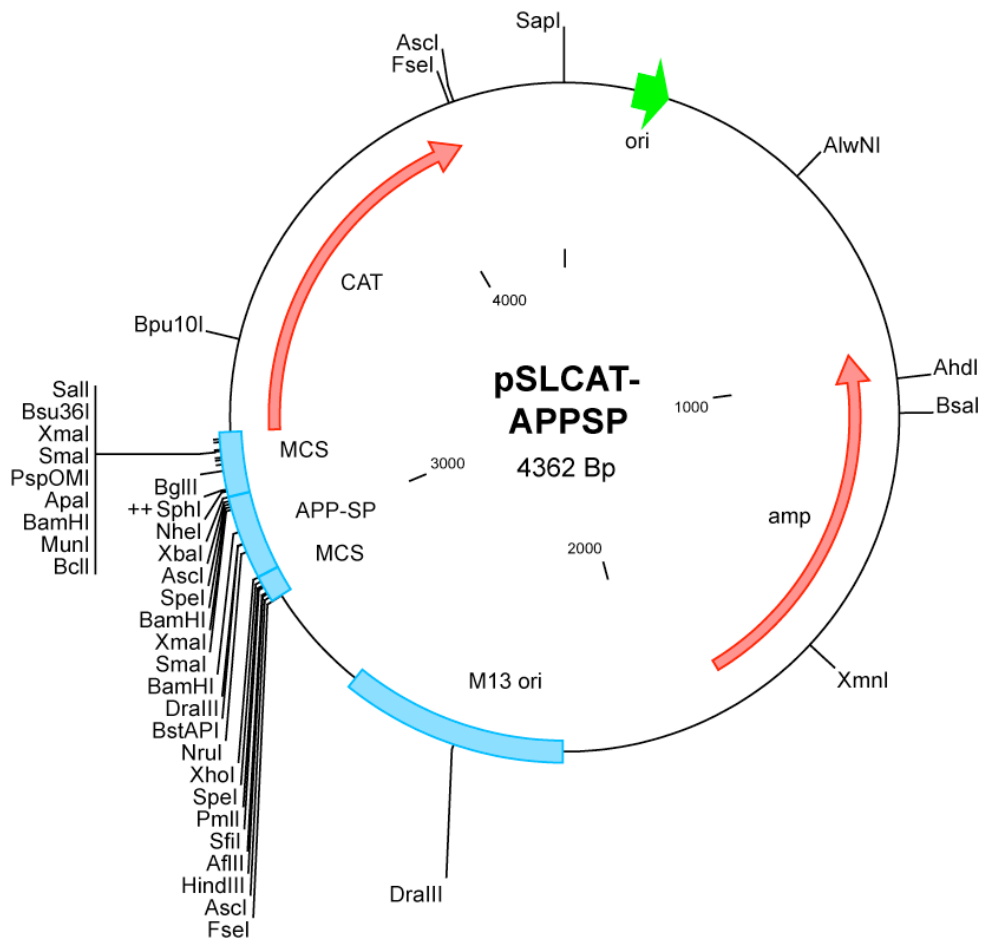


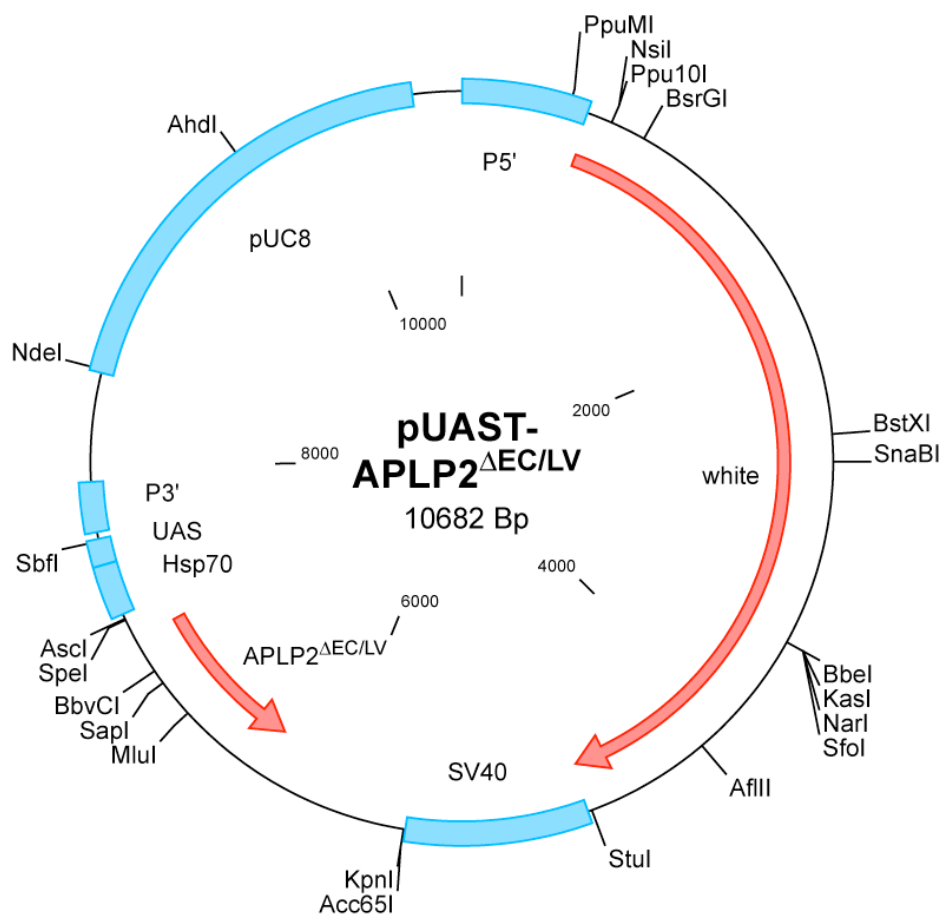
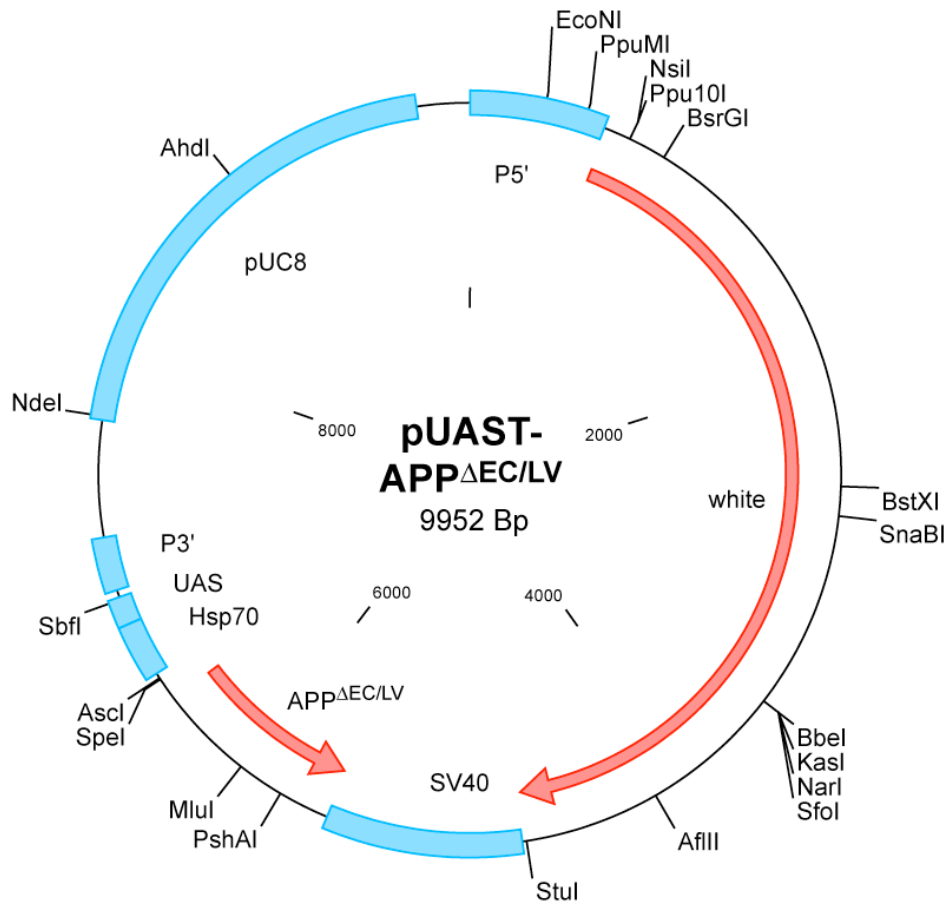


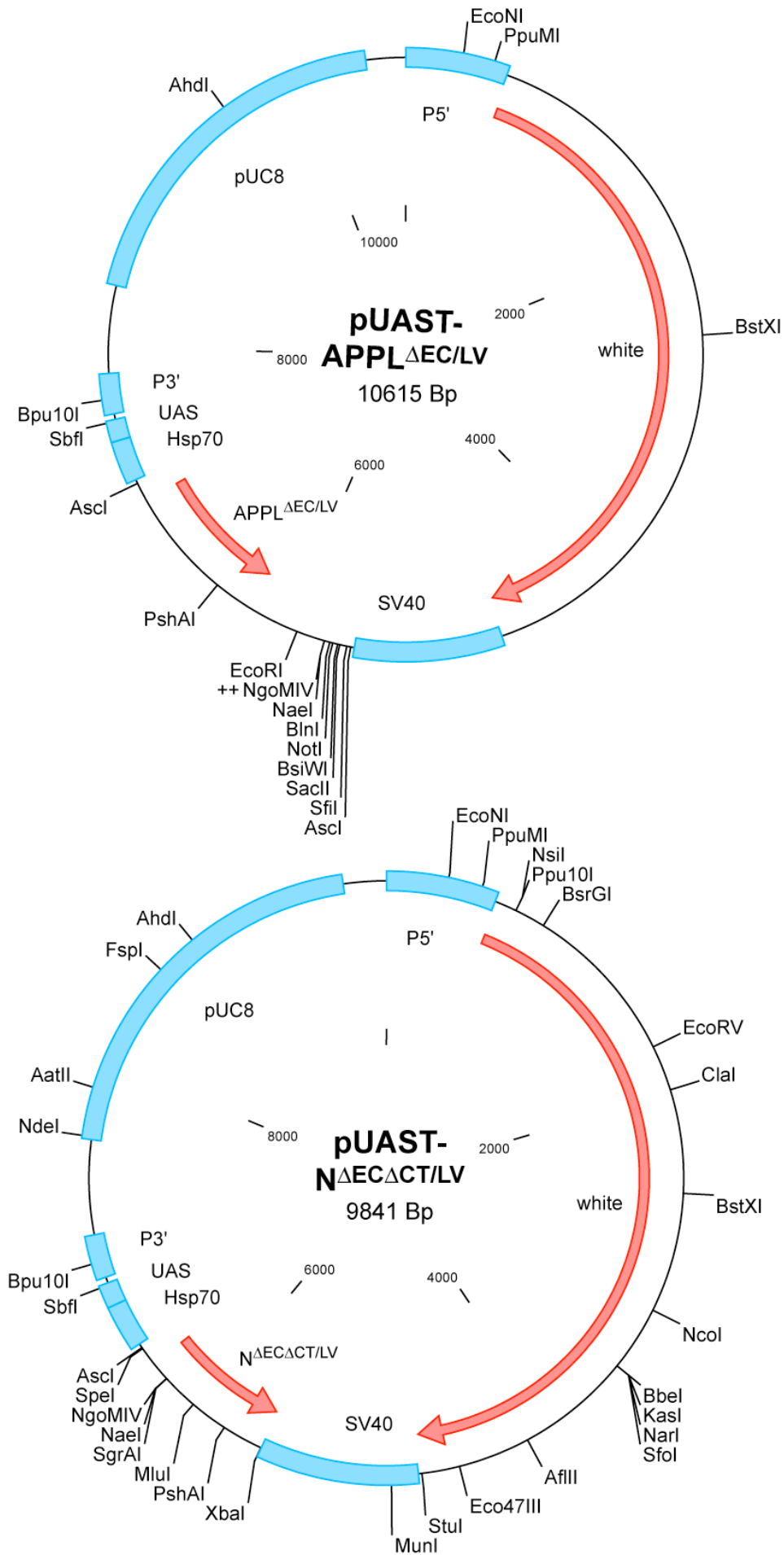


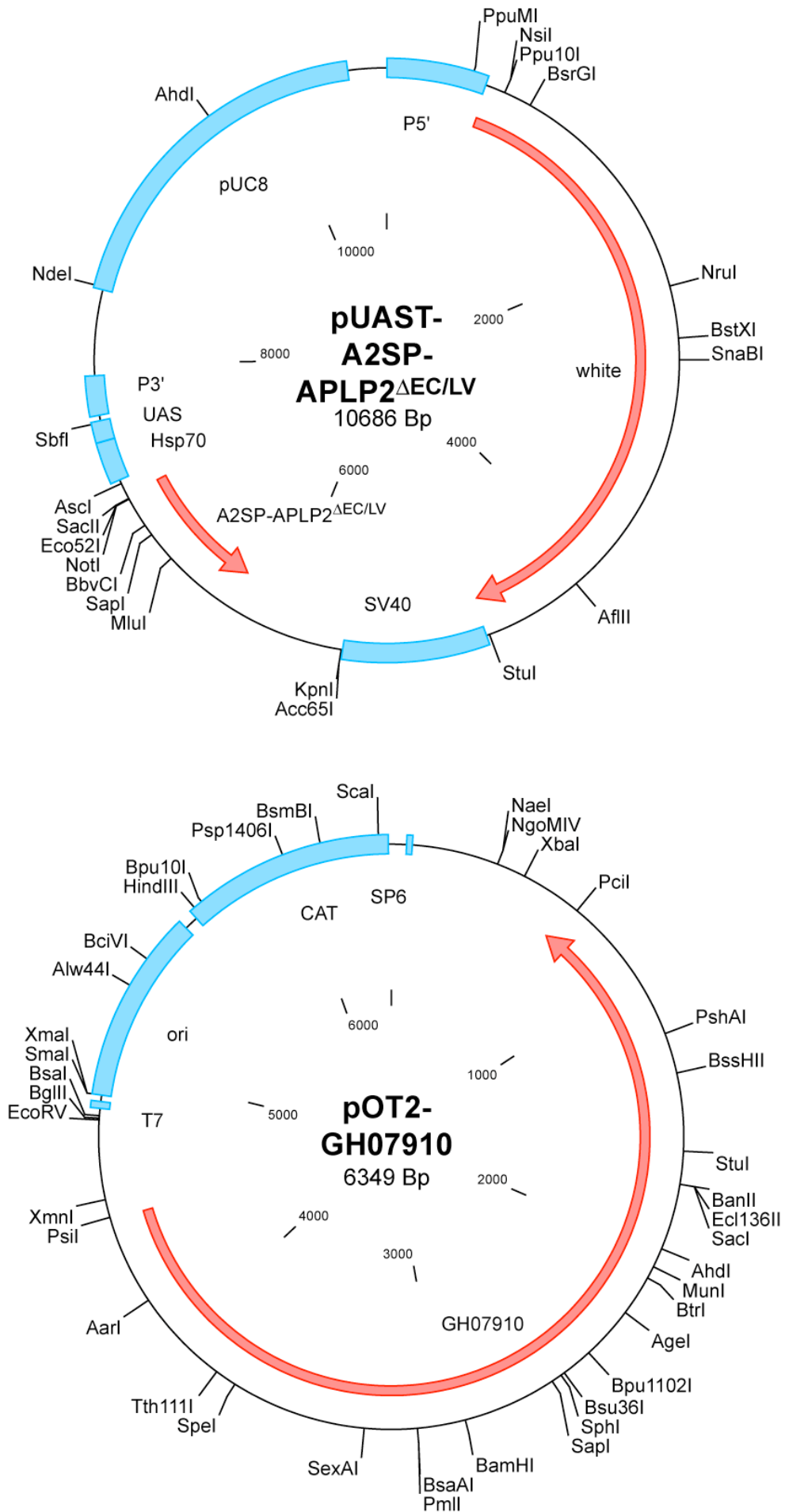


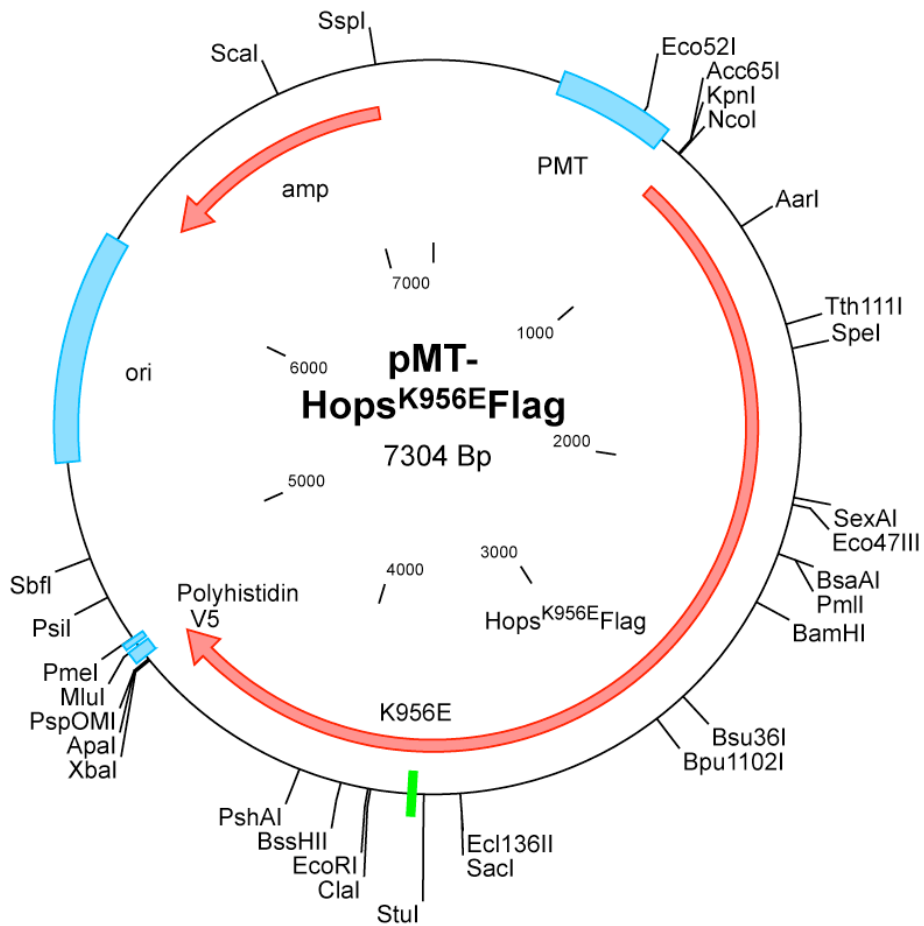
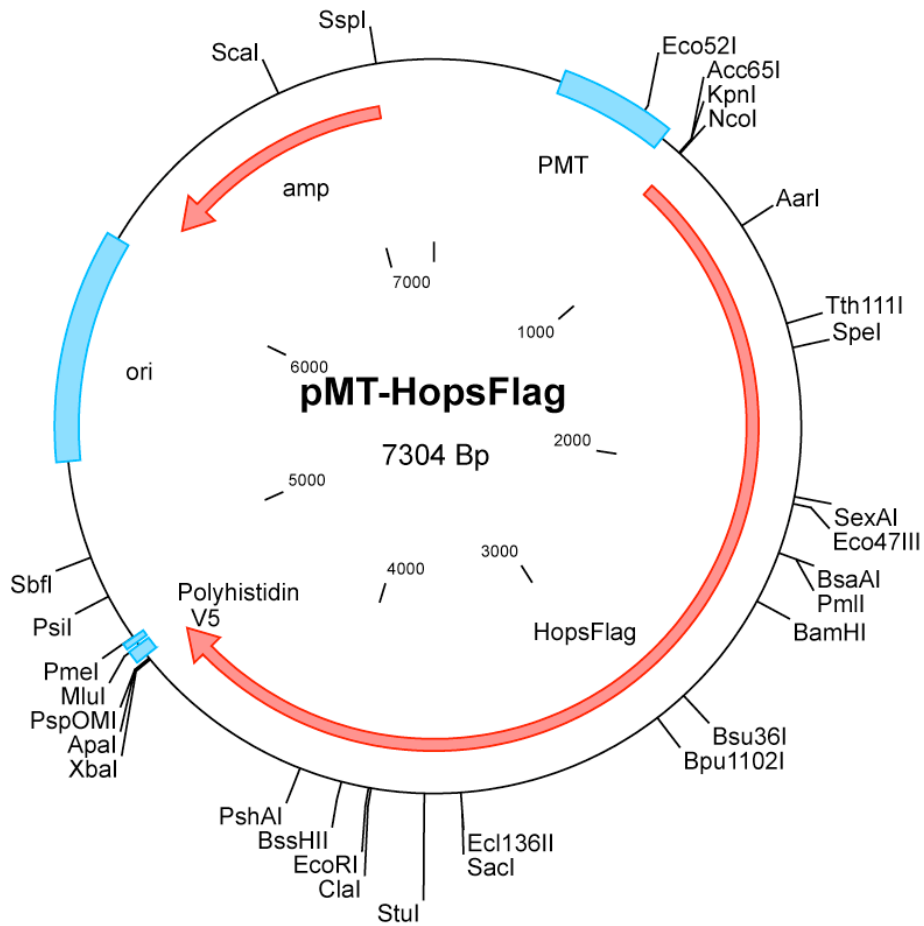












Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Heidelberg, 12.5.2005

.....
Alexander Löwer