

**Etablierung eines *Drosophila*-Modells der Alzheimer
Erkrankung zur Analyse von Glutaminylzyklase-vermittelter
pyroGlu-A β -Bildung und deren Hemmung durch
spezifische Inhibitoren**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Frau Christiane Lindner

geboren am 28. August 1979 in Weimar

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Reuter
2. Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth
3. PD Dr. Steffen Roßner

Verteidigt in Halle (Saale) am 01. April 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013437

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013437>]

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	ii
II. Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	14
2.1 <i>Genetische Methoden</i>	14
2.1.1 Anzucht und Haltung der Fliegen.....	14
2.1.2 Herstellung transgener Linien von <i>Drosophila melanogaster</i>	14
2.1.3 Etablierung transgener Stämme	15
2.1.4 GAL4-UAS-kontrollierte Transgenexpression	15
2.1.5 Behandlung transgener <i>Drosophila</i> mit P150/03	16
2.1.6 Toxizitätstest.....	17
2.1.7 Dekaptieren von Fliegen.....	17
2.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	18
2.2.1 Gewinnung von Nukleinsäuren	18
2.2.2 Amplifizierung von Nukleinsäuren.....	19
2.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten	20
2.2.4 Klonierung der A β -Expressionskonstrukte.....	21
2.2.5 Klonierung von <i>Drosophila</i> QC Expressionskonstrukten.....	22
2.3 <i>Biochemische Methoden</i>	22
2.3.1 A β -Immunpräzipitation aus Schneiderzellmedium	22
2.3.2 Gelelektrophorese von Proteinen.....	23
2.3.3 Nachweis von Proteinen im Westernblot.....	23
2.3.4 ELISA.....	24
2.3.5 QC-Aktivitätstest	24
2.4 <i>Zytologische Methoden</i>	25
2.4.1 Transfektion von Schneider-Zellen.....	25
2.4.2 Zellfraktionierung	25
2.4.3 Immunzytologische Untersuchung	26
3. Ergebnisse	27
3.1 <i>Herstellung transgener Linien von <i>Drosophila melanogaster</i></i>	27
3.1.1 Herstellung und Test der Konstrukte	27
3.1.2 Herstellung transgener Linien.....	31
3.2 <i>GAL4-UAS kontrollierte Expression des Transgens</i>	32
3.3 <i>Auswahl der geeigneten Treiberlinie</i>	37
3.4 <i>Auswahl der geeigneten transgenen Linie</i>	39
3.5 <i>Der Einfluss des QC-Inhibitors P150/03 auf die pyroGlu-Bildung der Linie CS58</i>	42
3.6 <i>Die Toxizität von P150/03</i>	47
3.7 <i>Der Einfluss des QC-Inhibitors P150/03 auf die pyroGlu-Bildung der Linien CS36 und CS58</i>	48
3.8 <i>Die Herstellung neuer transgener Fliegenlinien</i>	53

I. Inhaltsverzeichnis

3.9 <i>GAL4-UAS kontrollierte Expression des Transgens</i>	55
3.10 <i>Glutaminylzyklasen in Drosophila</i>	58
3.11 <i>Homologe Expression von CG5976 und CG32412 in S2 Zellen</i>	63
3.12 <i>Immunzytologische Untersuchung</i>	66
3.13 <i>Die Genprodukte von CG32412 und CG5976 haben QC-Aktivität</i>	68
4. Diskussion	72
5. Zusammenfassung	90
6. Literaturverzeichnis	91
Anhang	107
<i>A1 Vektoren und Konstrukte</i>	107
<i>A2 Stabile S2 Zelllinien</i>	108
<i>A3 Transgene Stämme Drosophila melanogaster</i>	108
<i>A4 Verwendete Vektoren</i>	112
<i>A5 Selektierte Fliegen</i>	113
Publikationsliste	114
Eidesstattliche Erklärung	115
Danksagung	116
Lebenslauf	117

II. Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid-Protein
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer'sche Demenz, Alzheimer'sche Krankheit
AICD	<i>APP intracellular domain</i> , APP intrazelluläre Domäne
APH	<i>anterior pharynx defective</i>
APLP	<i>APP-like-protein</i>
ApoE4	Apolipoprotein Allel ϵ 4
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> , Amyloid Vorläuferprotein
APPL	<i>Amyloid Precursor Protein-like</i>
APP α / β	lösliches N-terminales APP-Fragment entstanden durch α - bzw. β -Sekretasespaltung
AS	Aminosäure
BACE1	<i>β-site APP cleaving enzyme</i>
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomographie
CTF	C-terminales APP-Fragment
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Glutamyl-Zyklase-Aktivität der Glutaminyl Zyklase
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
FA	<i>formic acid</i> , Ameisensäure
FAD	familiär vererbte / präsenile Alzheimer'sche Demenz
FTDP	Frontotemporale Demenz mit Parkinson
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormone</i> , Gonadoliberin
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HMGR	Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
i.A.	im Ansatz

II. Abkürzungsverzeichnis

MCI	<i>mild cognitive impairment</i> , milde kognitive Beeinträchtigung
Mio.	Millionen
MRT	Magnetresonanztomographie
MVB	<i>multivesicular bodies</i> , Multivesikelkörperchen
N3pE	Glutamat an Position 3 liegt als Pyroglutamat vor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEN	<i>presenilin enhancer</i>
PET	Positronenemissionstomographie
PS	Presenilin
pyroGlu	Pyroglutamat
QC	<i>Glutaminyl cyclase</i> , Glutaminylzyklase
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i> , relative Fluoreszenz Einheit
RT	Raumtemperatur
S2-Zellen	Schneider-Zellen
SAD	sporadisch auftretende / senile Alzheimer'sche Demenz
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TRH	<i>Thyreotropin releasing hormone</i> , Thyreoliberin
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
vgl.	vergleiche, siehe auch
w ^{iso}	w ¹¹⁸ ;iso1;iso2;iso3 (weißäugiger, isomerisierter Stamm von <i>Drosophila melanogaster</i>)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die Bedeutung der Alzheimerschen Krankheit

Alois Alzheimer (1864-1915) stellte im Jahre 1906 auf dem 37. Treffen der Südwestdeutschen Irrenärzte die Ergebnisse seiner *post mortem* Untersuchung der 51 Jahre alten Patientin Auguste Deter vor, die an fortschreitender präseniler Demenz erkrankt war. Die relativ junge Patientin hatte unter einem rapiden Gedächtnisverlust, Wahn und Halluzinationen gelitten und ihr Orientierungsvermögen in Zeit und Raum verloren. Im Krankheitsverlauf wurde sie bettlägerig und inkontinent. Sie starb viereinhalb Jahre nach dem Ausbruch der Krankheit. Die Untersuchung ihres Gehirns ergab eine fortgeschrittene Atrophie, auffallende pathologische Neurofibrillen und ungewöhnliche Ablagerungen im Kortex (senile Plaques), die sich mittels Silberfärbung (Bielschowsky 1902) anfärben ließen. Im Jahr 1907 veröffentlichte Alzheimer diese Ergebnisse in einer Publikation (Alzheimer 1907), die ein Meilenstein im Verständnis der später nach ihm benannten Alzheimer'schen Krankheit (Alzheimer'sche Demenz AD; Kräpelin 1910) darstellt. Alzheimer erkannte auch, dass es einen Unterschied zwischen der von ihm beschriebenen präsenilen Form von AD und der senilen Demenz gab (Alzheimer 1911). Dies führte schließlich zu der Erkenntnis, dass es sich bei der AD im Gegensatz zu normalen altersbedingten Einschränkungen der Gedächtnisleistung um eine Krankheit handelt und somit möglicherweise behandelbar ist.

Die AD ist heutzutage die häufigste Demenzerkrankung. Der Anteil der Erkrankten steigt von 1,2% bei den 65-69 Jährigen auf 33,5% bei den über 90 Jährigen dramatisch an (Oberender 2006). Die volkswirtschaftlichen Kosten belaufen sich auf durchschnittlich 43.800 Euro pro Patient und Jahr und werden zu zwei Dritteln von der Familie getragen. Allein in Deutschland leiden ca. 800.000 Menschen an dieser Krankheit, angesichts des demographischen Wandels wird prognostiziert, dass im Jahr 2050 1,5 bis 2 Mio. Deutsche davon betroffen

sein werden (Möller *et al.* 2006). Derzeit sind weder präventive noch kurative Wirkstoffe verfügbar (Thal 2006).

Bei den Betroffenen treten als erstes und häufigstes Symptom Gedächtnisschwierigkeiten auf, es folgen zeitliche und räumliche Orientierungsprobleme, nachlassendes Urteilsvermögen und Sprachschwierigkeiten. Im weiteren Krankheitsverlauf folgen Verhaltens- und Persönlichkeitsstörungen, Irritationen im Tag-Nacht-Rhythmus und motorische Beeinträchtigungen. Im Endstadium sind die Betroffenen bettlägerig und bedürfen Hilfe bei jeglichen Aufgaben des täglichen Lebens. Von der Diagnose bis zum Tode, der meist durch Infektionen oder Lungenentzündung ausgelöst wird, vergehen durchschnittlich sieben Jahre.

Diagnose und Therapie

Die Diagnose der AD ist kompliziert und erfolgt häufig erst im fortgeschrittenen Stadium. Es wird geschätzt, dass die Degeneration von Neuronen bereits 20 bis 30 Jahre vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome einsetzt (Goedert und Spillantini 2006). Der AD geht häufig, aber nicht immer (Schönknecht *et al.* 2005), eine frühe klinische Phase voraus, die als leichte kognitive Beeinträchtigung (*mild cognitive impairment* – MCI) bezeichnet wird (Petersen *et al.* 1999). Die lange präsymptomatische Phase erfordert die Entwicklung präventiver Strategien. Dazu ist es jedoch unverzichtbar, neuropathologische Veränderungen zu diagnostizieren bevor kognitive Einschränkungen auftreten. Die Erkennung der Krankheit erfolgt über eine Ausschlussdiagnose, die anhand des typischen Symptommusters, umfangreichen kognitiven Tests, Blut- und Liquoruntersuchungen sowie CT, MRT und PET gestellt wird. Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine sichere Diagnose erst nach dem Tod möglich, wenn das Gehirn obduziert wird. Das ist wiederum die Tücke dieser Krankheit: Sie offenbart sich der Umwelt erst, wenn es eigentlich schon zu spät ist. Die Vergesslichkeit tritt ein, wenn die dafür zuständigen Gehirnbereiche bereits beeinträchtigt sind. Und auch dann ist eine Unterscheidung von normaler Alterung und der AD schwierig.

Die Behandlung der AD erfolgt sowohl medikamentös als auch nicht-medikamentös. Derzeit sind in Deutschland vier spezielle Medikamente zur

Behandlung der AD erhältlich, dazu zählen drei Acetylcholinesterase-Hemmer (Donepezil, Galantamin und Rivastigmin) und der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor)-Antagonist Memantin. Beide Wirkstoffgruppen sind in der Lage, die kognitive Leistungsfähigkeit und die Fähigkeit zur Alltagsbewältigung positiv zu beeinflussen, Acetylcholinesterase-Hemmer im Frühstadium und Memantin im fortgeschrittenen Stadium, und den Krankheitsverlauf und damit die Pflegebedürftigkeit zu verzögern.

Weiterhin erfolgt die Behandlung von Begleiterkrankungen. Dazu zählen Depressionen, Ruhelosigkeit, Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus, aggressive Phasen und Wahrnehmungsstörungen. Hirnleistungsfördernde Maßnahmen mit *Ginkgo biloba* sowie prophylaktische und neuroprotektive Maßnahmen mit Antioxidantien (Vitamine C und E) betreffen weniger das Krankheitsbild an sich, vielmehr wird die Gehirntätigkeit insgesamt angeregt. Es sind außerdem Substanzen bekannt, die offenbar einen positiven Effekt auf Demenzerkrankungen besitzen, deren Wirksamkeit aber nicht hinreichend erwiesen ist. Dazu zählen Cholesterin-senkende Statine (Wolozin 2001). Mittlerweile wurde in klinischen Pilotstudien gezeigt, dass die Behandlung mit hochdosierten Statinen, Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Reduktase-Inhibitoren (HMGR-Inhibitoren), den kognitiven Verfall von AD-Patienten verlangsamen kann (Simons *et al.* 2002, Sparks *et al.* 2005). Weiterhin befinden sich zahlreiche neue Medikamente in den verschiedenen klinischen Phasen.

Neben der medikamentösen Behandlung spielt die nichtmedikamentöse Behandlung eine große Rolle. Hierzu zählen unter anderem Verhaltenstherapien und Realitätsorientierung, aber auch kognitives Training und Kunsttherapie werden je nach Schwere der Krankheit und Zustand des Patienten angewandt.

Veränderungen im Gehirn

In den letzten 25 Jahren konnten die von Alzheimer beschriebenen Ablagerungen im Gehirn näher charakterisiert werden. Histopathologisch ist die AD durch Gliosis und Gewebeatrophie im frontalen und temporalen Kortex charakterisiert, was prinzipiell mit Synapsenverlust einhergeht (Probst *et al.* 1991).

Proteinablagerungen sind in intra- und extrazellulären Bereichen des Gehirns zu finden. Die intrazellulären Ablagerungen bilden ein neurofibrilläres Geflecht, das aus Filamenten des hyperphosphorylierten TAU-Proteins besteht (Iqbal *et al.* 2005). Die extrazellulären Ablagerungen, auch amyloide Plaques genannt, werden hauptsächlich im Neokortex vorgefunden und enthalten 40-42 AS lange Peptide, die als beta-Amyloid-Peptide (A β) bezeichnet werden (Glennner und Wong 1984, Masters *et al.* 1985).

A β wird durch endoproteolytische Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) gebildet (Kang *et al.* 1987). APP gehört zur Familie konservierter Typ-I-Membranproteine, die neben APP (Goldgaber *et al.* 1987, Tanzi *et al.* 1987), APP-like-protein 1 (APLP1) (Wasco *et al.* 1992) und 2 (APLP2) (Wasco *et al.* 1993, Slunt *et al.* 1994) in Säugern auch APL-1 in *C. elegans* (Daigle 1993) und APPL in *Drosophila melanogaster* (Rosen *et al.* 1989, Luo *et al.* 1990) umfasst. Diese Proteine sind durch verschiedene konservierte Domänen gekennzeichnet. Dazu zählen die extrazellulären Domänen E1 und E2 und die intrazelluläre Domäne, die die höchste Sequenzidentität aufweist. Der das A β -Peptid enthaltende Bereich ist nicht konserviert und ist ausschließlich im APP zu finden. Durch Expression von humanem APP in APPL-defizienten *Drosophila*-Linien konnte die funktionelle Konservierung der APP-Familie zwischen den Arten gezeigt werden (Luo *et al.* 1992). APP und APLP2 werden im gesamten Gehirn und in vielen anderen Geweben gebildet, während APLP1 und *Drosophila* APPL ausschließlich in Neuronen exprimiert werden (Lorent *et al.* 1995, Martin-Morris und White 1990). In Neuronen wird APP anterograd entlang des Axons transportiert und währenddessen proteolytisch prozessiert (Buxbaum *et al.* 1998, Koo *et al.* 1990, Kamal *et al.* 2001). In nicht-neuronalen Zellen wird APP in der Plasmamembran verankert (Perez *et al.* 1999).

Die Funktion von APP konnte bisher nicht endgültig bestimmt werden. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Proteine aus der APP-Gen-Familie eine essentielle Rolle in der Entwicklung des Nervensystems im Zusammenhang mit Synapsenstruktur und -funktion sowie in neuronalem Transport und Adhäsion spielen. Es werden zahlreiche zellbiologische Abläufe vorgeschlagen, in denen

APP involviert sein könnte. Dazu zählt APP als Rezeptor an der Zelloberfläche (Selkoe und Kopan 2003, Lorenzo *et al.* 2000, Ho und Sudhof 2004, Park *et al.* 2006). Die extrazellulären Domänen werden in Zusammenhang mit Zell-Zell-Interaktionen (Wang und Ha 2004) und Zell-Zell-Adhäsionen (Soba *et al.* 2005) gebracht sowie als neurotropher und synaptogener Faktor im Wachstum von Neuriten und der Synaptogenese erwähnt. Letzteres wird dadurch gestützt, dass APP während der Neuronenentwicklung und -differenzierung hochreguliert wird (Hung *et al.* 1992, Bibel *et al.* 2004) und dass bei traumatischen Gehirnverletzungen hohe APP-Konzentrationen nachgewiesen werden, sowohl in Säugetieren als auch in *Drosophila* (Leyssen *et al.* 2005). Der intrazellulären APP-Domäne kommt eine Bedeutung in der Protein-Protein-Interaktion zu (Ando *et al.* 1999). Neben den Funktionen von APP werden aber auch dessen zytotoxische Eigenschaften diskutiert, insbesondere des C-terminalen Fragments C99 oder C100 (Yankner *et al.* 1989, Yoshikawa *et al.* 1992).

APP wird von mindestens drei Proteinaseaktivitäten sequentiell prozessiert, die als α -, β - und γ -Sekretasen bezeichnet werden (schematische Darstellung der Prozessierung vgl. Abb.1.1). In Säugern sind verschiedene Zink-Metalloproteinasen bekannt, die α -Sekretase-Aktivität besitzen. Zu diesen zählen unter anderem ADAM9 und ADAM 10 (Allinson *et al.* 2003). Die Haupt- β -Sekretase in neuronalem Gewebe ist offenbar BACE1 (*β -site APP cleaving enzyme*), eine membranständige Aspartatprotease (Vassar *et al.* 1999, Yan *et al.* 1999, Sinha *et al.* 1999). Die γ -Sekretase-Aktivität wird durch einen hochmolekularen Komplex bestehend aus Presenilin Nicastrin, APH1 (*anterior pharynx defective*) und PEN2 (*presenilin enhancer*), ermöglicht (Iwatsubo 2004, Edbauer *et al.* 2003). Zunächst wird durch die Aktivität der α - oder der β -Sekretase nahezu die gesamte extrazelluläre Domäne als lösliches APP-Derivat freigesetzt (APP α bzw. APP β). In der Membran verbleibt das α - bzw. β -carboxy-terminale Fragment (CTF). Dieses wird anschließend von der γ -Sekretase prozessiert und es entstehen entweder ein 3 kDa-Produkt (p3 bei vorangegangener Spaltung durch α -Sekretase) oder A β 40/42 (bei vorangegangener Spaltung durch BACE1) und die APP intrazelluläre Domäne (AICD).

1. Einleitung

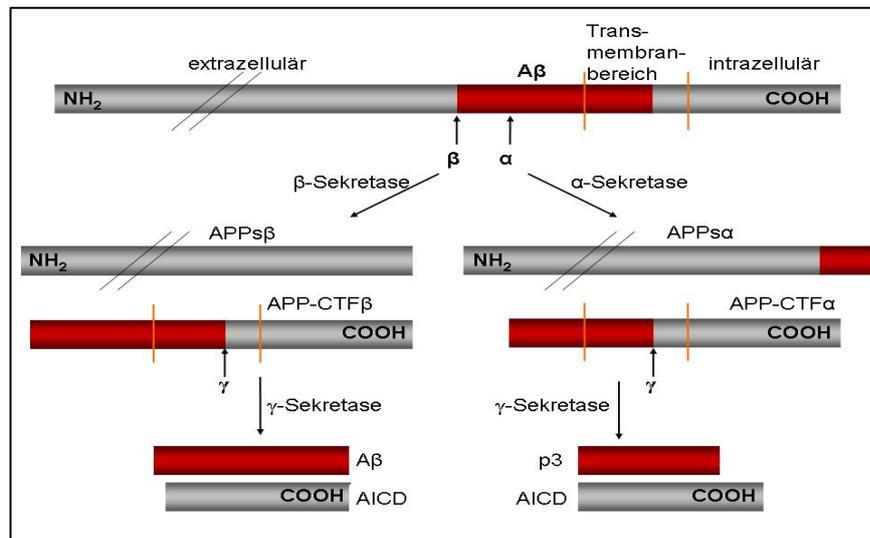


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der APP-Prozessierung durch α -, β - und γ -Sekretasen (nach Zheng und Koo 2006).

Für die Bildung der amyloidogenen A β 1-40- und A β 1-42-Peptide aus APP sind somit die Aktivität von β - und γ -Sekretasen erforderlich, die den N- und den C-Terminusprozessieren (Selkoe 1998, De Strooper und Annaert 2000).

Eine Hypothese, die so genannte Amyloid-Kaskade, (Hardy und Selkoe 2002) besagt, dass die Akkumulation von A β das primäre Ereignis in der AD-Pathogenese darstellt und die Bildung der TAU-Fibrillen aus dem Ungleichgewicht von A β -Produktion und A β -Abbau resultiert. Mittlerweile vermutet man, dass intraneuronales A β eine pathophysiologische Rolle im Fortschreiten der AD spielt (Tseng *et al.* 2004). Es wurde beschrieben, dass Defizite in synaptischer Plastizität, Lernen und Gedächtnis mit intraneuronaler A β -Akkumulation einhergehen noch bevor extrazelluläre Plaques gefunden werden können (Oddo *et al.* 2003). Außerdem wurde A β auch in intrazellulären Kompartimenten, wie dem Endoplasmatischem Retikulum, nachgewiesen (Hartmann *et al.* 1997, Cook *et al.* 1997).

Die AD entsteht in 90-95% der Fälle durch ein Zusammenwirken bisher wenig bekannter erblicher Faktoren, Alterungsprozessen im Gehirn, Vorerkrankungen des Gehirns und unbestimmter Umwelteinflüsse. Hier spricht man von seniler Demenz oder sporadischer AD (SAD). Es gibt eine zweite, wesentlich seltener

auftretende Form, die präsenile Demenz oder familiäre AD (FAD). Hier wird der Ausbruch der Krankheit durch autosomal dominante Mutationen in den an der Entstehung von A β beteiligten Genen hervorgerufen. Es sind Mutationen in APP (Goate *et al.* 1991), Presenilin 1 (PS1; Sherrington *et al.* 1995) und PS2 (Levy-Lahad *et al.* 1995) sowie einige genetische Risikofaktoren, wie das Allel ϵ 4 des ApolipoproteinE (ApoE4; Mahley *et al.* 2006) bekannt. Wie bei allen anderen Erbkrankheiten werden auch hier die Mutationen an die Nachkommen vererbt, die das Erkrankungsrisiko dann tragen.

Die Rolle N-terminal modifizierter A β -Spezies

Die Prozessierung von APP durch den γ -Sekretase-Komplex führt zur Generierung von A β x-40 oder A β x-42 am C-Terminus. Dabei ist A β x-42 die amyloidogenere Spezies und erhöhte A β x-42-Produktion führt zur Entwicklung der AD (Gravina *et al.* 1995, Suzuki *et al.* 1994, Scheuner *et al.* 1996). Biochemische Analysen ergaben, dass die amyloidogene APP-Prozessierung zum überwiegenden Teil in der Generierung von A β x-40 resultiert, während ein geringer Anteil (5-10%) die *in vitro* schneller aggregierende, und damit für die Entstehung von AD wichtigere, C-terminal um zwei AS längere Variante A β x-42 darstellt (Jarret *et al.* 1993). Es konnte außerdem in Menschen und Tiermodellen gezeigt werden, dass A β x-42 der Hauptbestandteil amyloider Ablagerungen ist und sowohl notwendig als auch ausreichend für die Bildung amyloider Plaques (McGowan *et al.* 2005). In Plaques von AD Patienten beträgt der Anteil von A β x-42 am Gesamt-A β mehr als 90% (Gravina *et al.* 1995), wobei A β 1-42 wiederum nur einen geringen Anteil an der Gesamt-A β x-42 Menge hat (Saido *et al.* 1995). Das bedeutet, dass der größte Teil A β x-42 N-terminal verkürzt oder modifiziert ist. Tatsächlich sind die A β -Ablagerungen bezüglich ihres N-Terminus heterogen. Die L-Aspartat-Reste an den Positionen 1 und 7 können isomerisiert oder racemisiert vorliegen (Roher *et al.* 1993, Saido *et al.* 1996) und die Glutamat-Reste an den Positionen 3 und 11 können als Pyroglutamat (pyroGlu) vorkommen (Saido *et al.* 1995, Saido *et al.* 1996, Russo *et al.* 1997). Mit 25% vom gesamt-A β x-42-Gehalt ist pyroGlu-A β 3-42 (A β N3pE-42) eine der am häufigsten

vorkommende A β -Variante (Harigaya *et al.* 2000). N-terminal verkürzte A β -Spezies, vor allem A β N3pE-42, spielen offenbar eine Schlüsselrolle bei der Oligomerisierung von A β und der Bildung bzw. Stabilisierung von Plaques (Saido *et al.* 1995, Saido *et al.* 1996). PyroGlu-A β ist gegenüber dem Abbau durch Aminopeptidasen stabil (Hosoda *et al.* 1998), tritt bereits sehr früh im Krankheitsverlauf auf (He und Barrow 1999) und ist stärker zytotoxisch als andere A β -Spezies (Russo *et al.* 2002). Im Gehirn von AD Patienten liegen im Vergleich zu gesunden älteren Menschen A β N3pE-Peptide auffallend überrepräsentiert vor (Piccini *et al.* 2005). *In vitro* wurde gezeigt, dass die initiale Oligomerisierung von A β N3pE-42 um 17-250-fach schneller geschieht gegenüber A β 1-42, und A β 42-Peptide aggregieren 100-fach schneller als A β 40-Peptide (Schilling *et al.* 2006). Daher wird vermutet, dass pyroGlu-A β als eine Art Keim für die Initialisierung der Fibrillenbildung verantwortlich ist. PyroGlu-A β stellt aus diesem Grund ein potentielles Target für die Behandlung der AD dar.

Die Bildung von Pyroglutamat durch Glutaminylzyklasen

Pyroglutamat (pyroGlu) wird vorwiegend aus N-terminalem Glutamin während der Prohormon-Reifung im sekretorischen Weg unter Abspaltung von Ammoniak gebildet (Abraham und Podell 1981, Fischer und Spiess 1987, Schilling *et al.* 2003). Die Glutaminylzyklase (QC) katalysiert die Transformation von N-terminalen Glutaminyl-Resten in Pyroglutamyl-Reste (pyroGlu) während der posttranslationalen Reifung einiger sekretorischer Peptide und Proteine (Busby *et al.* 1987, Fischer und Spiess 1987). In den entsprechenden Hormonen wird die Pyroglutamylgruppe zur Rezeptorbindung und/oder zum Schutz vor Abbau durch Aminopeptidasen und Diketopiperazin-Bildung benötigt (Amrani *et al.* 1997, Radzicka *et al.* 1996). QC ist im neuroendokrinen Gewebe von Säugetieren weit verbreitet (Sykes *et al.* 1999, Bockers *et al.* 1995, Wetsel *et al.* 1995) und hoch konserviert (Song *et al.* 1994, Bateman *et al.* 2001). Eine strukturell und evolutionär nicht verwandte Form wurde in Pflanzen identifiziert (Wintjens *et al.* 2006, Huang *et al.* 2005, Dahl *et al.* 2000). Die physiologische Funktion der Proteine scheint jedoch ähnlich zu sein (Schilling *et al.* 2007)

Auch die Umwandlung N-terminaler Glutamylreste in pyroGlu wurde *in vivo* beschrieben, was möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung amyloidogener Krankheiten darstellt (Saido *et al.* 1995, Ghiso *et al.* 2001, Cynis *et al.* 2006). Als Katalysatoren der Zyklisierung von N-terminalen Glutaminyl- und Glutamylresten wurden Glutaminylzyklasen (QC) in Pflanzen und Wirbeltieren identifiziert (Busby *et al.* 1987, Messer 1963, Schilling *et al.* 2004).

Die Untersuchung der Verteilung von Säuger-QCs ergab eine Expression in Hypophyse, Hypothalamus und anderen Gehirnnarealen, im Nebennierenmark, B-Lymphozyten und in einigen peripheren Drüsen, wie Thymus und Schilddrüse (Busby *et al.* 1987, Vale *et al.* 1981, Pohl *et al.* 1991, Sykes *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass das Enzym im sekretorischen Weg der exprimierenden Zellen aktiv ist, wo der Hormon-Reifungsprozess stattfindet (Bockers *et al.* 1995). Offenbar wird QC nach der Stimulation gemeinsam mit dem reifen Hormon sezerniert.

Wie Säuger verfügen *Drosophila* und andere Insekten über neuroendokrine Peptide. Die meisten der in Säugern für die Peptid-Prozessierung verantwortlichen Enzyme besitzen homologe Sequenzen in Insekten. Neben verschiedenen Prohormonkonvertasen (Mentrup *et al.* 1999a, Mentrup *et al.* 1999b, Hwang *et al.* 2000) wurde auch ein mögliches QC-Homolog beschrieben (Bateman *et al.* 2001). PyroGlu-Peptide und -Proteine wurden auch in anderen Invertebraten identifiziert. Dies könnte bedeuten, dass diese Peptid-Modifikation eine evolutionär konservierte Modifizierung ist, die die Rezeptor-Interaktion oder Proteinstabilität vermittelt. Zum Beispiel wurden in Arthropoden zwei Neuropeptide als pyroGlu-Peptide identifiziert, das Adipokinetische Hormon, welches die Glucosekonzentration in der Hämolymphe reguliert, und Corazonin, das in der Regulation des Herzschlags eine Rolle spielt (Baggerman *et al.* 2002, Schaffer *et al.* 1990). Die Präsenz von Pyroglutamylpeptiden, vornehmlich Neuropeptiden, wurde neben den Arthropoden auch in dem Mollusken *Aplysia* beschrieben, was für evolutionär konservierte Mechanismen der pyroGlu-Peptidbildung spricht und repräsentiert eine effektive Maschinerie, hormonelle Aktivität zu übertragen

(Baggerman *et al.* 2002, Garden *et al.* 1999, Furukawa *et al.* 2001, Schilling *et al.* 2007).

Einige Säugetierhormone, wie das Thyrotropin-Releasing-Hormon (TRH) und das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), benötigen den N-terminalen pyroGlu-Rest für ihre biologische Aktivität (Awade *et al.* 1994, Garavelli 2000). Die hauptsächliche Funktion des pyroGlu-Restes gewährleistet vermutlich die Stabilität des Proteins gegenüber der Degradierung durch Aminopeptidasen und verlängert folglich die physiologische Halbwertszeit (Morty *et al.* 2006). Für einige Hormone ist die entscheidende Rolle von pyroGlu für die Rezeptor-Bindung beschrieben worden (Goren *et al.* 1977).

Glutaminylyklyasen sind erst in jüngster Zeit in Zusammenhang mit der Entstehung der AD gebracht worden (Schilling *et al.* 2004, Schilling *et al.* 2006). Es wird diskutiert, ob QC-Inhibitoren in der Lage sind, die Bildung von hochtoxischem pyroGlu-A β zu verhindern und damit die Oligomerisierung von A β *in vivo* zu verzögern. Ein erster QC-Inhibitor, dessen Wirkung untersucht wird, ist P150/03 (Buchholz *et al.* 2006). P150/03 stellt ein Imidazol-Propyl-Thioamid-Derivat dar. Eine Untersuchung der QC-vermittelten pyroGlu-Bildung wurde bereits *in vitro* (Buchholz *et al.* 2006) und in Zellkultur (Cynis *et al.* 2006) nachgewiesen. Die derzeitige Forschung konzentriert sich auf die Applikation der Verbindung in Tiermodellen.

Drosophila melanogaster als Modellsystem

Die Erforschung humaner Erkrankungen wird häufig durch den Einsatz von Modellorganismen unterstützt. Das hat den Vorteil, dass Modellorganismen genetisch manipulierbar sind und das gezielte Ausschalten von Genen (z.B. durch RNA Interferenz) oder Einbringen artfremder Gene möglich ist. Die Wirkung dieses Eingriffs kann in relativ kurzer Zeit analysiert werden. Für die Erforschung der AD sind eine Vielzahl von Modellorganismen im Einsatz. Dazu zählen unter anderem die Maus *Mus musculus*, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, das Meerneunauge *Petromyzon marinus* und, wie in der vorliegenden Arbeit auch, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Die Vorteile von *Drosophila* sind

vielfältig. Die Entwicklung vom Embryo bis zur adulten Fliege dauert nicht länger als zehn Tage, in einem Fliegenröhrchen von zwei cm Durchmesser und zehn cm Höhe leben hunderte von Individuen auf 7 ml Medium. Dreiviertel der ca. 100 bekannten in menschliche Krankheiten involvierten Gene haben mindestens ein homologes Gen in *Drosophila* (<http://superfly.ucsd.edu/homophila>). Pathogene physiologische Prozesse können verfolgt werden, wenn ähnliche Charakteristika wie im Menschen beobachtet werden können. Mutationen können gezielt generiert werden, um bestimmte relevante Phänotypen hervorzurufen, ohne dabei alle involvierten Prozesse einbinden zu müssen. Mensch und Fliege ähneln sich in fundamentalen Aspekten der Zellbiologie, wie Genexpression, Membrantransport, Zytoskelett, neuronalen Verknüpfungen und Synaptogenese und Zelltod (Sang und Jackson 2005). Einige Gene, die in *Drosophila* entdeckt worden sind, sind im Nachhinein erst im Menschen identifiziert worden. Die Unterschiede zwischen den Spezies Mensch und Fliege müssen bei der Interpretation des genetischen Modells ebenso in Betracht gezogen werden. So verfügt *Drosophila* über ein einfacheres Kreislaufsystem und geringere kognitive Fähigkeiten. Die Gene sind weniger redundant als beim Menschen, was die Analyse vereinfacht. Außerdem ist eine Vielzahl genetischer Manipulationen in Invertebraten realisierbar, die in Säugetieren undenkbar sind. Sehr viele Individuen können zeitgleich mutagenisiert und selbst seltene Mutationen in relativ kurzer Zeit identifiziert werden. Darüberhinaus ist das Fliegenauge ein wichtiges Modell bei der Untersuchung biologischer Prozesse. Es toleriert, anders als die meisten anderen Organe der Fliege, genetische Eingriffe in grundlegende biologische Prozesse.

Drosophila besitzt ein dem menschlichen *APP* homologes Gen, das *APPL* (*amyloid precursor protein like*). *APPL*-Mutanten sind lebensfähig und fertil, zeigen aber leichte Verhaltensdefekte und reduzierte Synapsen-Endknöpfchen an neuromuskulären Junctions (Torroja *et al.* 1999). Eine Überexpression von *APPL* führt zu satellitenartiger Endknöpfchen-Bildung an neuromuskulären Junctions. Fossgreen *et al.* (1998) zeigten, dass die Überexpression von humanem *APP* zu Fehlbildungen in der Flügelentwicklung („*blistered-wing*“-Phänotyp) führt, was für die Involvierung in Zell-Adhäsion spricht. Außerdem konnten sie zwar

endogene γ -Sekretase-Aktivität in der Fliege nachweisen, jedoch keine β -Sekretase-Aktivität und keinen robusten neurodegenerativen Phänotyp. Die amyloidogene Prozessierung von humanem APP konnte von Greeve *et al.* (2004) in transgenen Fliegen reproduziert werden, indem APP, BACE und Preseniline koexprimiert wurden. Die Bildung von A β -Peptiden sowie eine damit assoziierte Degeneration der Retina und optischer Neuronen konnten hier gezeigt werden. Iijama *et al.* (2004) und Crowther *et al.* (2004) exprimierten A β als sekretierte Peptide im neuronalen Gewebe von Fliegen. Beide konnten für A β 1-40 keinen Phänotyp zeigen, während die Expression von A β 1-42 zu einer verkürzten Lebenserwartung und lokomotorischen Defiziten führte. Pawlow'sche Lernversuche ließen auf einen Einfluss von A β 1-42 auf das olfaktorische Gedächtnis schließen (Iijama *et al.* 2004). Thioflavin-S-positive Ablagerungen konnten im Gehirn älterer Fliegen identifiziert werden (Greeve *et al.* 2004, Iijama *et al.* 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten mit dem Modellsystem *Drosophila melanogaster* wurden sowohl Untersuchungen zur Funktion von APP bzw. APPL (Fossgren *et al.* 1998, Torroja *et al.* 1999) als auch zum Einfluss von A β -Peptiden auf die Lebenserwartung, lokomotorische Fähigkeiten und das olfaktorische Lernverhalten (Iijama *et al.* 2004, Crowther *et al.* 2004) durchgeführt. Dabei standen stets A β 1-40 und A β 1-42 im Mittelpunkt der Untersuchungen. Über transgene *Drosophila*-Linien, die verkürzte A β -Varianten, wie A β 3-42, exprimieren, gibt es in der Literatur bisher keine Hinweise. Aus Untersuchungen an Gehirnen von AD-Patienten geht jedoch hervor, dass gerade verkürzte und N-terminal zyklisierte A β 3-42-Peptide eine Art Oligomerisierungskeim für die Bildung von Plaques darstellen. In der vorliegenden Arbeit werden nun erstmalig transgene *Drosophila*-Linien vorgestellt, die diese verkürzten A β 3-42-Peptide exprimieren.

Ein erstes Ziel war, transgene Linien zu generieren, die A β 1-40/42, A β 3-40/42 bzw. A β 3-40/42(E3Q) exprimieren und deren A β -Ablagerungen im Kopf

vergleichend zu charakterisieren. A β 1-40/42 stellt dabei den Wildtyp dar, A β 3-40/42 die N-terminal um zwei AS verkürzten Varianten, die als pyroGlu-A β die Hauptkomponente in amyloiden Plaques darstellt. Die A β 3-40/42(E3Q)-Peptide verfügten über einen N-terminalen Aminosäureaustausch von Glutamat in Glutamin, wodurch die QC-katalysierte pyroGlu-A β -Bildung um ein vielfaches beschleunigt wird. Aufgrund von Datenbankanalysen sollte *Drosophila* über eine QC verfügen, demzufolge sollte dieses Konstrukt als Kontrolle a) zum Nachweis von QC-Aktivität in *Drosophila* und b) zum Nachweis der korrekten Prozessierung des Transgens dienen. Der Nachweis von A β -Peptiden in *Drosophila* erfolgte erstmals mit spezifischen ELISAs. Mittels dieser transgener, A β -exprimierender *Drosophila*-Linien sollte ein Modellsystem zur Testung putativer Glutaminylzyklase-Inhibitoren etabliert und die Hemmung der pyroGlu-Bildung untersucht werden.

Das zweite Ziel bezog sich auf die Isolierung der durch Datenbankanalysen identifizierten putativen QCs in *Drosophila* und deren Charakterisierung. Hierbei sollten sowohl native als auch C-terminal markierte Expressionsklone angefertigt und rekombinante *Drosophila*-QCs in Schneider-Zellen exprimiert werden. Anhand biochemischer und immunzytochemischer Untersuchungen sollte deren Lokalisation bestimmt und mit den Datenbankangaben verglichen werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt das erste *Drosophila*-Modellsystem für die Alzheimer Demenz, in welchem die QC-vermittelte pyroGlu-A β -Bildung gezeigt und deren Hemmung untersucht werden kann.

Im Rahmen des BioChancePlus-Projektes „Targetvalidierung für die Behandlung von neuronalen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer’schen Demenz“ wurde die vorliegende Arbeit in Kooperation mit der probiodrug AG durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Anzucht und Haltung der Fliegen

Die Haltung und Anzucht von *Drosophila melanogaster* erfolgte in Glasröhrchen bzw. 0,5 l Glasflaschen auf einem Standardmedium (1% Agar; 2,5% Sirup; 3,5% Rosinen; 3% Grieß; 5% Hefe; 0,1% Nipagin). Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18°C, Kreuzungen wurden bei 25°C durchgeführt.

2.1.2 Herstellung transgener Linien von *Drosophila melanogaster*

DNA-Moleküle, die als flankierende Sequenzen P-Element-Repeats enthalten, können mit Hilfe einer Transposase in das Genom von *Drosophila melanogaster* integriert werden (Rubin und Spradling, 1982). Der Transformationsvektor pUAST wurde zusammen mit der Transposasequelle pUChsD2-3wc („pTurbo“; Tomlinson *et al.* 1988) in Embryonen des *Drosophila melanogaster* Stammes $w^{1118}iso1;iso2;iso3 (w^{iso})$ injiziert. Dieser Stamm trägt eine Mutation für das *white*-Gen und besitzt daher weiße Augen. Der Transformationsvektor trägt als Selektionsmarker das *white*-Gen. Die erfolgreiche Integration des Transgens zeichnet sich durch eine rote Augenfarbe aus. Da das Transgen jedoch in die Keimbahn eingebracht wurde, konnte die Selektion erst in der nächsten Generation erfolgen. Die nach der Injektion überlebenden Tiere wurden daher mit dem für die Injektion verwendeten Stamm w^{iso} gekreuzt. In der F1-Generation wurden transgene Individuen selektiert, die den Selektionsmarker ausprägten und daher rotäugig waren.

2.1.3 Etablierung transgener Stämme

Zur genetischen Lokalisierung des Integrationsortes wurden Kreuzungen der einzelnen selektierten transgenen Fliegen mit Balancer-Chromosomen für das zweite ($w^{iso};SM6,CyO/Sco$) und dritte ($w^{iso};TM3,Sb Ser/TM6,Tb$) Chromosom durchgeführt (Beschreibung der Balancerchromosomen in Lindsley und Zimm 1992). Das Segregationsverhalten des Selektionsmarkers relativ zum Balancer-Chromosom ermöglichte es, auf den Einbau des Transgens im entsprechenden Chromosom zu schließen. Wurde der Selektionsmarker X-gekoppelt vererbt, war ein Einbau im X-Chromosom erfolgt. In der F2-Generation war die Klassifizierung nach homozygot lebensfähig und rezessiv letal möglich. Die dabei etablierten Stämme sind in Tabelle A3 (im Anhang) dargestellt.

2.1.4 GAL4-UAS-kontrollierte Transgenexpression

Das GAL4-UAS-Expressionssystem erlaubt die kontrollierte Expression von Transgenen in *Drosophila melanogaster*. Das System beruht auf der gewebespezifischen Expression von GAL4 in eigens dafür etablierten transgenen *Drosophila*-Linien, sogenannten Treiberlinien. In Tabelle 2.1 sind die Treiberlinien und deren spezifische GAL4-Expression aufgeführt, die zur Transgen-Expression in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die beschriebenen Stämme sind beim *Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University)* erhältlich.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.1 Bezeichnung, Expressionsgewebe und Genotyp der verwendeten GAL4-Treiberlinien

Bezeichnung	Expression	Genotyp	Referenz
elavGAL4 458	neuronales Gewebe, konstitutiv	P{GawB}elav ^{C155}	Corey Goodman
elavGAL4 5144	neuronales Gewebe, konstitutiv	P{GawB}elav ^{C155} w [*] P{neoFRT}19A; Bc ¹ Egfr ^{E1} /CyO	Liqun Luo
elavGAL4 5145	neuronales Gewebe, konstitutiv	P{GawB}elav ^{C155} , P{hsFLP}1, w [*] ; P{FRT(w ^{hs})}G13 P{tubP-GAL80}LL2/CyO	Liqun Luo
elavGAL4 5146	neuronales Gewebe, konstitutiv	P{GawB}elav ^{C155} , P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4, P{hsFLP}1, w [*]	Liqun Luo
elavGAL4 5147	neuronales Gewebe, konstitutiv	P{GawB}elav ^{C155} w [*] ; P{FRT(w ^{hs})}G13 P{tubP-GAL80}LL2	Liqun Luo
elavGAL4 6920	neuronales Gewebe, konstitutiv	P{GawB}elav ^{C155} , P{UAS-n-syb.eGFP}1, w [*] /FM7a	Kendal Broadie
elavGAL4 6923	neuronales Gewebe, konstitutiv	P{GawB}elav ^{C155} , P{UAS-syt.eGFP}1, w [*]	Kendal Broadie
actinGAL4	ubiquitär, konstitutiv	P{Act5C-GAL4}17bFO1	Yash Hiromi
hspGAL4	ubiquitär nach Hitzschock: 30 min. 37°C	P{GAL4-Hsp70.PB}2	Andrea Brand
gfp	ubiquitär, konstitutiv	P{GAL4-Hsp70.PB}TR1	Gunter Reuter

2.1.5 Behandlung transgener *Drosophila* mit P150/03

Die Behandlung der A β -exprimierenden Fliegen mit P150/03 (probiodrug AG Charge 3223-06693.05) erfolgte auf der Annahme, dass eine Fliege ein durchschnittliches Körpergewicht von 1 mg besitzt und 1 mg Medium pro Tag aufnimmt. 356 g P150/03 wurden zunächst in 1 ml H₂O gelöst um eine 1 M Stammlösung zu erhalten. Diese wurde mit PBS weiter verdünnt, um Gebrauchslösungen in den entsprechenden Konzentrationen zu erhalten. Dabei wurde beachtet, dass die Lösung eine 1:20 Verdünnung bei der Zugabe ins Medium erfährt. Beispielsweise wurde eine 20 mM Gebrauchslösung angefertigt, um eine 1 mM Endkonzentration im Medium zu erhalten. 350 ml der fertigen P150/03-Lösung wurden direkt nach der Fertigstellung in 7 ml des Nährmediums eingerührt. Die erste Behandlung der A β -exprimierenden Tiere erfolgte nach dem Entfernen der Elterntiere (Treiberlinie x transgene Linie) aus dem Röhrchen, um

die Aufnahme von P150/03 bereits im Larvenstadium zu gewährleisten. Die geschlüpften Tiere wurden alle 7 Tage auf frisches, vorbereitetes Medium gesetzt.

2.1.6 Toxizitätstest

Um die für *Drosophila* kritische P150/03-Konzentration zu bestimmen, wurde eine Toxizitätsreihe angefertigt. Nährmedien mit folgenden Konzentrationen P150/03 wurden hergestellt: 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 80 mM, 100 mM, als Kontrolle wurde PBS verwendet. Männchen und Weibchen der *w¹¹¹⁸;iso1;iso2;iso3*-Linie wurden gekreuzt und deren Nachkommen (gleichaltrige Tiere) mit P150/03 behandelt, wie in Abschnitt 2.1.5 „Behandlung mit P150/03“ beschrieben. Die Entwicklung der Larven wurde täglich beobachtet. Parallel dazu wurden gleichaltrige adulte Fliegen mit äquimolaren Dosen P150/03 behandelt. Damit sollte untersucht werden, ob sich die Toxizität von 150/03 auf juvenile Tiere beschränkt oder auch einen Einfluss auf die Vitalität adulter Fliegen hat. Die Vitalität der Fliegen wurde täglich beobachtet. Für beide Versuche wurden jeweils drei Parallelansätze durchgeführt.

2.1.7 Dekaptieren von Fliegen

Um die Transgenexpression in den Köpfen der Fliegen mittels ELISA nachzuweisen, wurden diese vom Restkörper getrennt. Die entsprechend der Vorgaben gealterten Fliegen wurden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie in einer Box mit Trockeneis stark geschüttelt, damit die Köpfe abbrechen konnten. Die Trennung der Körperteile erfolgte durch zwei engmaschige, geschachtelte Haushaltssiebe auf Trockeneis. Dabei wurden im ersten Sieb die Körper zurückgehalten, im zweiten Sieb die Köpfe, und die Flügel und Beine fielen hindurch. Die Köpfe wurden dann durch einen Trichter in ein entsprechendes Gefäß gefüllt und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gewinnung von Nukleinsäuren

Die Präparation genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster* erfolgte strikt nach dem „Quick Fly Genomic DNA Prep“-Protokoll von E. Jay Rehm (*Berkeley Drosophila Genome Project*).

Die Minipräparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doley, 1979). Zur Großpräparation wurde eine 100 ml Übernachtskultur mit dem Nucleobond AX 100-Kit (Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Midi-Prep). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen DNA-Großpräparationen sind im Anhang aufgeführt (Tab. A1).

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Embryonen, Larven und adulten *Drosophila melanogaster* erfolgte mittels TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde nach dem Trocknen in DEPC-behandeltem H₂O (1 ml DEPC/1 l bidest. mind. 2 Stunden einwirken lassen, dann autoklavieren) gelöst.

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen (DNA und RNA) mit dem Spektralphotometer (Amersham Biosciences) wurde deren Absorptionsmaximum von ultraviolettem Licht bei der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ ausgenutzt. Der Berechnung der Konzentration wurde zu Grunde gelegt, dass eine doppelsträngige DNA-Lösung mit einer Konzentration von $c = 50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ eine Absorption des Lichtes mit der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ von $A_{260\text{nm}} = 1$ besitzt (Schichtdicke der Küvette = 1 cm). Zur Bestimmung der Reinheit einer Nukleinsäurepräparation wurde deren Gehalt an Protein ermittelt. Dazu wurde die Absorption der Lösung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren im Protein) gemessen. Das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ diente als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung, wobei Werte zwischen 1,8 und 2,0 für eine hohe Reinheit der Nukleinsäurepräparation standen.

2.2.2 Amplifizierung von Nukleinsäuren

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in Anlehnung an Seiki (1990) in einem Gesamtvolumen von 20 µl (50-200 ng DNA bzw. cDNA; je 20 pmol Oligonukleotidprimer (MWG-Biotech); 2 µl 10 x PCR Puffer (Promega); 200 nM dNTP's (MBI Fermentas); 2 mM MgCl₂; 1 Unit *Taq*-Polymerase (Promega); ad. 20 µl dest. H₂O) unter folgenden Bedingungen im T-Gradient (Biometra[®]) oder Robocycler[®] (Stratagene[®]) durchgeführt:

Denaturierung:	94 °C	5 min.	
Synthesezyklen (35):	94°C	30 sec.	Denaturierung
	55-65°C	30 sec.	Primer-Annealing
	72°C	30 - 90 sec.	DNA – Synthese
Nachsynthese:	72°C	5 min.	

Die Primer-Annealing Temperatur entsprach jeweils den Angaben der Herstellerfirma und die DNA-Synthesezeit richtete sich nach der entsprechenden bp-Länge des erwarteten Fragmentes (Synthesegeschwindigkeit *Taq*-Polymerase 2 kb/min.). Die für die PCR-Reaktionen verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

PCR-Produkte wurden entweder auf ein Agarose-Gel (0,8-2,5%) aufgetragen und für Ligationen oder Sequenzierung mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eluiert, oder mittels QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

RT-PCR

Die reverse Transkription erfolgte mit AMV Reverse Transcriptase (Promega) im T-Gradient (Biometra[®]). Für einen 20 µl Ansatz wurden zunächst 5 µl Gesamt-RNA (100-200 ng), 5 µl DEPC-behandeltes H₂O und 1µl Random Hexamer Primer (100pmol; Promega) gemischt, 10 min. bei 70°C denaturiert und auf Eis

abgekühlt. Dann wurden 4 µl First Strand Buffer und 4 µl dNTP (2,5mM) zugegeben und 1 min. bei 37°C akklimatisiert. Nach der Zugabe von 1 µl AMV Reverse Transcriptase wurde der Ansatz 1 Stunde bei 37°C inkubiert (reverse Transkription) und 15 min. bei 70°C denaturiert. Nach dem Abkühlen wurde 1 µl RNase ONE (Promega) und 2,3 µl RNase-Puffer zugegeben und für 20 min bei 37°C stehen gelassen.

Der Ansatz wurde mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und für PCR-Reaktionen wie oben beschrieben eingesetzt. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Sequenzierungsreaktion

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger (1977). Es wurden 500 - 1000 ng Plasmid-DNA, 1 µl Primer (4 pmol), 2 µl Big Dye Mix, ad 10 µl dest. H₂O gemischt und die Reaktion unter folgenden Bedingungen im T-Gradient (Biometra®) durchgeführt:

Denaturierung:	94 °C	5 min.	
Synthesezyklen (40):	94°C	40 sec.	Denaturierung
	49 bzw. 53°C	40 sec.	Primer-Annealing
	60°C	40 sec.	DNA – Synthese

2.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

Transformation in E.coli

Plasmide wurden in *E.coli*-Bakterien des Stammes DH5α (F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-*) (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transformiert, auf Ampicillin (100 µg/ml)- und X-Gal (20 mg/ml)-haltigem LB-Agar ausplattiert und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C angezogen.

2.2.4 Klonierung der A β -Expressionskonstrukte

Klonierung der TRH-A β -Konstrukte

Die sechs Konstrukte pBS-TRH-A β 1-40, pBS-TRH-A β 3-40, pBS-TRH-A β 3-40(E3Q), pBS-TRH-A β 1-42, pBS-TRH-A β 3-42 und pBS-TRH-A β 3-42(E3Q) wurden von der probiodrug AG übernommen, mit *Bam*HI und *Not*I (beide MWG) ausgeschnitten (2h bei 37°C) und in den *Bgl*II-*Not*I-verdauten pUAST-Vektor kloniert (Promega T4-Ligase; Ligation 4h bei 18°C).

Klonierung der BiP-A β -Konstrukte

Die Sequenzen von A β 1-42, A β 3-42 und A β 3-42(E3Q) wurden mittels PCR und den Primern BGL_1-42_fw bzw. BGL_3-42_fw (vgl. Tab. 2.2) amplifiziert, anschließend *Bgl*II-*Not*I verdaut und in *Bgl*II-*Not*I geschnittenen pMT/BiP/V5-His B Vektor (Invitrogen) kloniert. Mit dem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) und den Primern Mut_NL_fw, Mut_NLE_fw, Mut_NLQ_fw, Mut_NL_rev, Mut_NLE_rev und Mut_NLQ_rev wurde eine gerichtete Mutagenese nach Herstellervorschrift durchgeführt. Die Fragmente wurden mit den Primern Not_pmt und SV40rev amplifiziert, mit *Not*I verdaut und in den vorbereiteten pUAST-Vektor kloniert.

Tabelle 2.2 Primer zur Klonierung der BiP-A β -Konstrukte.

Primer Bezeichnung	Sequenz in 5'- 3' Orientierung
BGL_1-42_fw	TATATAAGATCTGAATTCGACATGACTCAGG
BGL_3-42_fw	TATATAAGATCTCGACATGACTCAGGATATG
Mut_NL_fw	GCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGGATGCAGAATTCGACATGACTCAGGA
Mut_NL_rev	TCCTGAGTCATGTCGGAATTCTGCATCCCCGAGCGAGAGGCCAACAAAGGC
Mut_NLE_fw	GCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGGAGTTTCGACATGACTCAGGATATGAAG
Mut_NLE_rev	CTTCATATCCTGAGTCATGTCGAAACTCCCCGAGCGAGAGGCCAACAAAGG C
Mut_NLQ_fw	GCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGCAATTTTCGACATGACTCAGGATATGAAG
Mut_NLQ_rev	CTTCATATCCTGAGTCATGTCGAAATTGCCCGAGCGAGAGGCCAACAAAGG C
Not_pmt	ATATATGCGGCCGCTGCATCAGTTGTGGTCAGCAGC
SV40rev	GTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC

2.2.5 Klonierung von *Drosophila* QC Expressionskonstrukten

Die cDNA-Klone GH11174 (CG32412), RE53796 (CG5976A) und RE61650 (CG5976B) wurden anhand von Datenbankanalysen identifiziert (www.flybase.org) und angefordert. Nach Amplifikation der Fragmente mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Primern aus den original cDNA Klonen und anschließendem Verdau mit *Eco*RI und *Age*I (CG32412, CG5976B) bzw. mit *Not*I und *Sac*II (CG5976B) wurden die Fragmente in den entsprechend vorbereiteten pMT/V5-His B Vektor kloniert.

Tabelle 2.3 Primer zur Klonierung von Expressionskonstrukten zur Produktion rekombinanter *Drosophila* QC-Proteine.

Primer Bezeichnung	Sequenz in 5'- 3' Orientierung
CG32412fwd_eco	TATATAGAATTCTGCGTCGCCGAGCTCTGAAGC
CG32412rev_ageI	TATATAACCGGTTGTTCCGGTAAAAACGCAAATT
CG32412rev_stop_ageI	TATATAACCGGTCTATGTTCCGGTAAAAACGCAAATT
CG5976fwd_eco	TATATAGAATTCCGGTGTGTTGTGTAGTGTTCTG
CG5976rev_ageI	TATATAACCGGTCTTGGCCTCGGTTCCGGCCAG
CG5976rev_stop_ageI	TATATAACCGGTCTACTTGGCCTCGGTTCCGGCCAG
59Bnotfw	ATATATGCGGCCGCGGTGTGTTGTGTAGTGTTCTG
59sac2rev	ATATATCCGCGGCTTGGCCTCGGTTCCGGCCAG

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 A β -Immunpräzipitation aus Schneiderzellmedium

Schneider-Zellen (S2 Zellen) wurden mit den Konstrukten pMT-TRH-A β 1-42, pMT-TRH-A β 3-42 und pMT-TRH-A β 3-42(E3Q) stabil transfiziert (vgl. Abschnitt 2.4.1). 48 h nach der Induktion wurden die Zellen vom Medium getrennt (100 g, 10 min.). Jeweils 1 ml Zellkulturmedium wurde mit 15 μ l monoklonalem 4G8-Antikörper (Chemicon) versetzt und im Überkopfschüttler für mindestens 18 Stunden bei 4°C belassen. 4G8 erkennt im A β -Peptid die AS 17-24 als Epitop. 100 μ l Sekundäntikörperlösung (Dynabeads) wurden zu den Proben gegeben und für 24 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads

wurden am Folgetag im Magnetfeld präzipitiert und die gebundenen A β -Peptide vom Trägermaterial durch Kochen für 10 Minuten in 30 μ l 5 x Tris-Tricin Probenpuffer abgelöst und anhand von SDS-PAGE im Harnstoffgel und anschließender Western-Blot-Analyse analysiert.

2.3.2 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5%, im Trenngel 7.5-15% (abhängig vom aufzutrennenden Molekulargewichtsbereich). Harnstoffgele enthielten zusätzlich 8 M Harnstoff. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS; bzw. 0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS bei Harnstoffgelen) bei 20 mA für ein Minigel (10x15 cm) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandards wurden Proteinleitern von Invitrogen bzw. MBI Fermentas eingesetzt. Zur Färbung der Proteine wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassielösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 in 40% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch Entfärbelösung oder durch Kochen der Gele in Aqua bidest für 20 min.

2.3.3 Nachweis von Proteinen im Westernblot

Die Proteine wurden im Anschluß an die Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran (Macherey-Nagel) durch Elektro-Blot-Transfer bei 0.8 mA/cm² für 2 Stunden transferiert (Blotpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol). Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0.2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure, 3% Sulfosalicylsäure) für fünf Minuten angefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Membran wurde anschließend eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) in PBST (PBS, 0.2% Tween 20) geblockt. Im Anschluss daran wurden die primären Antikörper in 5% Milchpulver in PBS

verdünnt zugegeben und entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach 3 x 20 min Waschen in PBST wurden die entsprechenden sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper in 5% Trockenmilchpulver in PBS zugegeben und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend wiederum 3 x 20 min in PBST gewaschen. Danach erfolgte die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Antikörper mit dem ECL Plus System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers.

2.3.4 ELISA

Die Aufarbeitung der Fliegen bzw. Fliegenköpfe erfolgte in drei Schritten durch sequenzielle A β -Extraktion in Anlehnung an Kawarabayashi *et al.* (2001). Bei jedem Schritt erfolgten eine Ultraschallbehandlung (75%, Stufe 9, 30 Sek.) im jeweiligen Puffer, gefolgt von einer Ultrazentrifugation (75.500 g, 1 h, 4°C). Im ersten Schritt wurden die Fliegen bzw. Fliegenköpfe in 750 μ l TBST Puffer (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6; 1% Triton X-100; + Proteaseinhibitorcocktail (1 Tablette Complete Mini [Roche]; 10 μ l 1M AEBSF (Roth/Karlsruhe) pro 10 ml TBS) mit dem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Nach Ultraschall und Ultrazentrifugation wurde das Pellet im zweiten Schritt in 750 μ l 2% SDS (2% SDS in H₂O; Proteaseinhibitorcocktail s.o.) resuspendiert. Im dritten Schritt erfolgte die Extraktion mit 150 μ l 70% Ameisensäure (70% HCOOH in H₂O). Der Überstand wurde mit 2,85 ml 1 M Tris neutralisiert. Alle Überstände wurden bei -80°C gelagert. Die Durchführung der ELISAs erfolgte mit den Human Amyloid β - Kits von IBL, Japan (Code No. 27711, 27713, 27716) nach Herstellerangaben. Die Auswertung der ELISAs erfolgte mit dem „*Sunrise microplate reader*“ (TECAN).

2.3.5 QC-Aktivitätstest

Die QC-Aktivität wurde fluorometrisch oder spektrophotometrisch bestimmt, wie beschrieben in Schilling *et al.* (2007). Die Reaktionsansätze (250 μ l) enthielten

unterschiedliche Konzentrationen H-Gln-AMC, H-Gln-βNA oder andere Glutaminylpeptide in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 oder 0,05 M MOPS pH 7,0. Bei der spektrofotometrischen Analyse wurden den Proben zusätzlich 30 U/ml Glutamat-Dehydrogenase, 0,25 mM NADH/H⁺ und 15 mM α-Ketoglutarat zugesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von QC gestartet und die QC-Aktivität mittels Absorbionsmessung bei 340 nm überwacht. Für die fluorometrische Analyse (Gln-AMC, Gln-βNA) wurde den Proben 0,4 U/ml Pyroglutamylaminopeptidase als Hilfsenzym zugesetzt. Die Anregungs-/Emissionswellenlängen betragen 380/460 nm (H-Gln-AMC) bzw. 320/410 nm (H-Gln-βNA). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von QC gestartet und die Aktivität anhand einer Standardkurve bestimmt. Alle Aktivitätsmessungen wurden bei 30°C mit dem „Novostar“ (BMG) oder dem „Sunrise“ (TECAN) Mikroplattenspektrometer durchgeführt.

2.4 Zytologische Methoden

2.4.1 Transfektion von Schneider-Zellen

Transiente und stabile Transfektionen von Schneider-Zellen (S2) erfolgten strikt nach dem Protokoll „DES ® Blasticidin Support Kit; Version C“ (Invitrogen). Die Selektion stabiler Zelllinien erfolgte mit 20 µg Blasticidin. Die Expression rekombinanten Proteins wurde mit 500 µM CuSO₄ induziert. 24-48 h nach der Induktion wurden die Zellen geerntet.

2.4.2 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung von S2 Zellen erfolgte nach dem Protokoll von *Igaki et al.* (2000). 4×10^7 Zellen wurden in Extraktionspuffer (50 mM Pipes pH 7,9, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) im Dounce-Homogenisator homogenisiert. Zellkerne und nicht-lysierte Zellen wurden im ersten Zentrifugationsschritt (700 g, 10 min.) abgetrennt. Der Überstand wurde für

10 min. bei 24.000 g zentrifugiert, um die Membranfraktion 1 abzutrennen, in denen die Mitochondrien angereichert vorliegen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 55.000g für 1 h. Das Pellet repräsentiert die Membranfraktion 2, zu denen das ER und die Plasmamembran zählen, und der resultierende Überstand enthält zytosolische Proteine.

2.4.3 Immunzytologische Untersuchung

24 h nach der Induktion wurden die Zellen mit 250 nM Mitotracker (Invitrogen) versetzt, in Lab Tek II Chamber Slides (Nunc) gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig konnten sich die Zellen absetzen. Medium und übrige Zellen wurden entfernt und die Kammern wurden 3x10 min mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 min. Anschließend wurden die Zellen mit PBTA (1% BSA, 0,05% Triton X-100, 0,02% Na-Azid in PBS) gespült und für 20 min mit PBTA geblockt. Der primäre Antikörper (Maus- α -V5 (Invitrogen) 1:250 in PBTA) wurde über Nacht bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Die Zellen wurden 3x10 min mit PBTA gewaschen und der sekundäre Antikörper (Ziege- α -Maus, konjugiert mit Alexa 488; Upstate), 1:200 in PBTA, wurde für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Nach dem Waschen (3x10 min PBTA) wurden die Zellen für 3 min mit 0,2 μ g/ml DAPI gegengefärbt. Die Kammern wurden entfernt und die Objektträger wurden mit Citifluor (Agar-Scientific) versehen und mit Nagellack versiegelt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss).

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung transgener Linien von *Drosophila melanogaster*

3.1.1 Herstellung und Test der Konstrukte

Zur Untersuchung der Glutaminylzyklase-abhängigen pyroGluA β -Bildung im Fliegenhirn wurde eine Reihe transgener *Drosophila* Linien genutzt. Die Herstellung dieser Linien basierte auf insgesamt sechs verschiedenen Konstrukten hergestellt (Abbildungen 3.1 und 3.2). Das Grundgerüst dieser Konstrukte enthält die Signalsequenz (Prä-Sequenz) sowie die Pro-Sequenz des Thyreotropin-Releasing-Hormons (TRH) der Maus. Der Prä-Pro-Sequenz folgt die humane A β Sequenz. Da in den Plaques von Alzheimer Patienten sowohl A β 1-40- als auch A β 1-42 Spezies nachweisbar sind, wurden beide Varianten für das Modellsystem gewählt. Die Aminosäuresequenz der A β 1-40 Variante endet mit den Aminosäuren Valin-Valin, während das A β 1-42 Peptid um zwei hydrophobe Aminosäuren verlängert ist und auf Valin-Valin-Isoleucin-Alanin endet. Dabei wird die A β 42-Variante als weniger gut löslich und besonders amyloidogen beschrieben (Jarret *et al.* 1993). Die N-Termini der Konstrukte unterscheiden sich ebenfalls. Es wurden sowohl die für A β 1-40 und A β 1-42 kodierenden als auch die für zwei verkürzte Peptide (A β 3-40 / A β 3-42 und A β 3-40(E3Q) / A β 3-42(E3Q)) kodierenden Konstrukte hergestellt. Das A β 3-42 Peptid ist das in der Arbeitshypothese vorgeschlagene Substrat für die Glutaminylzyklase (Vgl. auch Schilling *et al.* 2004). Glutaminylzyklasen wurden ursprünglich im Zusammenhang mit der Zyklisierung von Glutamin beschrieben (Messer 1963, Busby *et al.* 1987, Fischer *et al.* 1987, Dahl *et al.* 2000). Die Konstrukte A β E3Q-40/42 sollten daher als Positivkontrolle für eine pyroGlu-A β -Bildung in der Fliege

3. Ergebnisse

dienen. Die kodierende Sequenz für mTRH-A β wurde von der probiodrug AG zur Verfügung gestellt.



Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Struktur der verwendeten Konstrukte. Signal- und Pro-Sequenz (Prä-Pro-Sequenz) entstammen dem TRH der Maus und werden bei der Prozessierung des Peptides abgespalten. A β x-40/42 beschreibt die verschiedenen A β -Varianten, die im Detail in Abb. 3.2 dargestellt sind.

A β 1-40/42	H ₂ N---	D A E	F R H D S-----	G V V	I A-COOH
A β 3-40/42	H ₂ N---	E	F R H D S-----	G V V	I A-COOH
A β 3-40/42(E3Q)	H ₂ N---	Q	F R H D S-----	G V V	I A-COOH
		1		40	42

Abbildung 3.2 Vergleich der einzelnen resultierenden A β Peptide nach der Prozessierung. Die Nomenklatur richtet sich nach der Variante A β 1-40/42 (oben), deren erste AS Aspartat (D) ist. Die um zwei AS verkürzte Variante A β 3-40/42 (Mitte) kodiert für das in Plaques als pyroGlu-A β vorgefundene Peptid. A β 3-40/42(E3Q) (unten) ist eine modifizierte Variante, deren N-terminaler Glutaminyl-Rest stärker zur pyroGlu-Bildung neigt. Die C-Termini der Konstrukte stellen die beiden Peptidvarianten A β x-40 und A β x-42 dar.

Da es sich bei dem Signalpeptid um das der Maus-TRH handelte, wurde zunächst die Prozessierung der Konstrukte in *Drosophila*-Zellen überprüft. Dazu wurden die Varianten TRH-A β 1-42, TRH-A β 3-42 und TRH-A β 3-42(E3Q) in den pMT Vektor kloniert und in Schneider-Zellen (S2-Zellen) exprimiert. S2-Zellen sind embryonale Zellen von *Drosophila melanogaster*. Die A β -Konzentrationen im Zellmedium und im Zellpellet wurden 48 Stunden nach der Induktion anhand eines ELISAs in Zusammenarbeit mit der probiodrug AG bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Für jedes der drei Konstrukte konnte die Lokalisation von A β im Medium nachgewiesen werden, wohingegen lediglich eine basale A β -Konzentration in den aufgeschlossenen Zellen detektierbar war. Die *Drosophila*-Zellen sind demnach in der Lage, die TRH-Signalsequenz der Maus als sekretorisches Signal zu erkennen und rekombinante Proteine zu sezernieren.

3. Ergebnisse

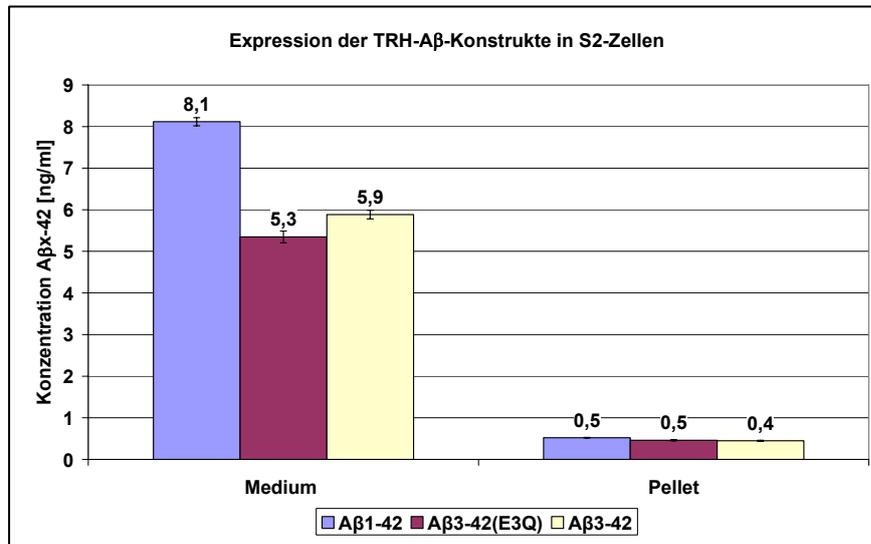


Abbildung 3.3 Konzentration von TRH-A β _x-42 in stabil transfizierten Schneider-Zell-Linien. Die Linien exprimierten die in Abb. 3.1 und 3.2 dargestellten Konstrukte A β 1-42, A β 3-42 und A β 3-42(E3Q). Zellen und Medium wurden 48h nach Induktion getrennt und mittels ELISA analysiert. Im Medium nicht-transfizierter Zellen wurde A β nicht nachgewiesen.

Zur Verifizierung der ELISA-Ergebnisse wurde das Zellkulturmedium immunpräzipitiert und mittels Western-Blot-Analyse, basierend auf einer 8M Harnstoff-PAGE, untersucht. Die Immunpräzipitation erfolgte mittels 4G8-Antikörpers, welcher die AS 17-24 im A β -Peptid erkennt. Für den Western-Blot wurde der 6E10-Antikörper verwendet, der die AS 7-11 erkennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.4 dargestellt. In den Spuren 1, 4 und 7 wurden jeweils die Präzipitate der Zellkulturmedien der A β 1-42, A β 3-42 bzw. A β 3-42(E3Q) exprimierenden S2 Zellen aufgetrennt. Als Kontrollen dienten in 25% DMSO gelöste, synthetisch hergestellte A β - bzw. pyroGlu-A β -Peptide. Es wird deutlich, dass die Signale der Präzipitate generell dieselbe Migrationsgeschwindigkeit aufweisen wie ihre jeweiligen Kontrollen. Das bestätigt wiederum, dass S2-Zellen in der Lage sind, das Konstrukt korrekt zu prozessieren, also die N-terminale TRH-Prä-Pro-Sequenz vor der Sekretion von A β ins Medium zu entfernen. Im Präzipitat nach Expression von mTRH-A β 1-42 (Spur 1) kann das N-terminal intakte A β 1-42-Peptid nachgewiesen werden, wobei eine mögliche N-terminale Verkürzung des Peptids um zwei AS offensichtlich ausbleibt, wie der Vergleich

mit dem Kontrollpeptid A β 3-42 (Spur 5) zeigt, deren Signal im Bereich kürzerer Peptide zu sehen ist. Die Expression von A β 3-42 (Spur 4) zeigt im Vergleich zur Kontrolle mit rekombinanten A β 3-42-Peptid (Spur 5) ein Signal in derselben Größe, wobei eine Unterscheidung zur C-terminal um zwei AS verkürzten Kontrolle A β 3-40 (Spur 3) nicht möglich ist. Aufgrund der Daten von Bateman *et al.* (2001) sollte *Drosophila* über eine Glutaminylzyklase (QC) verfügen und nach den Daten von Schilling *et al.* (2004) könnte eine QC auch EC-Aktivität besitzen. Anhand des Ergebnisses für die Expression von A β 3-42 ist jedoch zu sehen, dass offenbar keine N-terminale Zyklisierung des freien Glutamats stattgefunden hat, denn im Vergleich zur pyroGlu-A β 3-42-Kontrolle (Spur 8) ist ein deutlicher Migrationsunterschied erkennbar. PyroGlu-A β -Bildung kann bei der Expression von A β 3-42(E3Q) angenommen werden (Spur 7). Hier haben das Signal des Präzipitats und das pyroGlu-A β -Signal der Kontrolle (Spur 8) dieselbe Größe, die sich deutlich zu denen von A β 3-42 (Spuren 4 und 5) unterscheidet. Jedoch ist auch hier keine Differenzierung zwischen den Varianten am C-Terminus möglich. Im Zusammenhang mit den ELISA-Ergebnissen (Abb. 3.3) ist dennoch festzuhalten, dass es sich um A β x-42 handelt, da der Primärantikörper im ELISA hochspezifisch A β 42 bindet.

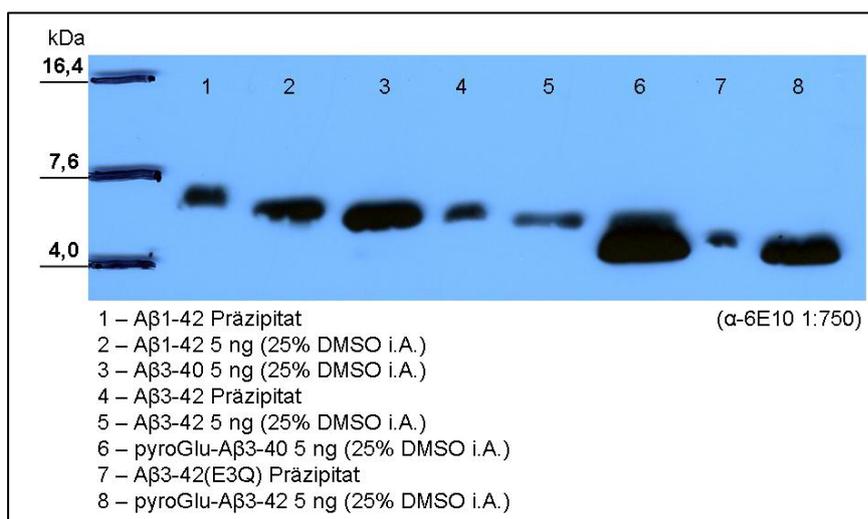


Abbildung 3.4 Western-Blot-Analyse von TRH-A β -Peptiden nach Immunpräzipitation der Zellkulturmedien stabil transfizierter S2 Zellen. Die Auftrennung der Peptide erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen (15%), die im Trenngel 8 M Harnstoff enthielten. Die Verwendung von Harnstoffgelen ist für die A β -Analyse beschrieben (Klafki *et al.* 1996).

Die ELISA-Ergebnisse und die Western-Blot-Ergebnisse der A β -exprimierenden S2-Zellen zeigen somit, dass die TRH- A β -Konstrukte exprimiert, korrekt prozessiert und sezerniert werden. Dies erlaubt die Verwendung dieser Konstrukte zur Herstellung transgener *Drosophila*-Linien, da davon ausgegangen werden kann, dass A β auch hier korrekt prozessiert und sekretiert werden kann.

Für die Herstellung transgener *Drosophila*-Linien wurden alle sechs o.g. Konstrukte in den Expressionsvektor pP[UAST] (Abbildung A1 im Anhang) kloniert. Der pP[UAST] Vektor enthält P-Element Repeats und *white* als Markergen. Bei der Transformation in *Drosophila* erfolgt der Einbau des Transgens Transposase-vermittelt ins Genom der Fliege. Die Transposase ist auf dem pTurbo-Plasmid kodiert und wird kotransformiert. Das Markergen erlaubt eine Selektion der transgenen Tiere über die Augenfarbe. Da die Transformation in die weißäugige *white*^{1118;iso1;iso2;iso3} (*w*^{iso}) Linie erfolgte, zeigen transgene Nachkommen in der F2 Generation einen rote-Augen-Phänotyp.

3.1.2 Herstellung transgener Linien

Die Keimbahntransformation mittels P-Element Insertion ist eine etablierte Methode zur Generierung transgener *Drosophila* Linien. Auf diese Weise konnten insgesamt 119 neue transgene Linien erzeugt und stabile Stämme aufgebaut werden. Diese verteilten sich auf die entsprechenden Konstrukte wie folgt: 20 Linien A β 1-40, 15 Linien A β 1-42, 20 Linien A β 3-40, 21 Linien A β 3-42, 19 Linien A β 3-40(E3Q) und 24 Linien A β 3-42(E3Q). Der Aufbau der stabilen Stämme sowie die genetische Charakterisierung der Linien hinsichtlich des Transgen-Insertionsortes erfolgten mit sogenannten Balancerlinien. Diese tragen Balancer-chromosomen, die aufgrund mehrfacher Inversionen ihre Fähigkeit zu rekombinieren verloren haben. Außerdem besitzen sie dominante Mutationen, die homozygot Letalität hervorrufen, womit das Auftreten solcher homozygoter Balancertiere ausgeschlossen wird. Wird also eine transgene Linie mit einer Balancerlinie gekreuzt, die das dem Insertionsort des Transgens entsprechende Balancerchromosom trägt, wird das Transgen stabil weitervererbt. Eine weitere

Eigenschaft von Balancerchromosomen sind bestimmte Markergene, über die das Balancerchromosom weiterverfolgt werden können und mit deren Hilfe sowohl der Insertionsort eines Transgens als auch die homozygote Lebensfähigkeit der transgenen Linie bestimmt werden kann. Mit dieser Methode wurden die für die vorliegende Arbeit hergestellten transgenen Linien hinsichtlich ihres Transgen-Insertionsortes charakterisiert. Hierzu wurden die selektierten transgenen Männchen mit Weibchen der Balancerlinien $w^{1118};iso1;SM6/Sco;iso3$ bzw. $w^{1118};iso1;iso2;TM2/TM6$ gekreuzt. Nach Selbstung der Nachkommen konnte in der F2-Generation auf das Insertionschromosom geschlossen werden. Die Linien wurden nach den ursprünglichen Initialen der Autorin und mit fortlaufender Nummerierung benannt (CS1-CS119). In Tabelle A3 (Anhang) sind die Bezeichnungen der einzelnen transgenen Linien, das inserierte Konstrukt sowie die Insertionsorte aufgeführt. Für jedes Konstrukt konnten mehrere transgene Linien mit verschiedenen Transgen-Insertionsorten auf unterschiedlichen Chromosomen hergestellt werden.

Die Vielzahl der Stämme für jedes einzelne Konstrukt stellt ein breites Spektrum der Verteilung des Transgens über das Genom dar. Dies ermöglicht eine große Auswahl einzelner Linien, da davon auszugehen ist, dass nicht alle Insertionsorte gleichermaßen transkriptionsaktiv sind. Es konnten somit aus vielen transgenen Linien diejenigen selektiert werden, die das Transgen stark exprimieren.

3.2 GAL4-UAS kontrollierte Expression des Transgens

Das GAL4-UAS Expressionssystem ermöglicht die kontrollierte Expression von Transgenen in *Drosophila* (Brand und Perrimon 1993). Es basiert auf der gewebespezifischen Expression von GAL4. Werden transgene, GAL4-exprimierende Fliegen mit Fliegen gekreuzt, deren Transgen an einen UAS-Promotor gekoppelt ist, so wird in der F1 Generation das Transgen spezifisch in den Geweben exprimiert, in denen GAL4 exprimiert wird. Es sind beispielsweise Linien verfügbar, deren GAL4 Transgen vom Actin-Promotor aktiviert wird, also

eine ubiquitäre UAS-Transgen Expression ermöglicht. Aufgrund der Transgen-Induktion durch GAL4 werden diese Linien als Treiberlinien bezeichnet.

In einem ersten Expressionsversuch wurde für jedes transformierte Konstrukt eine transgene Linie ausgewählt und mit der Treiberlinie actin-GAL4 gekreuzt. Für das Transgen A β 1-40 wurde Linie CS97, für A β 1-42 Linie CS31, für A β 3-40 Linie CS67, für A β 3-42 Linie CS5, für A β 3-40(E3Q) Linie CS81 und für A β 3-42(E3Q) Linie CS55 ausgewählt. Die Auswahl der Linien erfolgte aufgrund der Lokalisation des Transgens auf dem zweiten Chromosom. Nach der Kreuzung mit der actin-GAL4 Linie (actinGAL4/SM6), deren Transgen ebenfalls auf dem zweiten Chromosom lokalisiert und mit dem Balancerchromosom SM6 stabilisiert ist, war die Selektion der positiven (actinGAL4/A β x-40 bzw. actinGAL4/A β x-42) und negativen (A β /SM6) Tiere in der F1-Generation unproblematisch. Die A β /SM6-Tiere wurden als Negativkontrolle ebenfalls ausgewertet, da hier keine Induktion durch GAL4 erfolgte und lediglich eine geringe Basisaktivität des Promotors zu erwarten gewesen ist. Eine weitere Negativkontrolle stellte die ursprünglich für die Transformation verwendete Linie w^{iso} dar.

Die transheterozygoten Tiere der F1 Generation wurden im Alter von 20 Tagen selektiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und (in Zusammenarbeit mit der probiodrug AG) mittels ELISA auf die Expression von A β getestet. Die Träger gekoppelten Antikörper des ELISAs sind spezifisch für das Epitop A β 35-40 (für die A β x-40 Linien) bzw. für A β 38-42 (für die A β x-42 Linien). Die Detektionsantikörper sind spezifisch für das Epitop A β 11-28 (für alle Linien) bzw. für N3pE (zum Nachweis der pyroGlu-Bildung) und sind mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, Tetramethylbenzidin (TMB) diente als Chromogen. Die Intensität des Signals ist proportional zur Konzentration von A β . Alle Antikörper sind monoklonal. Die hier verwendeten ELISA-Kits sind für Hirnextrakte, CSF, Plasma, Serum und Zellkulturmedium validiert.

Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis des ELISAs. Da der Aufschluss der Fliegen in vier Schritten erfolgt (sequenzieller Aufschluss), wurden alle vier Fraktionen auf ihren A β -Gehalt getestet. Die Fraktionen gliedern sich auf in TBS-, Triton-, SDS- und Formiat-Fraktion. Damit wird eine schrittweise A β -Anreicherung

3. Ergebnisse

herbeigeführt. Unlösliches A β wird in der SDS- oder in der Formiat-Fraktion erwartet (Kawarabayashi *et al.* 2001). Da es sich hierbei um einen initialen Versuch handelte wurde keine statistische Fehlerbetrachtung durchgeführt.

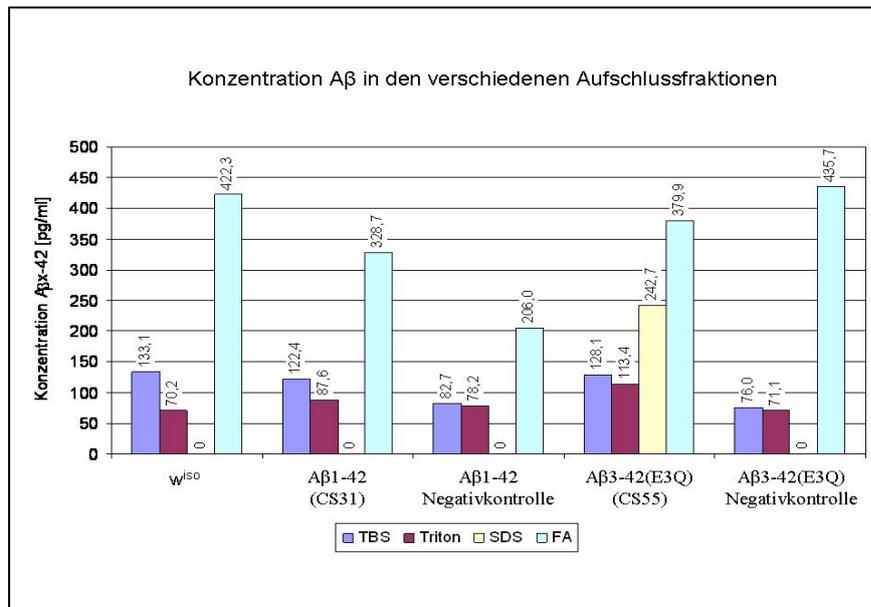


Abbildung 3.5 Konzentration von A β x-42 (pg/ml) in 20 Tage alten transheterozygoten Fliegen (+/+;actinGAL4/A β x-42;+/+) in der TBS-, Triton-, SDS- und Formiat-Fraktion (FA) nach sequenzieller Extraktion. A β wird in der SDS Fraktion angereichert, Signale in allen anderen Fraktionen bedeuten Hintergrund. A β 1-42 (CS31) und A β 3-42(E3Q) (CS55) bezeichnen das jeweilige Transgen und die Stammbezeichnung, als Negativkontrolle wurden die transgenen Linien ohne GAL4 Treiber, bzw. die Linie w^{iso} verwendet.

Der ELISA zeigt für die TBS- und die Triton-Fraktion in allen Proben Signale, auch in den Negativkontrollen, deren Intensität sich nicht deutlich unterscheidet. Deshalb ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um Hintergrundsignale handelt. Die SDS-Fraktion ist die mutmaßlich interessante Fraktion, denn A β ist hier ausschließlich in der A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Linie CS55 nachweisbar. In der uninduzierten Kontrolle und auch in der w^{iso}-Linie ist kein Signal zu detektieren, weshalb dieses Ergebnis positiv gewertet werden kann. In der A β 1-42-exprimierenden Linie CS31 ist kein A β Signal messbar gewesen. Das kann auf eine höhere Löslichkeit, bzw. Abbau, des Peptides hinweisen, bevor es zu unlöslichen Oligopeptiden aggregiert. Schließlich zeigten sich in der Formiat-

Fraktion wieder starke Hintergrundsignale, die in allen Proben messbar waren. Aufgrund des A β -Nachweises in der SDS-Fraktion kann davon ausgegangen werden, dass das Interesse zukünftig dieser Fraktion gehören darf. Die Löslichkeit von A β Peptiden in SDS wird auch in der Literatur bestätigt (Kawarabayashi *et al.* 2001, Iijama *et al.* 2004, McGowan *et al.* 2005). Trotz des Nachweises von A β in der SDS Fraktion erscheint die Konzentration sehr gering. Dennoch konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass TRH-A β x-42-Konstrukte in transgenen *Drosophila*-Linien exprimiert werden können. In weiteren Versuchen wurde deshalb nach stärker exprimierenden Linien gesucht, sowohl hinsichtlich der GAL4- als auch der Transgen-Expression.

Die Ergebnisse der ELISAs für die transgenen Tiere, die die Konstrukte A β x-40 tragen, sind nicht dargestellt. Hier konnte kein A β nachgewiesen werden. Aufgrund der offenbar geringeren Tendenz von A β x-40 zur Aggregation und der primären Rolle von A β x-42 bei der AD wurden diese Linien in der vorliegenden Arbeit nicht weiter genutzt.

In einem zweiten ELISA, der spezifisch für den N-Terminus N3pE ist, wurde die pyroGlu-Bildung in den transgenen A β x-42 exprimierenden Linien gemessen (Abbildung 3.6). Aufgrund des freien N-terminalen Glutamins des A β 3-42(E3Q)-Konstruktes und der Fähigkeit der Glutaminylzyklase, Glutamin zu zyklisieren, wurde in diesem Versuch ein Nachweis der pyroGlu Bildung erwartet. Dies setzt eine erfolgreiche Prozessierung des N-Terminus durch die Signalpeptidase und die Prohormon-Konvertase voraus und zeigt somit zusätzlich an, ob das gewählte Konstrukt in der Fliege zum angestrebten Peptid generiert wird, wie es zuvor in S2-Zellen gezeigt werden konnte. Wie im vorangegangenen ELISA wurden auch hier in allen Proben Hintergrundsignale in der TBS-, der Triton- und der Formiat-Fraktion detektiert. Eine pyroGlu-A β -Bildung in der A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Linie CS55 konnte in der SDS-Fraktion nachgewiesen werden. In keiner anderen Linie war pyroGlu-A β zu detektieren.

3. Ergebnisse

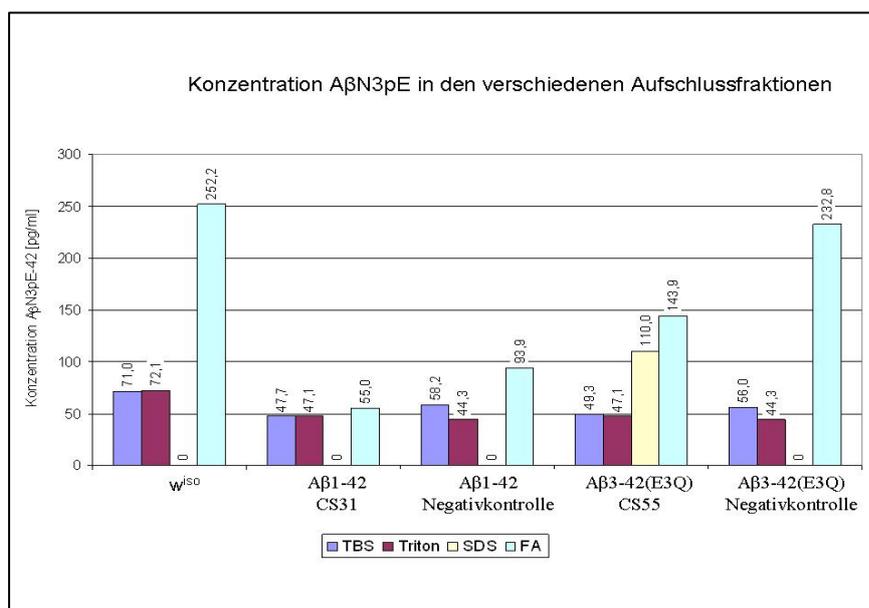


Abbildung 3.6 Konzentration von AβN3pE-42 (pg/ml) in 20 Tage alten transheterozygoten Fliegen (+/+;actinGAL4/Aβx-42;+/+) in der TBS-, Triton-, SDS- und Formiat-Fraktion nach sequenzieller Extraktion. Aβ wird in der SDS Fraktion angereichert, Signale in allen anderen Fraktionen bedeuten Hintergrund. Aβ1-42 (CS31) und Aβ3-42(E3Q) (CS55) bezeichnen das jeweilige Transgen und die Stammbezeichnung, als Negativkontrolle wurden die transgenen Linien ohne GAL4 Treiber, bzw. die Linie w¹¹¹⁸ verwendet.

Nachdem im vorangegangenen ELISA in der Linie CS31 (Aβ1-42) Aβ nicht messbar war, war das ausbleibende pyroGlu-Signal in dieser Linie erwartungsgemäß. Auch hier bestätigte sich wieder die Notwendigkeit, stärker exprimierende Linien zu suchen, da durch unspezifische Kreuzreaktivitäten in den TBS-, Triton- und Formiat-Fractionen das Hintergrundsignal sehr stark und eine Quantifizierung daher nicht verlässlich war. Jedoch konnte durch diesen ELISA die Spezifität für die SDS-Fraktion nachgewiesen werden und bestätigt somit das Ergebnis des vorangegangenen ELISAs.

Dieses Resultat gibt zum ersten Mal den Hinweis auf eine pyroGlu-Aβ-Bildung in transgenen *Drosophila* Linien. Offensichtlich werden in *Drosophila* zumindest freie N-terminale Glutaminyl-Reste zyklisiert.

Nachdem die Anreicherung von Aβx-42 und pyroGlu-Aβ in den SDS-Fractionen nachgewiesen worden ist, wurde eine Erhöhung der Aβ-Generierung fokussiert.

3.3 Auswahl der geeigneten Treiberlinie

Es ist zu erwarten, dass nicht alle verfügbaren Treiberlinien im gleichen Maße GAL4 exprimieren, was nachfolgend zu Unterschieden in der GAL4-abhängigen Transgenexpression führt. Darüberhinaus ist eine nervenzellspezifische Transgenexpression in neurobiologischen Untersuchungen sinnvoll. Dazu werden Treiberlinien genutzt, deren GAL4-Gen vom *Elav*-Promotor aus transkribiert wird. *Elav* ist ein neuronales Gen, welches an der Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems beteiligt ist und daher vom frühen Embryo bis zum Lebensende der adulten Fliege exprimiert wird (www.flybase.org). Es wurden unterschiedliche Linien verwendet, die GAL4 unter dem *Elav*-Promotor in allen Zellen des Nervensystems in allen Entwicklungsstadien und in adulten Fliegen exprimieren. Die Linien elavGAL4 458, elavGAL4 5144, elavGAL4 5145, elavGAL4 5146, elavGAL4 5147, elavGAL4 6920 und elavGAL4 6923 waren verfügbar. Zusätzlich zu diesen sieben elavGAL4 Linien wurden drei weitere GAL4-exprimierende Linien verwendet. Die actinGAL4-Linie exprimiert GAL4 unter dem *actin*-Promotor konstitutiv in allen Zellen. Die GFP-Translok.-Linie verfügt genomweit über mehrere GAL4-Wiederholungen, die über einen HSP-Minimalpromotor getrieben werden und besitzt selbst GFP-gekoppelte UAS Motive. Somit ist die GAL4 Expression auch über die GFP-Fluoreszenz nachweisbar. Die HSP70-GAL4 Linie exprimiert GAL4 nach einem 30 minütigen Hitzeschock bei 37°C.

Um eine geeignete, also sehr gut GAL4-exprimierende Treiberlinie auszuwählen, wurden unabhängige Kreuzungen mit den zehn verschiedenen Treiberlinien und den drei transgenen Linien CS31 (A β 1-42), CS5 (A β 3-42) und CS55 (A β 3-42(E3Q)) angesetzt. Insgesamt wurden 30 Kreuzungen durchgeführt.

Die transheterozygoten, A β -exprimierenden Tiere der F1 Generation wurden im Alter von 30 Tagen wiederum zur ELISA-Analyse in Zusammenarbeit mit der probiodrug AG aufgeschlossen. In Abbildung 3.7 ist das Ergebnis dargestellt. Als Negativkontrollen wurden die w^{iso}-Linie sowie die uninduzierten transgenen Linien CS31, CS5 und CS55 verwendet.

3. Ergebnisse

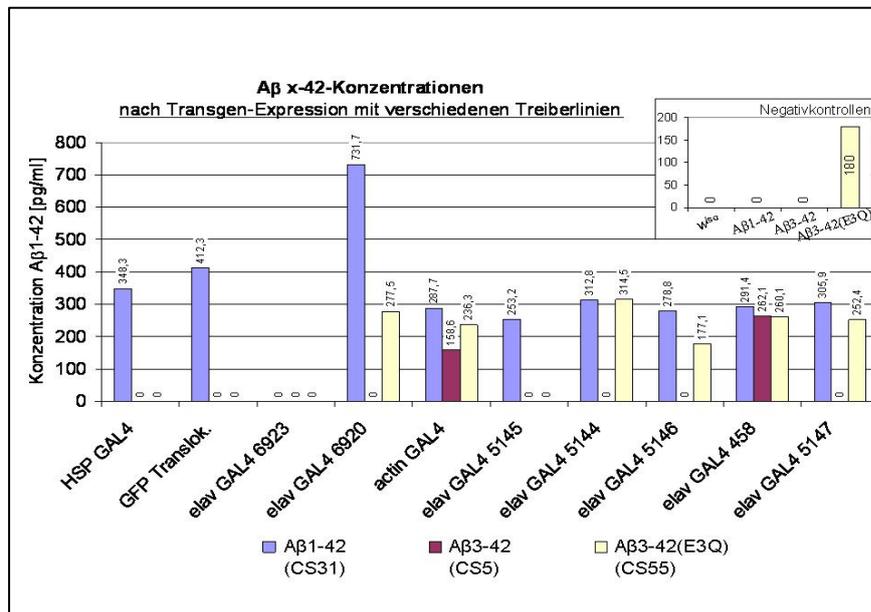


Abbildung 3.7 Konzentration von Aβx-42 (pg/ml) in der SDS-Fraktion nach Aufschluss von 30 Tage alten transheterozygoten Fliegen (GAL4/Aβx-42) mit verschiedenen Treiberlinien. Rechts oben sind die jeweiligen uninduzierten Negativkontrollen und die w¹¹¹⁸-Negativkontrolle abgebildet.

Aufgrund der Erkenntnisse des vorangegangenen ELISAs sind hier ausschließlich die SDS-Fractionen dargestellt. Aβ1-42 (Linie CS31) konnte mit allen Treiberlinien gebildet werden, mit Ausnahme der Linie elavGAL4 6923. Die Negativkontrolle zeigt ebenfalls kein Signal für Aβ1-42. Aβ3-42(E3Q) (Linie CS55) konnte in sechs der zehn Proben nachgewiesen werden. Die Expression ist messbar in Verbindung mit den Treiberlinien elavGAL4 6920, actinGAL4, elavGAL4 5144, elavGAL4 5146, elavGAL4 458 und elavGAL4 5147. In allen anderen getesteten Aβ3-42(E3Q)-transgenen Fliegen konnte keine Aβ Bildung nachgewiesen werden. Allerdings wurde in der Kontrollprobe für Aβ3-42(E3Q) Aβ gemessen. Das kann auf eine GAL4-unabhängige, basale Expression des Transgens hinweisen. Aβ3-42 (Linie CS5) ist ausschließlich in den Tieren nachweisbar, deren Transgen mit dem actin- oder mit dem elavGAL4 458-Treiber induziert wird. Die Linien actinGAL4 und elavGAL4 458 sind somit die einzigen Treiberlinien, mit denen eine Transgenexpression in allen drei Aβ-transgenen Linien nachweisbar war.

Aufgrund dieser Daten ergibt sich die Verwendung der beiden Linien actinGAL4 und elavGAL 458 für die folgende Selektion der verschiedenen A β -exprimierenden transgenen Linien.

3.4 Auswahl der geeigneten transgenen Linie

Aufgrund der unterschiedlichen Insertionsorte des Transgens in den unterschiedlichen etablierten transgenen Linien ist davon auszugehen, dass das Transgen in jeder Linie unterschiedlich stark exprimiert werden kann. Um den Unterschied zu verdeutlichen und um gut exprimierende Linien zu selektieren, wurden für jedes Konstrukt fünf Linien ausgewählt und mit den im vorangegangenen Experiment qualifizierten Treiberlinien elavGAL4 458 und actinGAL4 gekreuzt. Die Auswahl der transgenen Linien erfolgte nach der Augenfarbe. Hierbei wird davon ausgegangen, dass der Transgen-Insertionsort über die Expression des gesamten Transgens, also auch des Markergens entscheidet. Deshalb wurden Linien ausgewählt, die tiefrote Augen zeigen, deren *white*-Gen also stark exprimiert wird und mutmaßlich mit ihm auch A β . Für das Transgen A β 1-42 wurden die Linien CS26 (Transgeninsertion auf Chromosom 3), CS27 (Transgeninsertion auf Chromosom 2), CS34 (Transgeninsertion auf Chromosom 3), CS35 (Transgeninsertion auf Chromosom 2) und CS36 (Transgeninsertion auf Chromosom 3) ausgewählt. Als A β 3-42-exprimierende Linien wurden Kreuzungen von CS6 (Transgeninsertion auf Chromosom 3), CS12 (Transgeninsertion auf Chromosom 3), CS14 (Transgeninsertion auf Chromosom 2), CS15 (Transgeninsertion auf Chromosom 2) und CS16 (Transgeninsertion auf Chromosom 3) angesetzt. Die Linien CS40 (Transgeninsertion auf Chromosom 2), CS42 (Transgeninsertion auf Chromosom x), CS48 (Transgeninsertion auf Chromosom 3), CS58 (Transgeninsertion auf Chromosom 3) und CS59 (Transgeninsertion auf Chromosom 3) wurden als A β 3-42(E3Q)-exprimierende Linien verwendet. Insgesamt sind 30 verschiedene Kreuzungen durchgeführt worden.

3. Ergebnisse

Die transheterozygoten Tiere der F1-Generation wurden für 40 Tage gehalten und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefrostet. Da GAL4 in den elavGAL4-Linien ausschließlich im Nervensystem gebildet wird, ist eine A β Expression in den elavGAL4/A β x-42 transheterozygoten Fliegen auch nur dort zu erwarten. Aus diesem Grund, und um gleichzeitig die A β -Bildung im Gehirn nachzuweisen, wurden von diesen Tieren allein die Köpfe analysiert. Die actinGAL4/A β x-42-Tiere wurden komplett aufgeschossen. Die Untersuchung der A β -Bildung in verschiedenen Linien ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Diese Untersuchung ist in Zusammenarbeit mit der probiodrug AG durchgeführt worden.

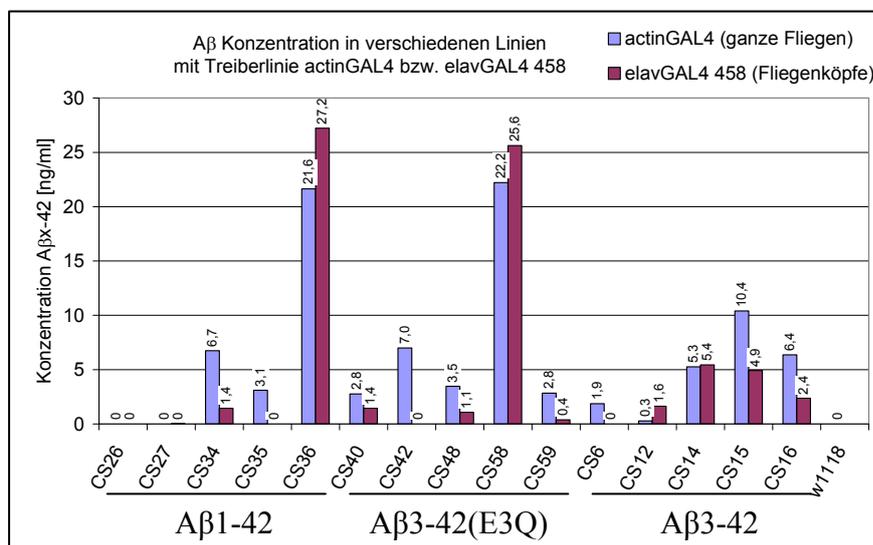


Abbildung 3.8 Konzentration von A β x-42 (ng/ml) in der SDS-Fraktion nach Aufschluss von 40 Tage alten transheterozygoten Fliegen verschiedener transgener Linien mit actin-GAL4 und elav-GAL4 458 als Treiberlinien. CS26/27/34/35/36 exprimieren A β 1-42; CS40/42/48/58/59 exprimieren A β 3-42(E3Q); CS6/12/14/15/16 exprimieren A β 3-42. w1118 (w^{iso}) ist die Negativkontrolle.

A β 1-42 ist lediglich in den Linien CS34 und CS36 mit beiden Treibern nachweisbar. Hierbei war CS36 die am stärksten exprimierende Linie. In Linie CS35 war eine A β -Expression nur mit dem actinGAL4 Treiber nachweisbar. In den Linien CS26 und CS27 war kein Signal zu detektieren, weder mit dem elav- noch mit dem actinGAL4 Treiber. A β 3-42(E3Q) war in allen getesteten Linien nachweisbar, sowohl mit dem elav- als auch mit dem actinGAL4 Treiber, außer in

Linie CS42. Hier war nur nach Induktion mit actinGAL4 A β -Expression nachweisbar. Die am stärksten exprimierende Linie war Linie CS58. Hier konnten Konzentrationen von über 20 ng/ml gemessen werden. A β 3-42 war in allen fünf getesteten Linien nachweisbar, sowohl mit dem elav- als auch mit dem actinGAL4 Treiber, außer in Linie CS6. Hier war nur nach Induktion durch actinGAL4 A β -Expression nachweisbar. Die am besten exprimierende Linie war hier Linie CS15, welche eine A β -Konzentration von 10 ng/ml aufwies (actinGAL4 getrieben). Die w^{iso} Negativkontrolle zeigte erwartungsgemäß kein Signal.

Diese Daten veranschaulichen die unterschiedlichen Expressionsstärken in den verschiedenen transgenen Linien und die Bedeutung der Auswahl der geeigneten Treiberlinie für eine ausreichende A β Expression. Außerdem zeigen sie, dass bei der Transgen-Expression mit Hilfe der elavGAL4 Linie ähnlich hohe A β -Konzentrationen in Fliegenköpfen erzielt werden können wie in kompletten Fliegen mit dem actin-GAL4 Treiber. Offensichtlich ist der Insertionsort hier von größerer Bedeutung.

In einem weiteren ELISA wurde die pyroGlu-Bildung der ausgewählten Linien untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass pyroGlu-A β 3-42 sowohl in den A β 1-42-exprimierenden Linien CS26, CS27, CS34, CS35 und CS36 als auch in den A β 3-42-exprimierenden Linien CS6, CS12, CS14, CS15 und CS16 nicht nachweisbar war. Dieser Befund sagt jedoch nicht aus, dass eine pyroGlu-Bildung in den transgenen Fliegenlinien mit den betroffenen Konstrukten nicht grundsätzlich möglich wäre, denn es wurden für diesen Versuch lediglich jeweils fünf Linien pro Transgen ausgewählt. PyroGlu-A β konnte in den A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Linien CS40, CS42, CS48, CS58 und CS59 sowohl mit dem elavGAL4- als auch mit dem actinGAL4-Treiber nachgewiesen werden. Hier zeigte Linie CS58 den höchsten pyroGlu-A β -Gehalt, und zwar 14 ng/ml in den elavGAL4-getriebenen Tieren und 4 ng/ml mit dem actinGAL4-Treiber. Die Linien CS40, CS42, CS48 und CS59 zeigen einen pyroGlu-A β -Gehalt von 2 ng/ml oder weniger, sowohl mit dem elavGAL4- als auch mit dem actinGAL4-Treiber.

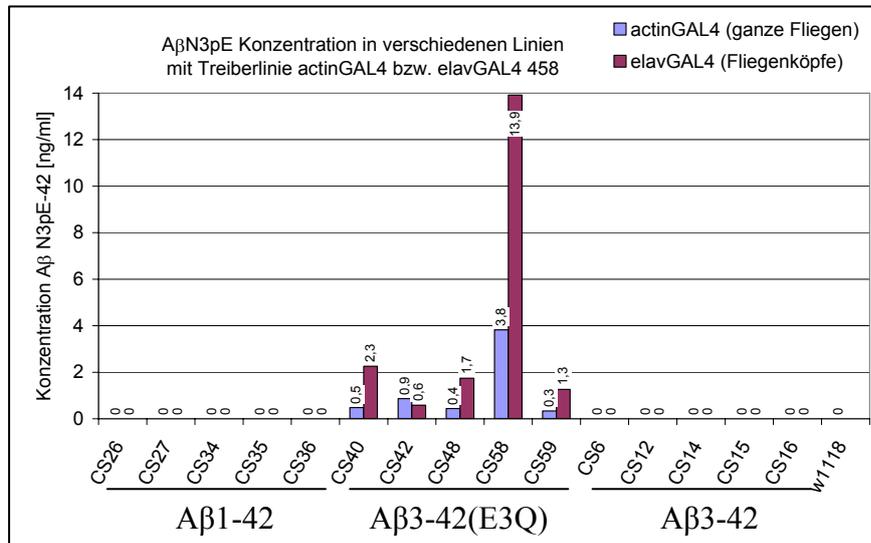


Abbildung 3.9 Konzentration von AβN3pE-42 (pg/ml) in 40 Tage alten transheterozygoten Fliegen verschiedener transgener Linien. Actin-GAL4 und elav-GAL4 458 fungierten als Treiberlinien. CS26/27/34/35/36 exprimieren Aβ1-42; CS40/42/48/58/59 exprimieren Aβ3-42(E3Q); CS6/12/14/15/16 exprimieren Aβ3-42. w1118 (*w^{iso}*) ist die Negativkontrolle. Dargestellt sind die Aβ-Konzentrationen in der jeweiligen SDS-Fraktion.

Diese Ergebnisse belegen zum einen die Unterschiede in der pyroGlu-Bildung zwischen den einzelnen transgenen Aβ3-42(E3Q)-exprimierenden Linien. Zum anderen zeigen sie aber auch, dass die Bildung von pyroGlu aus Aβ3-42 noch in keiner der darauf untersuchten Fliegenlinien nachgewiesen werden konnte. Aufgrund dessen ist eine Untersuchung der Glutaminylylase aus *Drosophila* angestrebt worden (siehe Kapitel 3.10 ff). Weiterhin erlauben diese Ergebnisse die Verwendung der Aβ3-42(E3Q)-exprimierenden Linie CS58 für erste Untersuchungen mit einem QC-Inhibitor.

3.5 Der Einfluss des QC-Inhibitors P150/03 auf die pyroGlu-Bildung der Linie CS58

Die Bildung von pyroGlu-Aβ3-42 in der Aβ3-42(E3Q)-exprimierenden Linie CS58 konnte bereits nachgewiesen werden (Abb.3.9). Diese Linie zeigte außerdem die höchste Aβx-42 Konzentration und diente daher für erste

Untersuchungen mit dem QC-Inhibitor P150/03. P150/03 ist ein QC-Inhibitor *in vitro* (Buchholz *et al.* 2006) und wurde erfolgreich an Zellkulturen (Cynis *et al.* 2006) und Mäusen (Schilling, pers. Mitteilung) getestet. Entwickelt wurde P150/03 für die humane QC, es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch *Drosophila* QCs gehemmt werden können (vgl. Tab. 4.1 [Diskussion]). Der Einfluss des Inhibitors auf die pyroGlu-A β -Bildung in *Drosophila* sollte anhand der Linie CS58 nachgewiesen werden. Bei der Berechnung der Dosis für *Drosophila* wurde zugrunde gelegt, dass eine Fliege ein Körpergewicht von 1 mg hat und 1 mg Nahrung pro Tag verwertet. Bei einer Endkonzentration von 1 mM P150/03 im Medium nimmt eine Fliege somit 0,34 μ g des Inhibitors pro Tag auf, bei einer Endkonzentration von 10 mM entsprechend 3,4 μ g und bei 100 mM 34 μ g. Neben einer Negativkontrolle, die nur das Lösungsmittel PBS enthielt und somit ein Placebo war, wurden zunächst drei verschiedene Konzentrationen von P150/03 ausgewählt, die sich um je eine Zehnerpotenz voneinander unterschieden. Die niedrigste applizierte Dosis lag bei 1 mM Endkonzentration im Medium, die mittlere Dosis entsprechend bei 10 mM und die höchste Dosis bei 100 mM. Die untersuchten Tiere waren Fliegen der F1 Generation aus der Kreuzung ♀ elav-GAL4 458/elav-GAL4 458;+/+/+ x ♂ +/y;+/+/+;CS58/TM3 mit dem Genotyp elavGAL4+/+/+/+;CS58/+. Sie wurden vom ersten Larvenstadium an bis zum Schlüpfen und während der gesamten Alterungsphase mit P150/03 behandelt. Adulte Fliegen wurden im Alter von 10, 20 bzw. 40 Tagen gesammelt. Ausgehend von einer Entwicklungsdauer bis zum Schlüpfen der Fliegen von zehn Tagen ergibt sich eine Behandlungsdauer von 20, 30 bzw. 50 Tagen.

Die adulten Fliegen wurden im entsprechenden Alter selektiert und gezählt (vgl. Tab. A4 [Anhang]). Bereits zu Beginn des Experiments zeigte sich, dass die höchste verwendete Dosis von 100 mM offenbar toxisch ist, denn die behandelten Larven starben am Tag nach der Applikation und es konnten somit keine Fliegen schlüpfen. Bei der Gruppe, die mit der mittleren Dosis von 10 mM P150/03 behandelt wurde, konnten keine transgenen Tiere gefunden werden, die dem gewünschten Genotyp GAL4+/+/+/+;CS58/+ entsprachen. Die Fliegen, die überlebten, exprimierten zwar GAL4, aber nicht das Transgen A β 3-42(E3Q).

Offensichtlich liegt hier entweder eine unspezifische Toxizität von P150/03 in Zusammenhang mit A β oder eine höhere Toleranz gegenüber P150/03 durch GAL4 vor. A β -exprimierende Fliegen konnten jedoch in den beiden Gruppen identifiziert werden, die mit der niedrigen Dosis P150/03 oder nur mit PBS behandelt wurden, wobei auch bei der Behandlung der Tiere mit 1 mM des Inhibitors eine toxische Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann. Zwar nahm in beiden Fällen die Anzahl der überlebenden Tiere mit zunehmendem Alter ab, jedoch bestand auch ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. So war die Anzahl der Kontrolltiere stets höher als die der gleichaltrigen behandelten Tiere. Es konnten 139 PBS-behandelte und 116 P150/03-behandelte Fliegen nach 10 Tagen selektiert werden. Nach 20 Tagen sank die Anzahl auf 109 PBS- und 81 Inhibitor-behandelte Tiere. Von den 40 Tage alten Fliegen konnten lediglich 82 PBS- und 31 P150/03-behandelte Tiere isoliert werden. Die Fliegen wurden ausschließlich beim Erreichen ihres Zielalters gezählt, nicht beim Schlüpfen. Alle Tiere wurden schockgefroren und anschließend dekaptiert.

Die geernteten Köpfe wurden wie zuvor beschrieben mittels ELISA untersucht. Um die einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden die Werte auf 100 Köpfe normiert. Der Gesamt-A β -Konzentration lag für jede Gruppe 5-fach-Bestimmung zugrunde. Zur statistischen Absicherung wurde im Anschluss ein t-Test durchgeführt. Das Ergebnis des ELISAs ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Zehn Tage alte Fliegen zeigten bereits eine starke A β -Akkumulation von 18 ng/ml. Es war zu diesem Zeitpunkt kein Einfluss des Inhibitors auf die Gesamt-A β -Menge nachweisbar. Bei den 20 Tage alten Tieren konnte ein Anstieg der A β -Konzentration auf 24 ng/ml gemessen werden, wenn sie nicht mit P150/03 behandelt wurden. Im Gegensatz dazu stagnierte die A β -Konzentration in behandelten Tieren. Der Effekt war noch offensichtlicher in 40 Tage alten Fliegen. Hier stagnierte zwar die A β -Konzentration in der Kontrollgruppe gegenüber den 20 Tage alten Fliegen. Jedoch war in den Inhibitor-behandelten Tieren eine deutlich geringere A β -Aggregation sowohl gegenüber den 20- als auch den 10-Tage alten Tieren nachweisbar. Dieser Unterschied in der Anreicherung von A β , der sowohl in den 20 als auch in den 40 Tage alten

3. Ergebnisse

Fliegenköpfen zu beobachten war, ist signifikant und offensichtlich auf die Applikation von P150/03 zurückzuführen. Dieses Ergebnis zeigt außerdem, dass bereits eine Konzentration von 1 mM ausreichend ist, um einen langfristigen Effekt auf die A β Ablagerung auszuüben.

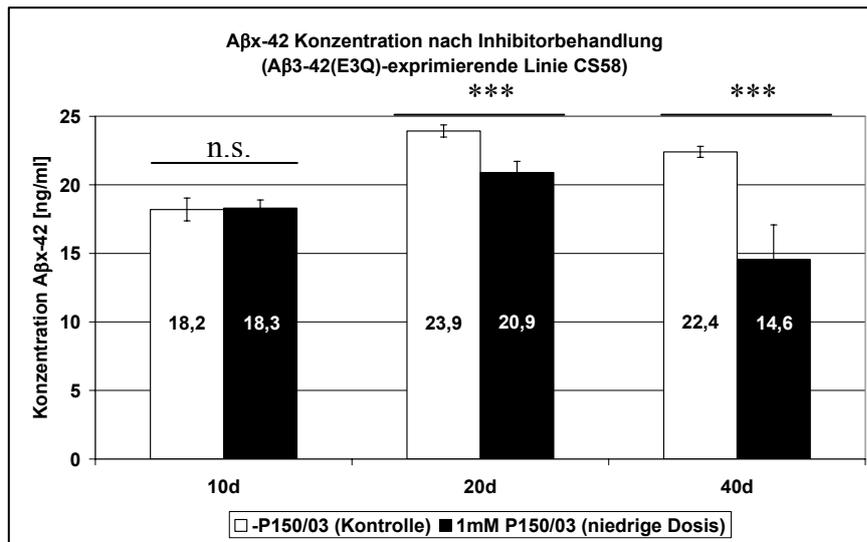


Abbildung 3.10 Konzentration von A β 3-42(E3Q) (pg/ml) in 10, 20 und 40 Tage alten transheterozygoten Fliegen vom Genotyp GAL4/+;+;/+;CS58/+ nach der Behandlung mit 1mM P150/03 (niedrige Dosis) oder PBS (Kontrolle). Dargestellt sind die A β -Konzentrationen in der jeweiligen SDS-Fraktion nach Fünffachmessung, die Standardabweichung sowie die Signifikanz nach t-Test.

In Abbildung 3.11 ist die Konzentration von A β N3pE in den Köpfen der 10, 20 oder 40 Tage alten adulten Fliegen dargestellt, die mit 1 mM P150/03 oder mit PBS als Kontrolle behandelt worden sind. Auch hier wurde die Anzahl der Köpfe auf 100 normiert und eine Fünffachmessung mit anschließendem t-Test durchgeführt. Eine hohe Konzentration an A β N3pE war in den unbehandelten Tieren bereits nach 10 Tagen festzustellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass das gesamte A β als pyroGluA β vorliegt (vgl. Abbildung 3.9). In dieser Altersgruppe zeigt sich jedoch bereits ein Einfluss von P150/03 auf die pyroGlu-Bildung. Die Konzentration von A β N3pE war in den behandelten Tieren mit 14 ng/ml signifikant geringer als in den unbehandelten Tieren. Analog zur Gesamt-A β -Konzentration zeigte sich auch in der A β N3pE-Konzentration in den 20 und

3. Ergebnisse

40 Tage alten Tieren ein Anstieg bzw. dann die Stagnation bei den Kontrollfliegen. Die behandelten, 20 Tage alten Fliegen zeigten im Vergleich zu den 10 Tage alten einen leichten Anstieg in der pyroGluA β -Bildung, aber im Vergleich zur Gesamt-A β -Konzentration ist noch keine vollständige Zyklisierung erkennbar. Dies ist erst in der Altersgruppe der 40 Tage alten Fliegen zu beobachten. Hier entspricht die Konzentration von A β N3pE der von Gesamt-A β . Es ist also anzunehmen, dass die Applikation von P150/03 eine Verzögerung der pyroGlu-Bildung bewirkt, da in jeder der drei Altersgruppen die Konzentration von pyroGlu-A β bei den P150/03-behandelten Tieren signifikant geringer war als bei den unbehandelten Kontrolltieren.

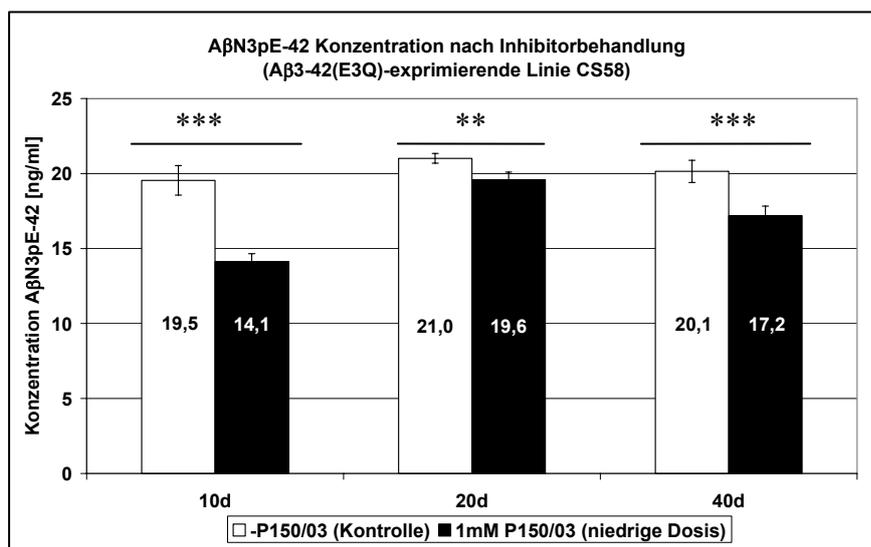


Abbildung 3.11 Konzentration von A β N3pE-42 (pg/ml) in 10, 20 und 40 Tage alten transheterozygoten Fliegen vom Genotyp GAL4/+;+/+;CS58/+ nach der Behandlung mit 1mM P150/03 (niedrige Dosis) oder PBS (Kontrolle). Dargestellt sind die A β -Konzentrationen in der jeweiligen SDS-Fraktion nach Fünffachmessung, die Standardabweichung sowie die Signifikanz nach t-Test.

Die Behandlung der Fliegen mit P150/03 zeigte demnach in diesem Experiment zweierlei Wirkung. Einerseits wurde frühzeitig die pyroGlu-Bildung gehemmt, andererseits war eine geringe A β -Aggregation im höheren Alter messbar. Dies würde die Hypothese stützen, dass pyroGlu-A β weniger gut löslich ist und stärker zur Aggregation neigt als nicht-modifiziertes A β .

3.6 Die Toxizität von P150/03

Die Wirkungsweise von P150/03 als QC-Inhibitor wurde zuerst bioinformatisch anhand von chemischen Eigenschaften ermittelt (probiobdrug AG). Anschließend folgte eine *in vitro* Charakterisierung, bei der der Einfluss dieses putativen Inhibitors auf die Enzymaktivität rekombinanter QC gemessen wurde. Studien an Zellkulturen (Cynis *et al.* 2006) und an Mäusen (Schilling pers. Mitteilung) bestätigten die Funktion von P150/03. Die Toxizität der Verbindung bei Applikation an Mäusen wurde zwar für die initiale Festlegung der Dosis herangezogen, erlaubt jedoch keine Vorhersagen über die Toleranz von *Drosophila melanogaster* gegenüber dieser Substanz. Im zuvor beschriebenen Experiment wurde eine Unverträglichkeit transgener Fliegen gegenüber P150/03 bei Konzentrationen über beobachtet. Daher wurde in einem Toxizitätstest an w^{iso} -Fliegen eine Konzentrationsreihe angefertigt, um den Zusammenhang von Inhibitor-Konzentration und Vitalität der Fliegen aufzuklären. Um eine Aufnahme des Inhibitors bereits zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt der Tiere zu gewährleisten, wurde P150/03 ins Medium der sich entwickelnden Larven gegeben. In einem Parallelansatz wurden gleichaltrige, adulte Fliegen in Kohorten von 20 Tieren behandelt, um einen möglichen Einfluss von P150/03 in den Entwicklungsverlauf der Tiere auszuschließen. Als Kontrolle wurde wiederum PBS verwendet, das Lösungsmittel für P150/03. Larven sowie adulte Fliegen wurden über einen Zeitraum von 20 Tagen täglich begutachtet und deren Vitalität bewertet. Da es sich bei diesem Versuch um eine Einschätzung der Verträglichkeit von P150/03 für *Drosophila* handelte und nicht um die genaue Bestimmung der letalen Dosis LD_{50} , wurde von einer statistischen Auswertung abgesehen. Die Beobachtungen ergaben, dass eine Konzentration von 1 mM sowohl für Larven als auch für adulte Fliegen gut verträglich war, was bereits im oben beschriebenen Inhibitorexperiment gezeigt wurde. Ab einer Konzentration von 2 mM zeigten die Larven bereits erste Anzeichen von Beeinträchtigung in ihrer Entwicklung, hier starben einige, während die adulten Tiere normal erschienen. Eine Behandlung mit 4 mM P150/03 bewirkte eine verzögerte

Larvenentwicklung und eine hohe Puppensterblichkeit. Es konnten nur wenige Fliegen schlüpfen. Die adulten Fliegen legten zwar Eier, die Larven starben jedoch im ersten Larvenstadium ab. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Gruppe der mit 8 mM Inhibitor behandelten Tiere. Hier zeigten die Larven allerdings eine stärkere Reaktion, die meisten starben im dritten Larvenstadium, nur wenige erlangten das Puppenstadium und keine Fliege konnte schlüpfen. Ab einer Konzentration von 10 mM starben bereits die ersten adulten Fliegen, die überlebenden Tiere legten nur noch wenige Eier. Selbst die Larven konnten sich nicht mehr über das dritte Larvenstadium hinaus entwickeln und starben im zweiten oder dritten Stadium, bei 20 mM spätestens im Zweiten. Hier überlebten auch nur wenige Adulte, die meisten starben. Ab einer Konzentration von 40 mM konnten weder Larven noch adulte Fliegen überleben, diese Konzentration war also hochtoxisch. Aus diesem Versuch ergab sich das weitere Behandlungsmuster. Als niedrige Dosis sollte zukünftig 1mM verwendet werden, weil hier keinerlei Beeinträchtigungen der Tiere zu erkennen waren, aber trotzdem ein Effekt auf die A β Anreicherung messbar war. Als hohe Dosis sollten 3 mM verwendet werden, weil dies eine Konzentration darstellte, die offensichtlich von den Larven ohne größere Beeinträchtigung noch toleriert wurde.

3.7 Der Einfluss des QC-Inhibitors P150/03 auf die pyroGlu-Bildung der Linien CS36 und CS58

Um die Ergebnisse des ersten Inhibitorexperiments (3.5 Der Einfluss des QC-Inhibitors P150/03 auf die pyroGlu-Bildung der Linie CS58) zu bestätigen, und die Abhängigkeit der A β -Konzentration von der P150/03-Dosierung zu untersuchen, wurde der Behandlungsversuch wiederholt. Als niedrige Dosis wurde wieder 1 mM eingesetzt, als hohe Dosis die aus dem Toxizitätsversuch resultierende Konzentration von 3 mM. Außerdem wurde neben der A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Linie CS58 die A β 1-42-exprimierende Linie CS36 einbezogen. Diese Linie qualifizierte sich im Versuch „3.4 Auswahl der geeigneten transgenen Linien“ als die am stärksten A β 1-42 exprimierende Linie.

Männchen der Linie CS36 bzw. CS58 sind mit Weibchen der Linie elavGAL4 458 gekreuzt worden. Die transheterozygoten Nachkommen wurden mit P150/03 bzw. PBS behandelt. Im Alter von 10, 20 und 40 Tagen wurden die Fliegen selektiert und dekaptiert. Die Anzahl der geernteten Köpfe ist im Anhang (Tab. A5) aufgeführt. Wie im vorangegangenen Versuch konnte auch hier wieder eine Abhängigkeit der Kopfzahl sowohl vom Alter als auch von der Konzentration des Inhibitors beobachtet werden. Dazu wurde ein Diagramm erstellt, welches diese Beobachtungen veranschaulicht (Abbildung 3.12). Berechnet wurden hier die Überlebensraten der einzelnen Behandlungsgruppen. Das heißt, die Tiere wurden nach dem Schlüpfen und vor dem Köpfen gezählt. Daraus wurde berechnet, wieviel Prozent der ursprünglich geschlüpften Tiere in einem bestimmten Alter und nach einer bestimmten P150/03-Behandlung überlebten. Für die A β 1-42 exprimierenden Tiere (CS36, Abb. 3.12 Links) konnte eine Beeinträchtigung der mit 3 mM P150/03 behandelten Tiere bereits bei den 8-15 Tage alten Weibchen beobachtet werden. Hier überlebten 75%, während die behandelten- und die Kontrollmännchen zu 92-95% überlebten. Der Einfluss des Alters auf das Überleben der Weibchen wird in älteren Tieren noch deutlicher. Es überlebten 33-43% der Weibchen gegenüber 61-70% der Männchen im Alter von 16-22 und 23-29 Tagen, und zwar unabhängig von der Behandlung mit P150/03. Das heißt, die Behandlung adulter Fliegen mit 3 mM P150/03 hat offensichtlich keinen Einfluss auf deren Lebenserwartung. Ein ähnliches Bild zeigte sich in den A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Fliegen (CS58, Abb. 3.12 rechts). Auch hier konnte ein Einfluss des Alters auf die Lebenserwartung der Weibchen festgestellt werden. Bei den 8-15 Tage alten Fliegen lag die Überlebensrate für beide Geschlechter noch bei 93-98%. Die 16-22 und 23-29 Tage alten Weibchen überlebten zu 72-79%, während gleichaltrige Männchen Überlebenschancen von 84-100% hatten. Insgesamt war die Beeinträchtigung der Weibchen der Linie CS58 jedoch geringer als in der Linie CS36. Diese Untersuchung ist genauer als die absoluten Zahlen, da hier anhand der tatsächlich geschlüpften Tiere der Einfluss von Alter und Inhibitor gezeigt werden konnte. Darüberhinaus wurde bei der Auswertung der Zahlen der geschlüpften Fliegen deutlich, dass P150/03-behandelte Tiere bereits in ihrer

3. Ergebnisse

Entwicklung beeinträchtigt wurden. So schlüpfen von vornherein zwei Drittel weniger behandelte als unbehandelte Fliegen, was sich auch in den absoluten Zahlen nach der Alterung beim Dekaptieren widerspiegelt.

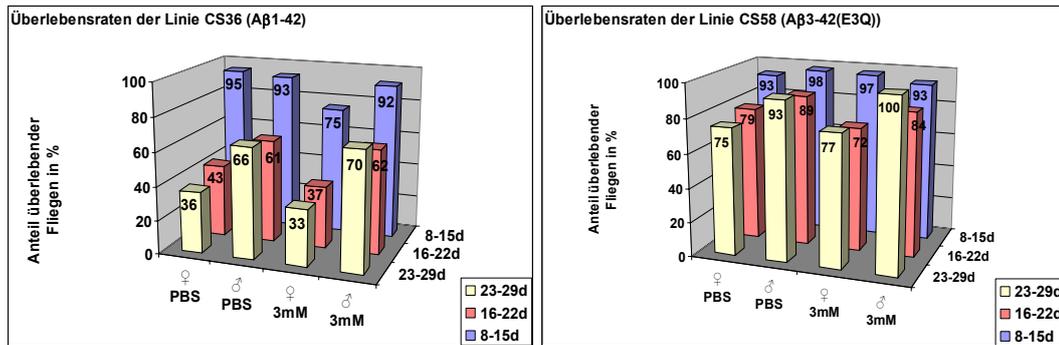


Abbildung 3.12 Prozentsatz überlebender Männchen und Weibchen vom Genotyp GAL4+/;CS36+/;+/+ (links) bzw. GAL4+/;+/+;CS58/+ (rechts) nach 8-15-, 16-22- bzw. 23-29 Tagen Behandlung mit PBS (Kontrolle) bzw. 3 mM P150/03.

Die gesammelten Köpfe wurden aufgeschossen und die Konzentrationen sowohl von Gesamt-Aβ als auch von pyroGlu-Aβ mit Hilfe eines ELISAs (probiobdrug AG) bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.13 bis 3.15 dargestellt. Die Aβ-Konzentrationen wurden auf 100 Fliegenköpfe normiert. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Messungen.

In Abbildung 3.13 sind die Aβx-42-Konzentrationen der Linie CS36 dargestellt. Die unbehandelten Kontrollfliegen zeigten nach 8-15 Tagen eine Aβ-Konzentration von 21 ng/ml, nach 16-22 Tagen von 11 ng/ml und nach 23-29 Tagen von 16 ng/ml. Offensichtlich akkumuliert Aβ hier nicht über den Zeitraum. Bei den mit 3 mM P150/03-behandelten Fliegen fiel die Aβ-Konzentration zunächst von 13 ng/ml in den 8-15 Tage alten Fliegen auf 8 ng/ml in den 16-22 Tage alten und stagnierte bei diesem Wert auch in den 23-29 Tage alten Tieren. Nur für die 8-15 Tage alten Fliegen konnte eine signifikant niedrigere Aβ-Konzentration in den Köpfen der P150/03-behandelten gegenüber den unbehandelten gezeigt werden. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass die

3. Ergebnisse

Konzentration von A β 1-42 in unterschiedlichen Versuchsansätzen offensichtlich erheblichen Schwankungen unterliegt.

Eine pyroGlu-A β -Bildung konnte weder in den Kontrolltieren noch in den P150/03 behandelten Tieren nachgewiesen werden.

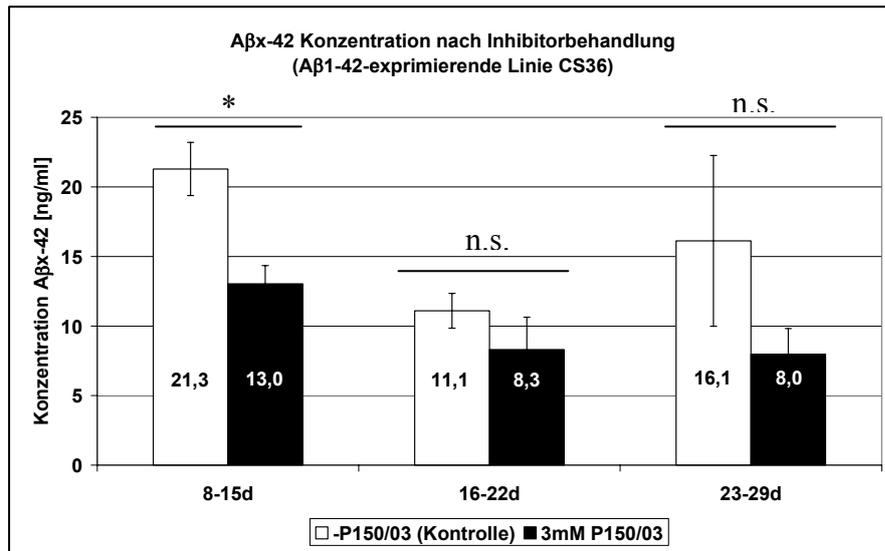


Abbildung 3.13 Konzentration von A β 1-42 (ng/ml) in 8-15, 16-22 und 23-29 Tage alten transheterozygoten Fliegen vom Genotyp GAL4/+;+/+;CS36/+ nach der Behandlung mit 3mM P150/03 oder PBS (Kontrolle). Dargestellt sind die A β -Konzentrationen in der jeweiligen SDS-Fraktion. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung nach dreifacher Messung. Der statistischen Bewertung liegt ein t-Test zugrunde.

In Abbildung 3.14 sind die A β -Konzentrationen in den SDS-Fractionen der A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Linie CS58 dargestellt. In den unbehandelten Tieren waren A β -Konzentrationen von 4 ng/ml (8-15 Tage), 39 ng/ml (16-22 Tage) und 9 ng/ml (23-29 Tage) messbar. Diese enormen Schwankungen verdeutlichen, dass innerhalb ein und desselben Versuchsansatzes erhebliche Unterschiede in der A β -Konzentration auftreten können. Die mit 3 mM P150/03 behandelten Fliegen zeigten A β -Konzentrationen von 8 ng/ml (8-15 Tage), 4 ng/ml (16-22 Tage) und 9 ng/ml (23-29 Tage). Hier war ein hoch signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Tieren in den 16-22 Tage alten Tieren zu erkennen. Die A β -Konzentration war in den mit 3 mM behandelten Fliegen 90% geringer als in der gleichaltrigen Vergleichsgruppe. Ein Einfluss von P150/03 auf die Gesamt-A β -

3. Ergebnisse

Konzentration zwischen den verschiedenen Altersstufen war nicht erkennbar. In der hier getesteten Linie CS58 lagen in allen Ansätzen, ausgenommen der 16-22 Tage alten Kontrolltiere, etwas geringere Gesamt-A β -Konzentrationen als im Vorläuferversuch vor, dort wurden Werte von 14-24 ng/ml gemessen.

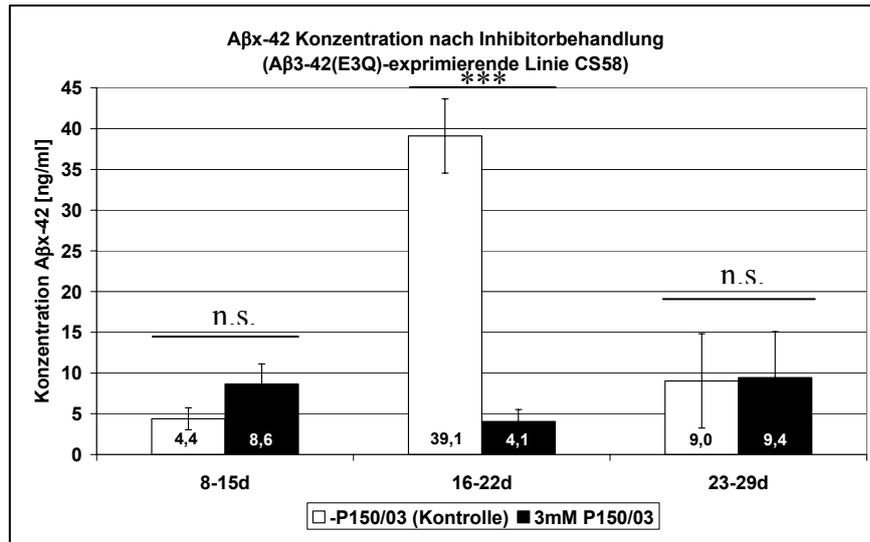


Abbildung 3.14 Konzentration von A β 3-42 (ng/ml) in 8-15, 16-22 und 23-29 Tage alten transheterozygoten Fliegen vom Genotyp GAL4/+;+/+;CS58/+ nach der Behandlung mit 3mM P150/03 oder PBS (Kontrolle). Dargestellt sind die A β -Konzentrationen in der jeweiligen SDS-Fraktion. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung nach dreifacher Messung. Der statistischen Bewertung liegt ein t-Test zugrunde.

Die pyroGlu-A β -Konzentrationen der Linie CS58 nach der Behandlung mit P150/03, bzw. in unbehandelten Tieren sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Es wurden in den 8-15-, 16-22- und 23-29 Tage alten unbehandelten Tieren jeweils eine fast konstante pyroGlu-A β -Konzentration von 3 ng/ml gemessen. Diese lag weit unter den Werten der Gesamt-A β -Konzentrationen derselben Tiere (Vgl. Abb. 3.13). Die mit 3 mM P150/03 behandelten Tiere zeigten pyroGlu-A β -Konzentrationen von 3 ng/ml (8-15 Tage) und 0,5 ng/ml sowohl in der Gruppe der 16-22- als auch der 23-29 Tage alten Tiere. Hier war die Standardabweichung allerdings so groß, dass davon ausgegangen werden kann, dass die Konzentration in den beiden Gruppen wohl zum Teil im Bereich der Nachweisgrenze des ELISAs lag. Die signifikante Reduktion der pyroGlu-A β -Konzentration in den mit 3 mM P150/03 behandelten Fliegen deutet auf einen Einfluss des Inhibitors hin.

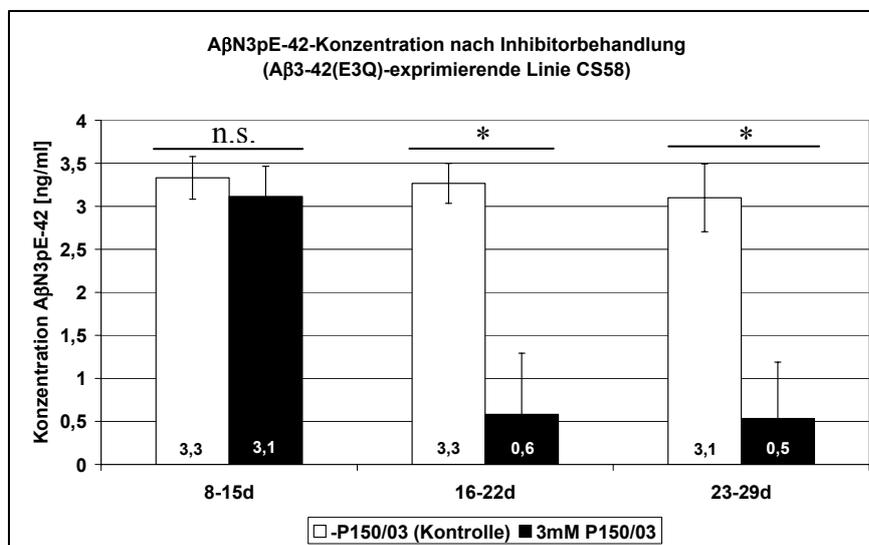


Abbildung 3.15 Konzentration von AβN3pE-42 (ng/ml) in 8-15, 16-22 und 23-29 Tage alten transheterozygoten Fliegen vom Genotyp GAL4/+;+/+;CS58/+ nach der Behandlung mit 3mM P150/03 oder PBS (Kontrolle). Dargestellt sind die Aβ-Konzentrationen in der jeweiligen SDS-Fraktion. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung nach dreifacher Messung. Der statistischen Bewertung liegt ein t-Test zugrunde.

Die beiden analog durchgeführten Inhibitor-Versuche zeigten zwar zum einen erhebliche Schwankungen in den Aβ-Konzentrationen, zum anderen aber weisen die Versuche auf einen Einfluss von P150/03 auf die pyroGlu-Aβ-Bildung hin.

3.8 Die Herstellung neuer transgener Fliegenlinien

Die im Verlauf der vorangegangenen Versuche erhaltenen Daten warfen die Frage auf, wieviel Aβ notwendig ist, um phänotypische Anzeichen einer Toxizität zu erhalten. Iijima *et al.* (2004) beschrieben zum Beispiel die reduzierte Lebenserwartung als ein Merkmal, das bei der Ablagerung von Aβ im Gehirn von Fliegen auftritt. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Menge Aβ, die von den in der vorliegenden Arbeit hergestellten und verwendeten Fliegen gebildet wird, für phänotypische Analysen und weiterführende Inhibitor-tests ausreichend ist. In der Literatur gibt es bisher keine Angaben zu Aβ-Konzentrationen, die notwendig sind, um phänotypische Merkmale auszuprägen.

Um den Pool A β exprimierender Fliegen zu vergrößern und eine große Auswahl Linien auch für spätere Inhibitor-Testreihen zur Verfügung zu haben, wurden weitere Konstrukte für neue transgene Linien hergestellt. Diese besitzen nicht mehr die Prä-Pro-Sequenz des MausTRH, sondern die *Drosophila* BiP-Signalsequenz. BiP ist ein Immunoglobulin bindendes Chaperon-Protein (Kirkpatrick *et al.* 1995). Die Signalsequenz von BiP leitet BiP in S2-Zellen effizient und in hohen Konzentrationen dem Endoplasmatischen Retikulum zu (Invitrogen). Die BiP-Signalsequenz (MKLCILLAVVAFVGLSLG) soll somit die mTRH-Prä-Pro-Sequenz ersetzen und A β in neuen transgenen Fliegenlinien dem sekretorischen Weg zuführen.

Obwohl das BiP-Expressionssystem für Schneider-Zellen etabliert ist, wurden die neuen A β -Konstrukte zunächst in S2-Zellen getestet. Es wurden stabile Zelllinien aufgebaut, die die Varianten BiP-A β 1-42, BiP-A β 3-42 und BiP-A β 3-42(E3Q) exprimierten. Nach einer Expressionszeit von 48 Stunden wurden die Zellmedien in Zusammenarbeit mit der probiodrug AG einem ELISA unterzogen. In Abbildung 3.16 sind die Konzentrationen von A β im Medium der einzelnen Zelllinien dargestellt. Alle BiP-A β transfizierten Zelllinien waren in der Lage A β zu exprimieren und zu sezernieren. Eine untransfizierte Wildtyp-Zelllinie wurde als Kontrolle mitgeführt (S2).

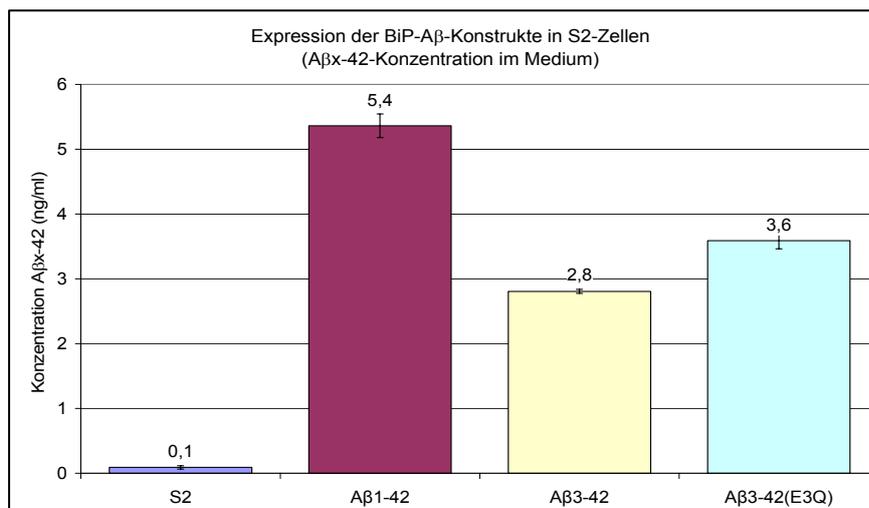


Abbildung 3.16 Konzentration von Aβ im Medium der BiP-Aβ exprimierenden Zelllinien und untransfizierter Zellen als Kontrolle. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung nach dreifacher Messung.

Aufgrund der erfolgreichen Expression der BiP-Aβ Konstrukte in S2-Zellen wurden diese in den Vektor pUAST umklontiert. Die nach der Keimbahn-Transformation erhaltenen transgenen Tiere wurden stabilisiert und Stämme aufgebaut. Wie auch im Fall der bereits bestehenden Linien exprimieren die neuen Linien GAL4-abhängig die Aβ Varianten Aβ1-42 (Linien NL1-NL9), Aβ3-42 (Linien NLE1-NLE5) bzw. Aβ3-42(E3Q) (Linien NLQ1-NLQ13). Die Transgen-Insertionsorte wurden mittels genetischer Analyse bestimmt. Die neuen transgenen Linien, deren Transgen sowie der bestimmte Insertionsort sind in Tabelle A3 im Anhang aufgeführt.

3.9 GAL4-UAS kontrollierte Expression des Transgens

Aufgrund der Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten wurde als GAL4-exprimierende Treiberlinie wiederum die Linie elavGAL4 458 verwendet. In unabhängigen Kreuzungen wurden elavGAL4 458-Weibchen mit Männchen aller neuen transgenen Linien (außer den Linien NLQ3 und NLQ12) gekreuzt. Die transheterozygoten Nachkommen ließ man altern. Die Fliegen wurden im Alter von 25 Tagen enthauptet und die Köpfe in einem ELISA in Zusammenarbeit mit der probiodrug AG hinsichtlich ihrer Konzentrationen an Gesamt-Aβ sowie

3. Ergebnisse

pyroGlu-A β untersucht. Abbildung 3.17 zeigt die Ergebnisse der beiden ELISAs zusammengefasst.

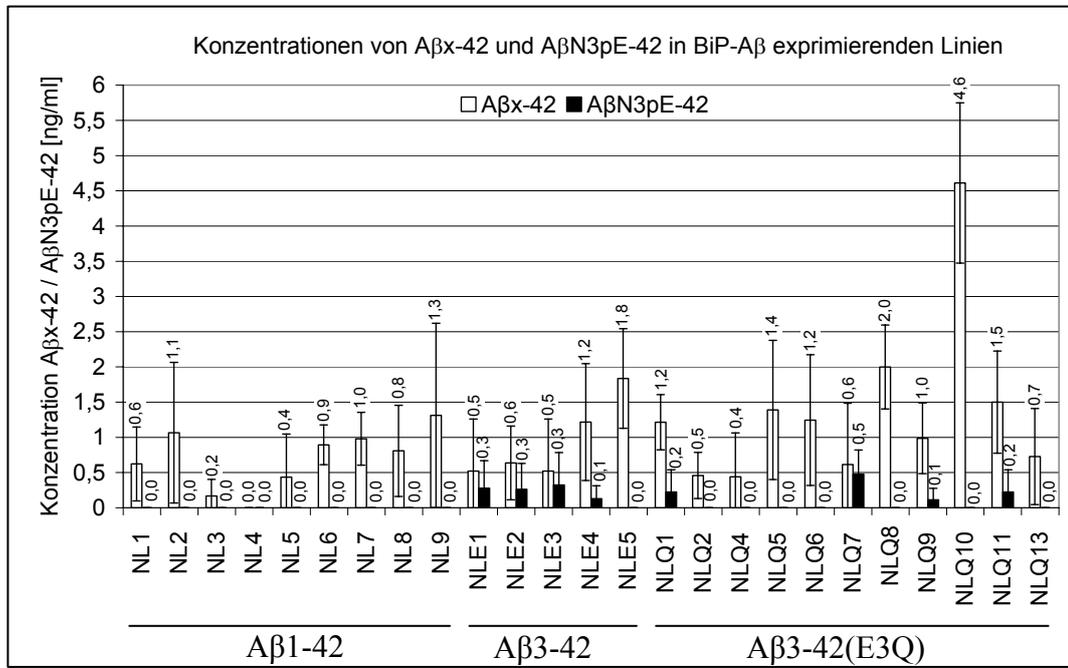


Abbildung 3.17 Konzentration von A β x-42 und A β N3pE-42 (pg/ml) in 25 Tage alten transheterozygoten Fliegen der BiP-A β exprimierenden Linien. Die Linien NL1-NL9 exprimieren A β 1-42, NLE1-NLE5 exprimieren A β 3-42 und NLQ1-NLQ13 exprimieren A β 3-42(E3Q). Dargestellt sind die A β -Konzentrationen in der jeweiligen SDS-Fraktion. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung nach dreifacher Messung.

Auffallend waren zunächst die generell geringen A β -Konzentrationen in allen Linien. Die A β 1-42 exprimierenden Linien NL1-NL9 zeigten Werte zwischen 170 pg/ml (Linie NL3) und 1300 pg/ml (Linie NL9). In Linie NL4 konnte kein A β detektiert werden. In keiner dieser Linien wurde pyroGlu-A β nachgewiesen. Die A β 3-42 exprimierenden Linien NLE1-NLE5 wiesen A β -Konzentrationen zwischen 0,5 ng/ml (NLE1 und NLE3) und 1,8 ng/ml (NLE5) auf. Mit Ausnahme von Linie NLE5 konnte hier in allen Linien pyroGlu-A β nachgewiesen werden, die Konzentrationen waren jedoch sehr gering und beliefen sich auf 0,13-0,32 ng/ml. Die A β -Konzentrationen in den A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Linien NLQ1-NLQ13 lagen zwischen 0,44 ng/ml (NLQ4) und 4,6 ng/ml (NLQ10). Das ist ein Unterschied um den Faktor zehn und zeigt wiederum die Transgen-Expressionsunterschiede in verschiedenen Linien. PyroGlu-A β konnte lediglich in

den Linien NLQ1, NLQ7, NLQ9 und NLQ11 nachgewiesen werden, deren Konzentrationen bei 0,11-0,48 ng/ml lagen. In allen anderen Linien konnte kein pyroGlu-A β gemessen werden. Die gemessenen A β -Konzentrationen unterschieden sich auffällig von den Linien, die die TRH-A β -Konstrukte exprimieren. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass ein entscheidender Faktor bei der Stärke der Transgenexpression neben dem Insertionsort und der Treiberlinie auch dem Konstrukt an sich zugeschrieben werden muss. Die hohen Standardabweichungen in allen gemessenen Proben beider ELISAs zeigen, dass die A β -Konzentrationen einiger Linien so gering sind, dass sie offensichtlich in der Nähe der Nachweisgrenze des ELISAs liegen. Eine weitere Verwendung der BiP-Linien wurde deshalb nicht empfehlenswert, bzw. erfordert eine weitere Optimierung (Testung der Treiberlinie usw.).

Obwohl in diesem Versuch erstmalig die Expression des BiP-A β -Konstruktes in *Drosophila* nachgewiesen werden konnte, wird die A β -Konzentration nicht ausreichend sein, um diese Linien für Inhibitorversuche zu verwenden. Auch die sporadisch auftretende pyroGlu-Bildung ist nicht nachvollziehbar. Möglicherweise liegt hier ein Fehler in der Prozessierung des Konstruktes vor und der gewünschte N-Terminus wird nicht generiert, sodass die QC die Bildung von pyroGlu-A β nicht katalysieren kann. Ein ähnliches Problem deutete sich bereits mit den transgenen Linien an, die das TRH-A β -Konstrukt exprimieren. Hier konnte zwar eine pyroGlu-A β -Bildung aus N-terminalen Glutaminylresten in den A β 3-42(E3Q)-Linien nachgewiesen werden, jedoch keine pyroGlu-A β -Bildung in den A β 3-42- oder A β 1-42-exprimierenden Linien. Eine Ursache für die unterbleibende Zyklisierung von A β 3-42 könnten Unterschiede in der Substratspezifität bzw. der Aktivität der Glutaminylzyklasen aus *Drosophila* und der humanen QC sein. Aufgrund dessen wurde im Folgenden die QC aus *Drosophila* isoliert und untersucht.

3.10 Glutaminylzyklasen in *Drosophila*

Die Glutaminylzyklase (QC) ist ein im Gehirn des Menschen reichlich vorkommendes Enzym, welches während der Reifung bioaktiver Neuropeptide wie dem Thyrotropin-Releasing-Hormon (TRH) und Neurotensin eine Rolle spielt (Busby *et al.* 1987, Bockers *et al.* 1995, Garavelli 2000). In einem posttranslationalen Prozess wird hier N-terminales Pyroglutamat (pyroGlu) aus Glutaminyl-Vorläufern gebildet (Schilling *et al.* 2004). Diese Erkenntnis führte zu der Vermutung, dass QCs eine wichtige Rolle bei der Entstehung des hochtoxischen pyroGlu-A β spielen.

Glutaminylzyklasen sind offenbar sowohl im Tierreich als auch im Pflanzenreich weit verbreitet. Es konnten orthologe Gene in *B. jararaca* (Schlange), *C. elegans* (Fadenwurm), *S. cerevisiae* (Hefe) und auch in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden (Bateman *et al.* 2001).

Die in den vorangegangenen Versuchen erzielten Ergebnisse zeigen die pyroGlu Bildung in den A β 3-42(E3Q) exprimierenden *Drosophila*-Linien. Nach den Daten von Schilling *et al.* (2004) sollen dafür Glutaminylzyklasen verantwortlich sein. Diese Enzyme sollen aber ebenso in der Lage sein, nicht nur freie Glutaminyl-, sondern auch freie Glutamyln-Termini zyklisieren zu können. Anhand der Daten der A β 3-42 exprimierenden Linien, die ein freies N-terminales Glutamat besitzen, ist dies jedoch nicht der Fall. Deshalb sollte das Vorkommen von Glutaminylzyklasen in *Drosophila* untersucht und diese charakterisiert werden. Auf der Basis der Sequenz der humanen QC wurde eine Datenbankanalyse des Genoms von *Drosophila melanogaster* durchgeführt (www.flybase.org). Danach existieren drei verschiedene putative Glutaminylzyklasen, die mit CG5976, CG6168 und CG32412 annotiert sind.

Bei der Analyse von CG6168, welches auf dem Chromosom 3L lokalisiert ist, stellte sich jedoch heraus, dass es eine intronlose Genstruktur mit verschiedenen Polymorphismen besitzt. Da bisher auch kein Transkript von CG6168 beschrieben worden ist, wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um ein Pseudogen handelt. CG6168 wurde aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Im

3. Ergebnisse

Gegensatz dazu liegen in der Datenbank Angaben zu den Transkripten von CG5976 und CG32412 vor. Die genomische Region und die Genstruktur von CG5976 und CG32412 sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

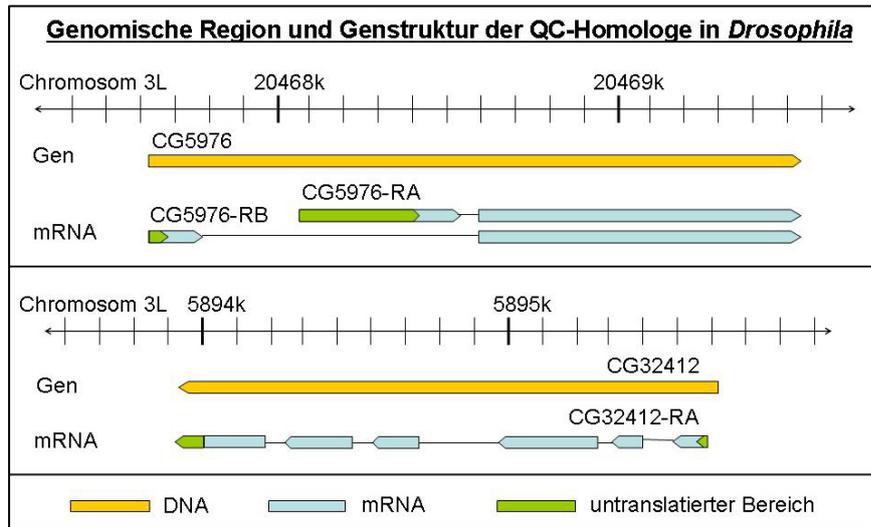


Abbildung 3.18 Genomische Region und Genstruktur der QC-Homologen CG5976 und CG32412 in *Drosophila*. (vereinfacht nach: www.flybase.org)

CG5976 ist auf dem linken Arm des 3. Chromosoms lokalisiert und kodiert vermutlich für zwei Isoformen eines Proteins, die aus verschiedenen mRNAs hervorgehen. Beim Vergleich beider Isoformen fallen Unterschiede in der Primärstruktur der N-Termini auf. Die Isoform CG5976A weist eine Signalsequenz für den kotranslationalen Transport des Proteins in den sekretorischen Weg auf, ähnlich der Signalsequenz der humanen QC. Im Gegensatz dazu besitzt die Isoform CG5976B ein Mitochondrium-Lokalisationssignal. Anhand verschiedener Analysen mit den Programmen TargetP und Mitoprot (Bendtsen *et al.* 2004; Claros und Vincens 1996) wurde hierfür eine Wahrscheinlichkeit von 79% bzw. 97% ermittelt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch eine Häufung positiv geladener Aminosäurereste am N-Terminus. Auf genomischer Ebene unterscheiden sich beide Isoformen durch zwei alternative erste Exone, die jeweils die Signalsequenz für das funktionelle zweite Exon kodieren. Die erwarteten Proteine haben eine Länge von 354 AS (CG5976A) bzw. 352 AS (CG5976B) und ähneln damit der Länge der humanen

QC (352 AS). Nach dem Abspalten der Signalsequenzen sind beide Isoformen nahezu identisch. Das bedeutet, dass CG5976 in der Lage ist sowohl intrazellulär als auch extrazellulär aktiv zu sein. Bisher liegen für keine der beiden Isoformen Daten vor, ausgenommen der Sequenzdaten.

CG32412 ist ebenfalls auf dem linken Arm des 3. Chromosoms lokalisiert und kodiert auf sechs Exonen für ein 340 AS langes Protein. Auch hier konnte eine Signalsequenz für den kotranslationalen Transport des Proteins in den sekretorischen Weg identifiziert werden, ähnlich der Signalsequenzen von CG5976A und der humanen QC. Nach Angaben der Expressionsdatenbank wird CG32412 im Gehirn adulter Fliegen gebildet.

Die Sequenzidentitäten von CG32412 und CG5976 zur humanen QC betragen 38% bzw. 41% (Abbildung 3.19). Die putativen *Drosophila* QC-Proteine untereinander sind zu 38% identisch, was funktionelle Unterschiede beider Proteine vermuten lässt. Zu den konservierten Aminosäuren gehören zwei Cysteinreste (C139 und C164), die zumindest in der humanen QC eine Disulfidbrücke ausbilden (Schilling *et al.* 2002). Weiterhin sind die komplexbildenden Aminosäuren D159, E202 und H330 konserviert. Diese komplexieren das Zink-Ion im aktiven Zentrum, welches für die Aktivität verantwortlich ist (Huang *et al.* 2005) und gleichzeitig die Bindungsstelle des Inhibitors darstellt (Schilling *et al.* 2005, Buchholz *et al.* 2006).

3. Ergebnisse

humanQC	MAGGRHRVVTLHLLLLV AALPWASRGVSPSASAWPEEKNYHQPAI LNSSALRQIAEGT
CG32412	--MAIGSVVFAAGLLLLLP-----PSHQQATAGNIGSQWR
CG5976A	--MLHRTARMWTL CVQTAL IATLV RGSTS QKDNLVGR TQISY NPS ELS EPRFLEYSN-L
CG5976B	-MRLLLRNYSLMEAVKRL LPRPKKIYNL GACFELVDIPKISY NPS ELS EPRFLEYSN-L
	* : . . . : :
humanQC	SISEMWNQDLQPLLIERYPGSPGSYAARQHIMQRIQLQADWVLEIDTFLSQTPIYG-YRS
CG32412	DDEVHFNRTLDSILVPRVVGSRGHQVREYLVQSLN--GLGFQTEVDEFKQRPVVFGBELT
CG5976A	SDKHLHREAI DKILIPRVVGT TNHSIVREYIVQSLR--DLDWVDEVNSFDHAPIKGLH
CG5976B	SDKHLHREAI DKILIPRVVGT TNHSIVREYIVQSLR--DLDWVDEVNSFDHAPIKGLH
 : : * : * * : . . . * : : : * : . . : * : * . : *
humanQC	FSNIISTLNPTAKRHLV LACHYDSKYF SHWNRRVFGATDSAVPCAMMLELARALDKKLL
CG32412	FANVVG TINPQAQNF LALACHYDSKYFP--NDPGFVGATDSAVPCA ILLNTAKTLGAYLQ
CG5976A	FHNI IATLNPNAERYLVLSCHYDSKYMP--GVEFLGATDSAVPCAMLLNLAQVLQEQLK
CG5976B	FHNI IATLNPNAERYLVLSCHYDSKYMP--GVEFLGATDSAVPCAMLLNLAQVLQEQLK
	* : : . * : * * : . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
humanQC	SLKTVSDSKPDL SLQLIFFDGE EAF LHWSPQDSLYGSRHLAAKMASTPHPPGARGTS-QL
CG32412	KEFR---NRSDVGLMLIFFDGE EAF KEWTDADSVYGSKHLAAKLASKRSGSQAQ LAPRNI
CG5976A	PLK----KSKLSMLLFFDGE EAF EEWGPKDSIYGARHLAKKWHHEG-----KL
CG5976B	PLK----KSKLSMLLFFDGE EAF EEWGPKDSIYGARHLAKKWHHEG-----KL
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
humanQC	HGMDDLVL LLDLIGAPNTPFPNFFNSARWFERLQAI EHELHELGLLKDHSLEG-----
CG32412	DRIEVLVLLDLIGARNPKFSSFYENTDGLHSSLVQIEKSLRTAGQLEGNN-----
CG5976A	DRIDMLVLLDLGAPDPAFYSFFENTESWYMRIQSVETRLAKQLLERYASSGVAQRDPT
CG5976B	DRIDMLVLLDLGAPDPAFYSFFENTESWYMRIQSVETRLAKQLLERYASSGVAQRDPT
	. : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
humanQC	RYFQNSYGG-VI QDDH I PFLRRGVPVLHLIPSPFPEVWHTMDDNEENLDESTIDNLNKI
CG32412	NMFLSRVSGG-LVDDHRPFLDENVPVLHLVATPFPDVWHTPRDNAANLHWPSIRNFNRV
CG5976A	RYFQSQAMRSSFIEDDH I PFLRRNVPILHLIPVPPPSVWHTPDDNASVIDYATTDNLALI
CG5976B	RYFQSQAMRSSFIEDDH I PFLRRNVPILHLIPVPPPSVWHTPDDNASVIDYATTDNLALI
	. * . . . : : * : * * . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
humanQC	LQVFVLEYLHL-----
CG32412	FRNFVYQYKRRHTSPVNLRFYRT
CG5976A	IRLFALEYLLAGTEAK-----
CG5976B	IRLFALEYLLAGTEAK-----
	: : * . : * *

Abbildung 3.19 Sequenzvergleich von humaner QC und deren homologer Proteine in *Drosophila melanogaster* mittels ClustalW (ch.EMBNet.org). Grau hinterlegt sind die Zink-Ionen-bindenden konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums. Die konservierten Cysteinreste in der Nähe des aktiven Zentrums bilden eine Disulfidbrücke und sind fett hervorgehoben. Die Sekretionssignale sind kursiv dargestellt und das Mitochondrien-Lokalisationssignal ist unterstrichen. CG32412 und CG5976 haben eine mit der humanen QC eine Sequenzidentität von 38% bzw. 41%.

Zur Expressionsanalyse von CG32412 und CG5976 wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde aus Embryonen und Larven sowie separat aus den Köpfen und Körpern von männlichen und weiblichen Fliegen mRNA isoliert und revers transkribiert. Das Ergebnis der anschließenden PCR ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Als Ladekontrolle wurde ein Amplifikat aus *rp49* verwendet, einem ubiquitär exprimierten ribosomalen Gen. Die Primer für die jeweiligen QC-Gene wurden so gewählt, dass sie in aufeinanderfolgenden Exonen binden konnten und somit eine Unterscheidung von cDNA und genomischer DNA, bei der durch ein Intron ein größeres Produkt entsteht, möglich war. Als Kontrolle wurde eine

3. Ergebnisse

Probe genomischer DNA mitgeführt, wodurch eine Verunreinigung der cDNA durch genomische DNA ausgeschlossen werden konnte.

Für CG5976A konnten das erwartete ca. 250 bp cDNA-Fragment und in der genomischen Kontrolle das erwartete ca. 300 bp genomische Fragment, nachgewiesen werden. In den Körpern der Fliegen wurde CG5976A erheblich besser exprimiert als in den Köpfen, wo lediglich eine schwache Expression erkennbar war. Auch CG5976B wurde im Körper gebildet, wie das ca. 240 bp cDNA-Fragment zeigt, im Gegensatz dazu war in den Köpfen nur eine schwache Bande erkennbar. Das erheblich größere Fragment von ca. 1 kb aus dem Kontrollansatz der genomischen DNA resultiert aus dem wesentlich größeren Intron (vgl. Abb. 3.18). Transkripte des Gens CG32412 konnten ebenfalls hauptsächlich im Torso nachgewiesen werden. In den Köpfen war lediglich eine geringe Transkriptmenge nachweisbar. Die Ladekontrolle rp49 zeigt hingegen gleiche RNA-Konzentrationen für Kopf, Körper und genomische DNA.

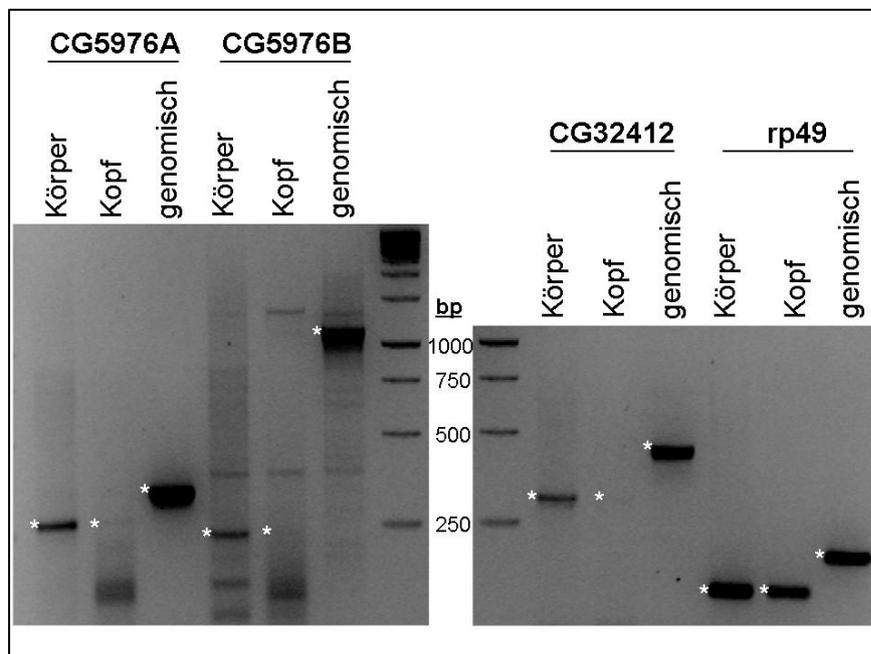


Abbildung 3.20 RT-PCR an Körper und Kopf von Fliegen. Getestet wurde die Expression der *Drosophila* QCs CG5976 (Isoformen A und B) und CG32412. rp49 ist die Ladekontrolle. Als Kontrollen wurde jeweils genomische DNA mitgeführt. Stern kennzeichnet die erwartete Bande.

Die geringe QC-Expression in den Köpfen der Fliegen könnte somit eine Ursache für die bisher nicht zu beobachtende pyroGlu-Bildung der A β 3-42-Peptide sein.

3.11 Homologe Expression von CG5976 und CG32412 in S2 Zellen

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation der Proteine wurden die cDNA-Klone der durch Datenbankanalysen identifizierten putativen Glutaminylzyklasen (QC) CG5976B und CG32412 in das Plasmid pMT/V5-HisB kloniert. Der Vektor pMT/V5-His besitzt einen Methallothionein-Promotor, somit erfolgt eine Transgenexpression erst durch Induktion mit Cu(II)SO₄. Für beide Gene wurden jeweils zwei Konstrukte hergestellt, die die entsprechenden cDNA entweder als natives Protein enthielten oder durch 6 Histidin-Reste C-terminal markiert waren. Die Expression erfolgte rekombinant in stabil transfizierten Schneider-Zellen (S2). 48 Stunden nach der Induktion mit Cu(II)SO₄ wurden die Zellen geerntet und das Medium mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, um His-fusionierte Proteine daraus zu extrahieren. Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Zellen und aufgereinigtes Medium aufgetrennt. Als Kontrollen dienten untransfizierte S2 Zellen sowie aufgereinigtes His-markiertes MausQC-Protein. In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse der Coomassie-Färbung und des Western-Blots dargestellt. Die Coomassie-Färbung (Abb. 3.21 oben) zeigte erwartungsgemäß unspezifisch alle in der Zelle vorkommenden Proteine in den Spuren 3, 5 und 7. Hier trat keine Bande hervor, die in den anderen Proben nicht erkennbar gewesen wäre. In den Spuren, die vorgereinigtes Medium enthielten (Spuren 2, 4 und 6), zeigte sich jeweils eine unspezifische Bande bei knapp 70kDa. Offensichtlich wurde hier mittels Ni-NTA-Agarose nicht nur rekombinantes Protein extrahiert, sondern auch ein anderes sich im Medium befindendes His-reiches Protein. Das könnte dem Kälberserum entstammen, welches dem S2-Zellkultur-Medium zugesetzt ist. Banden in der erwarteten Größe bei ca. 35kDa waren hingegen bei der MausQC (Spur 8) und im Medium der CG32412 exprimierenden Zellen (Spur 2) erkennbar. In allen anderen Proben war

3. Ergebnisse

mit der Coomassie-Färbung kein eindeutiges Signal für eine QC-Expression erkennbar.

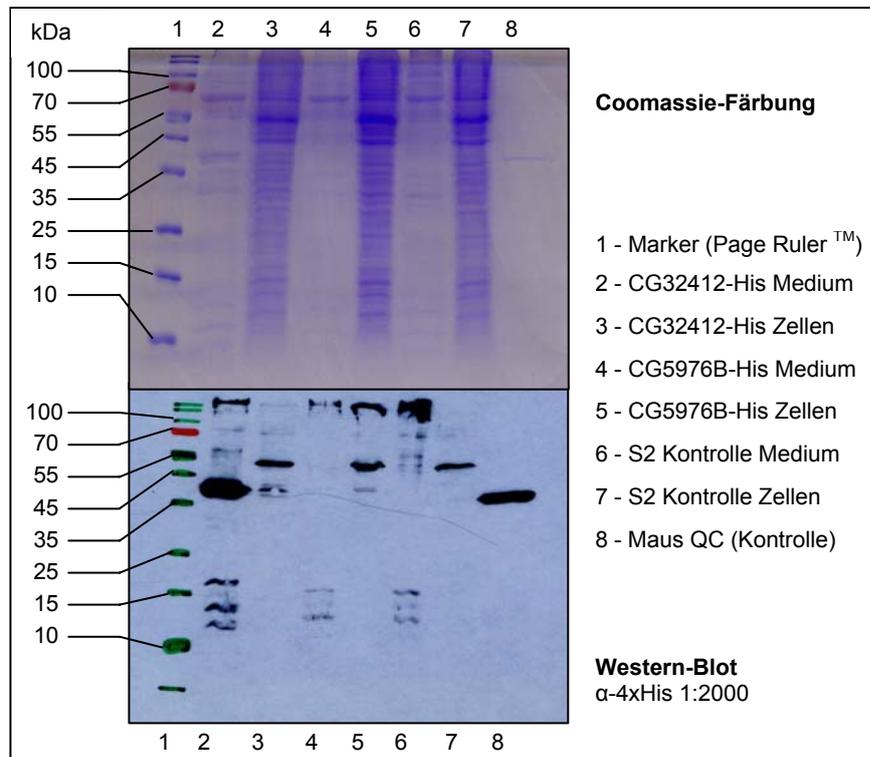


Abbildung 3.21 Expression von CG32412-His und CG5976B-His in S2 Zellen. Untransfizierte S2 Zellen dienten zur Negativkontrolle. MausQC wurde als aufgereinigtes Protein als Positivkontrolle mitgeführt. **oben** Coomassie-Färbung. **unten** Western Blot-Analyse mit α -4xHis 1:2000.

In einem anschließenden Western-Blot mit einem spezifischen anti-(His)₄ Antikörper (Abb. 3.21 unten) konnte die MausQC-Bande (Spur 8) als Positivkontrolle detektiert werden. Auch im Medium der CG32412 exprimierenden Zellen war ein starkes Signal bei der erwarteten Größe von ca. 35 kDa sichtbar (Spur 2), wie es sich in der Coomassie-Färbung bereits angedeutet hatte. In den Zellen war dieses Signal sehr schwach (Spur 4). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass CG32412 sekretiert wurde, wie es nach der Datenbankanalyse zu erwarten war. Die CG5976B-exprimierenden Zellen zeigten ein Signal im Zellextrakt (Spur 5), jedoch nicht im Medium (Spur 4). Daraus kann auf eine intrazelluläre Lokalisation von CG5976B geschlossen werden. In den

Negativkontrollen untransfizierter S2 Zellen konnte weder im Medium noch in den Zellen selbst ein Signal in entsprechender Größe detektiert werden.

Nachdem für das Genprodukt von CG32412 nachgewiesen wurde, wurden weitere Analysen zur intrazellulären Lokalisation von CG5976B durchgeführt. CG5976B besitzt laut Analyse der Datenbank Mitoprot (www.expasy.ch) eine Signalsequenz für den Transport in Mitochondrien. Zur Untersuchung der Lokalisation wurde nach der Expression eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Durch mehrere Zentrifugationsschritte konnte eine Auftrennung der lysierten Zellen in insgesamt fünf Fraktionen erfolgen. Dabei stellte die erste Fraktion wieder das Zellkulturmedium dar. Die zweite Fraktion (Zelltrümmer) enthielt die Zellkerne und intakte Zellen, die beim Homogenisieren nicht erfasst worden sind. In einer weiteren Fraktion, die aus dem Pellet durch Zentrifugation erhalten wurde, liegen die Mitochondrien angereichert vor (Membranfraktion 1). Die vierte Fraktion enthielt das Endoplasmatische Retikulum und die Plasmamembran (Membranfraktion 2). Der Überstand nach der letzten Zentrifugation stellt die lösliche Fraktion dar, in dem sich zytosolische Proteine befinden. Die Zellfraktionierung wurde mit CG5976B-His- und CG32412-His-exprimierenden sowie mit untransfizierten S2-Zellen durchgeführt und das rekombinante Protein mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 3.22, links). Als Positivkontrolle wurde die MausQC aufgetragen (35 kDa). Ein entsprechendes Signal war außerdem in der Membranfraktion 2 der CG5976B-exprimierenden Zellen nachweisbar (CG5976 Spur 3). Da hier die Mitochondrien angereichert vorliegen, darf davon ausgegangen werden, dass CG5976 in den Mitochondrien lokalisiert ist. In allen anderen Fraktionen konnte kein CG5976-Protein detektiert werden. Auch in der Zellfraktionierung der CG32412-exprimierenden und der untransfizierten Zellen wurde kein entsprechendes Signal gefunden.

Aufgrund der fehlenden Bande von CG32412 in der Medium-Fraktion wurden die Medien der drei Zelllinien mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und in einem Western-Blot gesondert untersucht (Abb. 3.22, rechts). Hier war CG32412 zu finden. Die entsprechende Bande besaß eine analoge Größe zur Kontrollbande der MausQC. Es war kein vergleichbares Signal im Medium der CG5976-

exprimierenden oder der untransfizierten S2-Zellen zu detektieren. Auch hier zeigten sich wieder die extrazelluläre Lokalisation von CG32412 und die Abwesenheit von CG5976 im Medium.

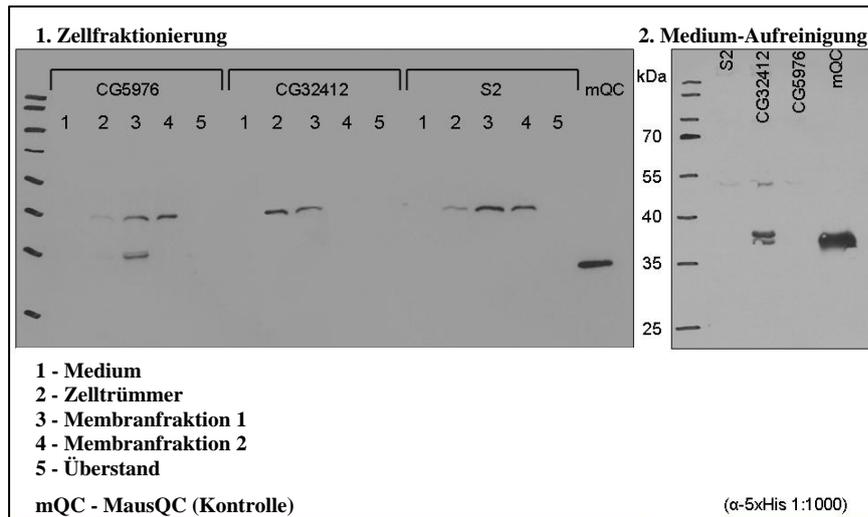


Abbildung 3.22 Western Blot-Analyse α -5xHis 1:1000 nach Zellfraktionierung der CG5976B- bzw. CG32412-exprimierenden S2-Zellen und untransfizierter S2-Zellen als Kontrolle. MausQC wurde als aufgereinigtes Protein als Kontrolle mitgeführt. **Links** Zellfraktionierung. **Rechts** Aufreinigung des Zellmediums.

In allen Zelllinien war in den Zelltrümmern und den beiden Membranfraktionen ein Signal von ca. 40 kDa zu detektieren. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein anderes, nicht näher charakterisiertes, stark exprimiertes, endogenes Protein der Schneider-Zellen, welches offenbar eine repetitive His-Folge besitzt. Das Signal steht offensichtlich nicht im Zusammenhang mit der Expression der QC cDNAs.

3.12 Immunzytologische Untersuchung

Um die Lokalisation von CG5976 in den Mitochondrien anhand einer weiteren Methode zu bestätigen, wurden immunzytologische Analysen durchgeführt. Aufgrund der Präsenz weiterer His-reicher Proteine in S2-Zellen, wie es die Western-Blot-Untersuchungen mit dem His-Antikörper vermuten lässt, wurde eine neue Zelllinie erzeugt. Hierfür wurde zunächst ein neues Konstrukt

hergestellt. Anstelle der His-Markierung wurde CG5976B nun V5-His markiert. Damit war eine immunzytologische Untersuchung der Proteinlokalisierung mit dem Anti-V5-Antikörper möglich. Der V5-Antikörper war in Westernblot-Analysen mit S2 Zellen hoch spezifisch. Zur Detektion des rekombinanten Proteins mit dem Antikörper erfolgte gleichzeitig eine Gegenfärbung mit dem MitoTracker Red CMXRos. Der MitoTracker färbt spezifisch Mitochondrien lebender Zellen an. Eine zweite Gegenfärbung wurde mit DAPI durchgeführt. DAPI färbt spezifisch genomische DNA an, womit die Lage des Zellkerns sichtbar wird. Eine Überlagerung von mehreren Farbstoffen führt zur Detektion einer Mischfarbe. Bei der transienten Transfektion wird der Expressionsvektor ohne den Selektionsvektor transfiziert. Ohne Selektion positiver Zellen befinden sich sowohl transfizierte als auch untransfizierte Zellen in der Zellkultur. Das hat für immunzytologische Analysen den Vorteil, dass eine interne Kontrolle möglich ist. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die mit dem pMT-CG5976B-V5 transient transfizierten Zellen 24 Stunden nach der Induktion fixiert, mit dem V5-Antikörper angefärbt und ebenfalls mit MitoTracker und DAPI gefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

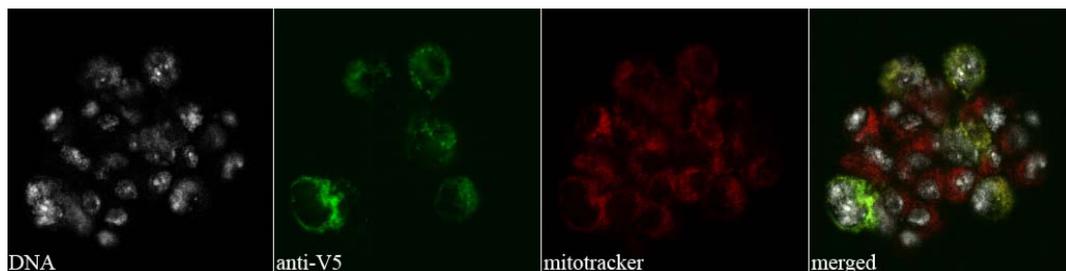


Abbildung 3.23 Immunzytologische Analyse der subzellulären Lokalisation von CG5976B-V5. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (weiß). Der V5-Antikörper (1:200) bindet an CG5976B-V5 (grün). Mitotracker färbt spezifisch Mitochondrien an (rot). Ganz rechts ist die Überlagerung aller drei Farbstoffe zu sehen. Da es sich um transient transfizierte Zellen handelte, waren nicht-transfizierte Zellen nicht mit dem V5-Antikörper anfärbbar und stellen damit die interne Negativkontrolle dar.

Mittels DAPI-Bild (links, weiß) wurden die Zellkerne aller Zellen angefärbt. Im zweiten Bild (grün) ist die Antikörper-Färbung dargestellt. Der V5-Antikörper detektierte nur die Zellen, die CG5976B exprimieren, in allen anderen Zellen war

kein Signal zu beobachten. Das bestätigt wiederum die Spezifität des Antikörpers und damit kann auch Hintergrundfärbung durch Unspezifitäten ausgeschlossen werden. Im dritten Bild (rot) ist die MitoTracker-Färbung dargestellt. Der MitoTracker färbte die Mitochondrien aller Zellen an, also auch der untransfizierten Zellen. Die Überlagerung aller drei Signale ist im vierten Bild (ganz rechts) dargestellt. In den transfizierten Zellen fand eine Überlagerung von Antikörper- und MitoTracker-Signal statt und ergab aus grün und rot ein gelbes Signal. Daraus folgte, dass es sich hierbei um eine Kollokalisierung handelte. Es konnte weder eine Überlagerung von DAPI mit dem Antikörper noch mit dem MitoTracker beobachtet werden.

Mit diesem immunzytologischen Nachweis konnten die Datenbankanalysen und der Westernblot bestätigt werden, dass CG5976B in den Mitochondrien lokalisiert ist.

3.13 Die Genprodukte von CG32412 und CG5976 haben QC-Aktivität

Nachdem die Lokalisation der putativen *Drosophila* Glutaminylyklasen CG32412 und CG5976 in den vorhergehenden Experimenten ermittelt werden konnte, wurden sie hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht. Hierzu wurde wiederum eine Zellfraktionierung durchgeführt. Um einen Einfluss der His-Fusion auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden neben den Zelllinien, die die His-fusionierten *Drosophila* QCs exprimierten auch diejenigen verwendet, die die nativen Varianten exprimierten. Die QC-Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurde in Zusammenarbeit mit der probiodrug AG bestimmt. Die Angabe der Aktivität erfolgt in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU-*relative fluorescence units*) und beschreibt die Konzentrationsänderung des Produktes der QC-Katalyse pro Zeiteinheit. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 zusammengefasst. Sowohl für CG32412 als auch für CG5976 konnte QC-Aktivität gemessen werden. Anhand der subzellulären Fraktionierung konnten auch die Unterschiede in der Lokalisation der Aktivität nachgewiesen werden,

3. Ergebnisse

was wiederum Rückschlüsse auf die Lokalisation der Enzyme erlaubt. Wie bereits im Rahmen der Datenbankanalyse und der Western-Blots gezeigt wurde, liegt CG32412 extrazellulär vor. Sowohl im Medium der CG32412-His- als auch der CG32412-nativ exprimierenden Zellen wurde die höchste QC-Aktivität gemessen. Darüberhinaus war die Aktivität der nativen Variante höher als die der His-fusionierten. Die His-Fusion hat zwar offensichtlich einen Einfluss auf die Enzymaktivität, nicht aber auf die Sekretion des Enzyms. Das bestätigt die Vermutung, dass die Lokalisation von CG32412 durch den N-Terminus vermittelt wird. In den einzelnen Zellfraktionen konnte nur geringe QC-Aktivität gemessen werden, und im Vergleich zur untransfizierten S2-Kontrolle handelte es sich dabei lediglich um basale Aktivität.

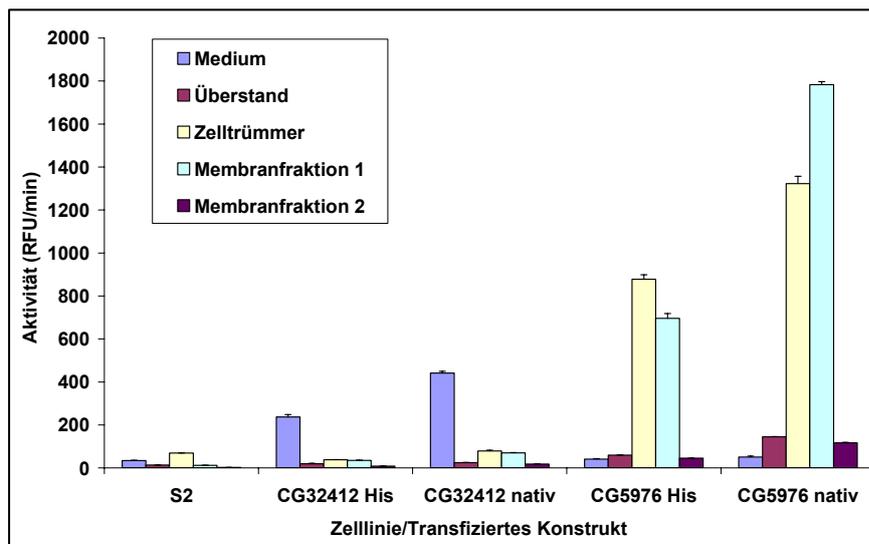


Abbildung 3.24 QC Aktivität in den einzelnen Aufschlussfraktionen nach der Zellfraktionierung. Dargestellt sind die Enzymaktivitäten in den nativen und His-markierten CG32412- und CG5976B-exprimierenden Zelllinien sowie in der untransfizierten S2-Kontrolle.

Im Gegensatz zu CG32412 war das Medium der CG5976B-exprimierenden Zellen nahezu frei von QC-Aktivität. Die höchste QC-Aktivität wurde hier in der der Membranfraktion 1 und in den Zelltrümmern gemessen. In der Membranfraktion 1 liegen die Mitochondrien angereichert vor. Die hohe Aktivität in der Fraktion der Zelltrümmer resultiert aus den durch den Aufschlussvorgang

3. Ergebnisse

nicht-lysierten Zellen. Auch für CG5976 konnte für das native Protein eine höhere Aktivität gegenüber dem His-fusionierten Protein gemessen werden. Auch hier ist ersichtlich, dass die C-terminale His-Fusion keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hat. Diese wird offenbar tatsächlich von der N-terminalen Signalsequenz bestimmt. Dieses Ergebnis bestätigte die Resultate der vorangegangenen Western-Blot- und immunzytologischen Analysen.

Die oben gezeigten Aktivitäten der *Drosophila* QC-Proteine waren jedoch erheblich geringer als die Aktivität der humanen QC (Schilling, pers. Mitteilung). Deshalb wurden die Enzymaktivitätswerte von den beiden *Drosophila* Proteinen CG5976B und CG32412 mit denen der humanen QC gegenübergestellt (Abb. 3.25).

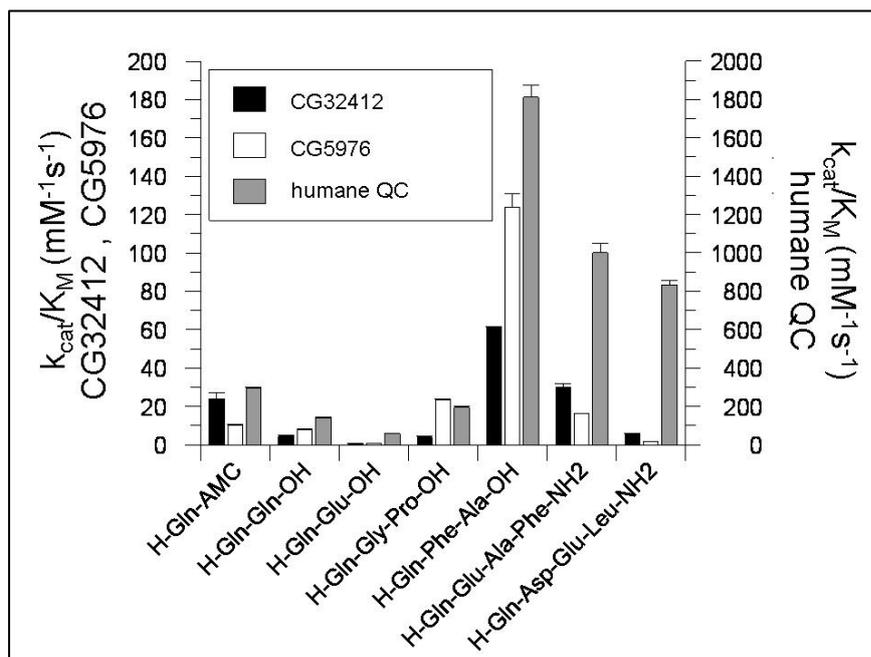


Abbildung 3.25 Vergleich der Enzymaktivitäten von humaner QC und den *Drosophila* QCs CG5976 und CG32412 bei pH 8. Der Quotient aus Umsatzgeschwindigkeit und Dissoziationskonstante (k_{cat}/K_M) gibt die Spezifität der Enzyme für das jeweilige Substrat an (aus Schilling *et al.* 2007, verändert).

Die enzymatischen Aktivitäten der einzelnen rekombinanten QC-Proteine wurden anhand sieben verschiedener synthetischer Peptide, darunter einem Fluoreszenzsubstrat (Gln-AMC) gemessen. Im Vergleich von humaner QC und den *Drosophila* QCs CG32412 und CG5976 wurde dabei deutlich, dass die

humane QC eine mehr als 10-fach höhere Spezifitätskonstante k_{cat}/k_M für alle gemessenen Substrate besitzt als jede der *Drosophila* QCs.

Die gegenüber der humanen QC geringe Enzymaktivität der *Drosophila* QCs scheint eine Ursache bei der unzureichenden pyroGlu-Bildung der A β -exprimierenden Linien zu sein. Aus diesem Grund ist es sinnvoll in zukünftigen Versuchen A β -Peptide und humane QC in *Drosophila* gemeinsam zu exprimieren und die pyroGlu-Bildung erneut zu untersuchen.

4. Diskussion

Die Alzheimer'sche Krankheit ist die mit Abstand häufigste Demenzerkrankung. Bereits heute leiden daran weltweit mehr als 20 Millionen Menschen, schätzungsweise 800.000 davon in Deutschland (Goedert und Spillantini 2006, Möller *et al.* 2006). Durch die steigende Lebenserwartung in den nächsten Jahren wird sich die Zahl der Erkrankungen bis zum Jahr 2050 verdreifachen. Das bedeutet nicht nur eine unüberschaubare finanzielle Belastung für die Gesundheits- und Pflegesysteme, sondern auch eine extreme psychische Belastung für die Angehörigen der Betroffenen.

Die ersten physiologischen Veränderungen treten schätzungsweise 20-30 Jahre vor dem Ausbruch der Krankheit ein. Bisher können Patienten erst mit dem Auftreten der ersten Symptome behandelt werden, wenn Gehirnbereiche bereits geschädigt sind. Forschungsschwerpunkte beruhen derzeit zum einen auf der Entwicklung von Diagnosemethoden, die eine beginnende AD anzeigen und zum anderen auf der intensiven Suche nach präventiv wirksamen Therapeutika. Die Besonderheit bei der Erforschung der AD liegt darin, dass amyloide Plaques und hyperphosphoryliertes TAU-Protein in Gehirnen der Patienten nachgewiesen werden, aber die Ursachen über deren Entstehung und Faktoren, die diese abnormalen Erscheinungen begünstigen, vorher identifiziert werden müssen, um eine Behandlung zu ermöglichen.

Zur Entstehung der Erkrankung gibt es verschiedene Hypothesen. Die am weitesten akzeptierte Hypothese ist die der Amyloid-Kaskade. Diese besagt, dass die Akkumulation von A β das primäre Ereignis der AD-Pathogenese darstellt und die Bildung der Tau-Fibrillen aus dem Ungleichgewicht von A β -Produktion und A β -Abbau resultiert (Hardy und Selkoe 2002). Dafür werden vier wesentliche Argumente angeführt. Erstens wurden Mutationen im *tau*-Gen identifiziert, die schwere, durch Neurofibrillen charakterisierte neurodegenerative Krankheiten

hervorrufen, in denen aber keine Amyloid-Ablagerungen gefunden werden, wie z.B. die Frontotemporale Demenz mit Parkinson (FTDP, Poorkaj *et al.* 1998, Hutton *et al.* 1998). Demnach entstehen die TAU-Neurofibrillen erst nach der Änderung des A β -Metabolismus und Plaquebildung (Hardy *et al.* 1998). Zweitens wird in transgenen Mäusen eine stärkere Fibrillenbildung beobachtet, wenn TAU und A β koexprimiert werden als bei der Expression von TAU allein. Demgegenüber ist die Plaquebildung durch die Expression von TAU unbeeinflusst (Lewis *et al.* 2001). Als drittes Argument wird die pathogene Rolle von ApoE im A β -Metabolismus angeführt. So zeigen APP-transgene Mäuse, die mit ApoE-defizienten Mäusen gekreuzt wurden, reduzierte A β -Ablagerungen (Bales *et al.* 1997). Und viertens verdichten sich die Hinweise, dass die genetische Variabilität bei der A β -Bildung und beim A β -Abbau das AD-Risiko beeinflussen (Wavrant-DeVrieze *et al.* 1999, Myers *et al.* 2000, Ertekin-Taner *et al.* 2000, Bertram *et al.* 2000, Olson *et al.* 2001).

Auf der Basis der Amyloid-Kaskade wird außerdem gezeigt, dass die Konzentration löslicher A β -Spezies mit kognitiven Schäden korreliert (Naslund *et al.* 2000, Lue *et al.* 1999, McLean *et al.* 1999, Wang *et al.* 1999). Offenbar sind insbesondere die löslichen Oligomere, nicht aber die Monomere (Lambert *et al.* 1998) oder unlöslichen Amyloid-Fibrillen (Hartley *et al.* 1999), verantwortlich für synaptische Fehlfunktionen und Verletzungen der Neuronen. Neuere Untersuchungen zeigen intraneuronale Akkumulation von A β _{x-42} vor allem in Multivesikelkörperchen (*multivesicular bodies* – MVB; Almeida *et al.* 2006). Plaques selbst sind anscheinend nicht neurotoxisch, sondern stellen stabile Reservoirs potentiell toxischer Proteine dar. Die Neurodegeneration steigt mit dem Alter an und geht amyloiden Plaques voraus (Braak und Braak 1991).

Analysen der Zusammensetzung von amyloiden Ablagerungen belegen, dass es verschiedene A β -Spezies innerhalb der Plaques gibt. Neben A β ₁₋₄₂ werden vorwiegend zwei N-terminal verkürzte Varianten vorgefunden: pyroGlu-A β ₃₋₄₂ und pyroGlu-A β ₁₁₋₄₂ (Russo *et al.* 1997, Saido *et al.* 1996). Diese Peptide weisen eine N-terminale Zyklisierung des Glutamats auf und werden auch als

pyroGlu-A β oder A β N3pE bzw. A β N11pE bezeichnet. A β N3pE stellt dabei mit bis zu 51% des Gesamt-A β -Gehaltes in neuritischen Plaques die hauptsächlich vorkommende Form dar (Kuo *et al.* 1997). Außerdem konnte A β N3pE als Hauptbestandteil diffuser Plaques, die vermutlich frühe Stadien der Amyloid-Ablagerung darstellen, in verschiedenen Hirnarealen nachgewiesen werden (Saido *et al.* 1995) und geht damit vermutlich der Ablagerung von A β 1-42 voraus. PyroGlu-A β besitzt ein wesentlich stärkeres Aggregationspotential als A β 1-42 (He und Barrow 1999) und früh im Krankheitsverlauf auftretende A β N3pE-Aggregate beeinflussen die Membranpermeabilität durch Bildung von Poren. Deshalb steht pyroGlu-A β im Verdacht, eine Art Keim für die Plaquebildung zu sein, die β -Amyloid-Aggregation und Toxizität zu verstärken sowie den Ausbruch und den Fortschritt der AD negativ zu beeinflussen.

Eine N-terminale pyroGlu-Modifikation, wie bei A β N3pE, ist auch von Oligopeptiden bekannt, wie den Hormonen TRH und GnRH. Hier dient die Zyklisierung einerseits als Schutz vor Aminopeptidasen und verlängert somit die Halbwertszeit *in vivo*, andererseits ist sie in einigen Fällen entscheidend für die Aktivität der Hormone. Die N-terminale Zyklisierung erweist sich jedoch im Fall von pyroGlu-A β als pathophysiologisch relevant, weil A β dadurch langsamer abgebaut werden kann und zudem schneller zu neurotoxischen Oligomeren aggregiert. Als Enzym, das für die Glutamin-Zyklisierung der Hormone verantwortlich ist, wurde die Glutaminylzyklase (QC) identifiziert (Busby *et al.* 1987, Fischer und Spiess 1987).

Aufgrund von Expressionsdaten und biochemischen Analysen steht die QC im Verdacht, auch für die pyroGlu-Bildung von A β 3-42 verantwortlich zu sein (Schilling *et al.* 2004). Die Inhibierung der QC-Aktivität anhand eines geeigneten Inhibitors sollte somit die Bildung von pyroGlu-A β unterdrücken und frühzeitiger neurotoxischer Oligomer- und anschließender Plaquebildung vorbeugen. In biochemischen Analysen konnten bereits einige potente Inhibitoren der QC identifiziert werden (Schilling *et al.* 2003, Buchholz *et al.* 2006). Eine dieser Verbindungen stellt das Imidazol-Derivat P150/03 (Buchholz *et al.* 2006) dar.

P150/03 konnte in Zellkultur-Experimenten bereits erfolgreich die pyroGlu-Bildung unterdrücken (Cynis *et al.* 2006).

Neben Zellkulturen spielen transgene Tiermodelle eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Wirkstoffen. So wird *Drosophila melanogaster* als Modellsystem für neurodegenerative Erkrankungen häufig gewählt. Auch zur Erforschung der Alzheimer'schen Demenz sind zahlreiche transgene Stämme etabliert. Fossgreen *et al.* (1998) generierten transgene *Drosophila*-Linien, die humanes APP exprimierten. Diese Tiere zeigten Fehlbildungen in der Flügelentwicklung, den sogenannten blistered-wing-Phänotyp (blasige Flügel), der auf einen Einfluss von APP auf die Zell-Adhäsion hinweist. Weiterführende Untersuchungen zeigten jedoch, dass kein A β und keine Neurodegeneration nachgewiesen werden konnte. Grund hierfür ist das Fehlen von β -Sekretase-Aktivität in *Drosophila*. Die Ko-Expression von humanem APP und einer entsprechenden β -Sekretase (BACE) wurde von Greeve *et al.* (2004) untersucht. Hier konnten die Bildung von A β -Peptiden sowie eine Degeneration der Retina und optischer Neuronen nachgewiesen werden. Finelli *et al.* (2004) exprimierten A β 1-42 als Peptid unter der Kontrolle des Enkephalin-Signalpeptids, welches das Transgen in den sekretorischen Weg leitet. Es wurde der Einfluss von A β einerseits bei augenspezifischer Expression und andererseits bei Expression im neuronalen Gewebe von Fliegen untersucht. Die A β 1-42-Expression in den Augen zeigte den so genannten rough-eye-Phänotyp (raue Augen) und eine Disorganisation der Ommatidien. Die neuronale Expression führte zu einer verkürzten Lebenserwartung. Eine Überexpression der Protease Neprilysin resultierte in geringeren Erkrankungserscheinungen, was die Ergebnisse anderer Studien ebenfalls belegen (Barnes *et al.* 1995, Iwata *et al.* 2001). Die von Finelli *et al.* (2004) etablierten A β 1-40 und A β 1-42 exprimierenden transgenen *Drosophila*-Linien wurden von Iijima *et al.* (2004) ebenfalls für Untersuchungen verwendet. Sie konnten ihrerseits zeigen, dass die Expression von A β 1-42-Peptiden zu Symptomen führen, die für AD typisch sind. Dazu zählt die Bildung plaqueartiger Ablagerungen, die immunhistologisch nachgewiesen wurden, sowie

Defizienzen im olfaktorischen Gedächtnis bei Pawlowschen Lernversuchen, lokomotorische Defizite und eine verkürzte Lebenserwartung. Außerdem wurde gezeigt, dass die genannten Phänotypen ausschließlich in den A β 1-42- und nicht in den A β 1-40-exprimierenden Linien zu beobachten waren. In bisherigen Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* wurden noch keine verkürzten A β -Varianten exprimiert, wie es in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird.

Aufgrund der Erkenntnisse über verkürzte und zyklisierte A β -Spezies in amyloiden Plaques und deren Bedeutung beim Ausbruch und der Schwere der AD sollte in der vorliegenden Arbeit ein neues *Drosophila* Modellsystem etabliert werden. Hierbei sollte die Möglichkeit untersucht werden, verkürzte A β -Spezies zu exprimieren, diese auf die Bildung von N-terminalem pyroGlu durch die putativen endogenen *Drosophila*-QCs zu analysieren und diese gegebenenfalls mit einem geeigneten Inhibitor zu hemmen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue transgene *Drosophila* Linien hergestellt werden, die insgesamt neun verschiedene Konstrukte exprimieren. Neben den Varianten A β 1-40 und A β 1-42 wurden die vier N-terminal verkürzten Varianten, A β 3-42, A β 3-40, A β 3-42(E3Q) und A β 3-40(E3Q) hergestellt. Die A β 3-40- und A β 3-42-Konstrukte waren entsprechend um die zwei N-terminalen AS Aspartat und Alanin verkürzt. Damit wurde als N-terminale AS Glutamat generiert. Die ermöglichte die QC-katalysierte pyroGlu-Bildung. Ursprünglich wurde die QC als Enzym für die Zyklisierung von Glutamin im Rahmen der Reifung bioaktiver Peptide beschrieben. Als interne Kontrolle für die QC-Aktivität und pyroGlu-Bildung in A β dienten deshalb die Konstrukte A β 3-40(E3Q) und A β 3-42(E3Q). Neben den fehlenden N-terminalen AS war hier ein AS-Austausch von Glutamat nach Glutamin vorgenommen worden, wodurch die pyroGlu-Bildung stark beschleunigt werden sollte. Dadurch war es möglich, pyroGlu-spezifische ELISAs zu implementieren, um den Nachweis der korrekten Prozessierung der Konstrukte zu erbringen (vgl. Abschnitt 3.1).

Die Expression der A β Transgene erfolgte nach Einkreuzen einer GAL4-exprimierenden Treiberlinie (ausführliche Beschreibung des Expressionssystems

siehe Kapitel 3.2). Die transheterozygoten Nachkommen wurden sequenziell aufgeschlossen und mittels ELISA auf die Expression von A β untersucht. So konnte auch für transgene *Drosophila*-Linien die Anreicherung von A β bei der Gewinnung in der SDS-Fraktion bestimmt werden, wie es zuvor bereits für den Aufschluss von Maus-Gehirnen gezeigt worden war (McGowan *et al.* 2005).

Die ELISA-Daten der Expression von A β 1-42 weisen auf eine deutliche Anreicherung von A β im Gehirn transgener Fliegen hin, wie es bereits von Iijima *et al.* (2004) immunhistologisch gezeigt werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigt nicht nur die Daten aus der Literatur, sondern ist auch Ausdruck für das erfolgreiche Zusammenspiel des Systems aus GAL4-Induktion, Signalsequenz und Prozessierung. Erstmals konnte auch die Expression der verkürzten Varianten A β 3-42 und A β 3-42(E3Q) in transgenen *Drosophila*-Linien nachgewiesen werden. Insgesamt war eine Insertionsort-abhängige Expressionsstärke zu beobachten. Dies bestätigte wiederum die Notwendigkeit, einen möglichst umfangreichen Pool A β -exprimierender transgener Linien zu generieren und zu etablieren.

Bei der Expression der A β x-40-Spezies konnte keine A β -Anreicherung festgestellt werden. Ein ähnliches Ergebnis erzielten neben Iijima *et al.* (2004) in *Drosophila* auch McGowan *et al.* (2005) bei ihren Untersuchungen an transgenen Mäusen. Mäuse, die A β 1-40 in sehr hohen Konzentrationen exprimierten, zeigten keine Bildung amyloider Plaques. Dagegen führte selbst eine geringe Expression von A β 1-42 zu unlöslichen A β 1-42-Aggregaten und kompakten amyloiden Plaques. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Erkenntnisse nun auch für *Drosophila*, auch hier konnte eine selektive A β -Anreicherung ausschließlich in A β x-42-exprimierenden transgenen Tieren nachgewiesen werden, aber nicht in jenen, die A β x-40 exprimierten. Da sowohl die A β x-40- als auch die A β x-42-Varianten identische Rahmenbedingungen besaßen, ist ein Einfluss der übrigen Komponenten des Transgens, wie Signalsequenz, Markergen oder flankierende repeats, auf die Expression von A β unwahrscheinlich. Desweiteren beeinflusst, zumindest in menschlichen Gehirnen, das Verhältnis von A β x-40 zu A β x-42 die

Bildung amyloider Ablagerungen (Wiltfang *et al.* 2007). Dies wurde in *Drosophila* jedoch noch nicht untersucht. Die Vielzahl transgener A β -exprimierender *Drosophila*-Linien erlaubt jedoch zukünftig durch gezielte Kreuzungen auch solche Stämme herzustellen, die verschiedene A β -Varianten ko-exprimieren.

Die Unterschiede im Aggregationsverhalten der A β _x-40- und A β _x-42-Peptide sind durch deren Sekundärstruktur zu erklären. Die 3D-Struktur von A β -Fibrillen wurde u.a. von Lührs *et al.* (2005) untersucht. Danach sind die AS 1-17 ungeordnet und die AS 18-26 und 31-42 bilden die anti-parallelen β -Faltblattstrukturen β 1 und β 2 aus, verbunden durch einen Loop. Die ungeraden AS des β 1-Faltblattes interagieren mit den geraden AS des β 2-Faltblattes des vorherigen Moleküls. Damit ergibt sich ein unidirektionales Fibrillenwachstum. Die AS 4 interagiert mit M35 der Nachbarfibrille, wodurch ein diffuses Netzwerk entsteht. A β 1-40 besitzt dagegen durch das Fehlen der zwei letzten hydrophoben AS Isoleucin und Alanin ein anderes Aggregationsverhalten, vermutlich begründet durch eine geringe Stabilisation des β -Faltblattes. Dies begründet wiederum die bessere Löslichkeit der kürzeren Peptide.

Die Parallelen, die sich in den unterschiedlichen Aggregationseigenschaften von A β _x-40 und A β _x-42 in *Drosophila* und in Mäusen (McGowan *et al.* 2005) abzeichnen, sind ein Indiz für ähnliche physiologische Bedingungen in den Organismen, und unterlegen somit die Ergebnisse des in der vorliegenden Arbeit etablierten *Drosophila*-Modellsystems der AD.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht in erster Linie die Wirkung von A β untersucht. Vielmehr sollten transgene *Drosophila*-Linien etabliert werden, die verkürzte A β -Varianten exprimieren und anhand derer in Zukunft weitere, für den Krankheitsverlauf der AD relevante A β -Varianten, z.B. A β 11-42, generiert werden können. Das Erzeugen eines definierten N-terminalen AS-Restes, anhand dessen z.B. die Zyklisierung untersucht werden kann, setzt eine effektive und korrekte Prozessierung des exprimierten Peptids voraus. Für den Transport in den

Extrazellularraum oder in bestimmte Zellkompartimente musste eine geeignete Signalsequenz identifiziert werden. Dies ist auch für die Katalyse der Glutamyl- bzw. Glutaminylzyklisierung durch die QC wichtig, da diese im sekretorischen Weg erfolgt (Bockers *et al.* 1995). Besonders bei der fokussierten Betrachtung des N-Terminus musste der gewünschte AS-Rest auch dort freigesetzt werden.

Um definierte verkürzte A β -Varianten zu erhalten, wurde A β in der vorliegenden Arbeit als artifizielles Prä-Pro-Peptid exprimiert. *In vivo* besitzt APP ein Sekretionssignal, welches dafür verantwortlich ist, dass das Protein dem sekretorischen Weg in der Zelle zugeführt und dort prozessiert wird (Kang *et al.* 1987). Um die gewünschte extrazelluläre Lokalisation von A β herbeizuführen, musste demnach eine Signalsequenz fusioniert werden. Eine durch Experimente in Säugerzellen gut charakterisierte Signalsequenz stellte die Prä-Pro-Sequenz des TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*; Boler *et al.* 1969) der Maus dar. Diese wurde deshalb auch für die Transgen-Expression in *Drosophila* gewählt. Wie bei anderen sezernierten Peptiden wird das Signalpeptid (Prä-Sequenz) während des Transportes in das Lumen des rauen ER abgespalten (Nillni *et al.* 1993). Die Prozessierung der Pro-TRH-Sequenz erfolgt dann durch Prohormonkonvertasen im sekretorischen Weg, im trans-Golgi-Netzwerk und in sekretorischen Granulae (Cruz und Nillni 1996). Die reifen Granulae gelangen zur Plasmamembran und entlassen das sekretorische Peptid in den extrazellulären Raum. Im vorliegenden Fall erfolgte die Freisetzung des A β -Peptids demnach in späten sekretorischen Kompartimenten, wie es auch für die APP-Prozessierung durch Sekretasen beschrieben ist (Haass *et al.* 1995, Hartmann *et al.* 1997, Sudoh *et al.* 1998).

Daten aus verschiedenen Experimenten mit dem A β 3-42(E3Q)-Konstrukt bestätigen sowohl die Sekretion von A β als auch die korrekte Abspaltung der TRH-Prä-Pro-Sequenz. Die ELISA-Daten der A β x-42-exprimierenden Schneider-Zellen belegten die extrazelluläre Lokalisation von A β (vgl. Abb. 3.3), was durch eine Western-Blot-Analyse des Mediums bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 3.4). Anhand des Western Blots konnte die pyroGlu-A β -Bildung nachgewiesen werden. Dies wurde in den A β 3-42(E3Q)-exprimierenden Linien bestätigt (vgl.

Abb. 3.9, 3.11, 3.15). Die Zyklisierung von Glutamyl- oder Glutaminylresten ist nur möglich, wenn diese sich am N-Terminus befinden. Demnach muss die Signalsequenz so abgespalten worden sein, dass Glutamin am N-Terminus frei wurde. Offenbar besitzen *Drosophila*-Zellen ähnliche Prozessierungsenzyme wie Säugerzellen, z.B. Furin-Homologe und Signalpeptidasen. Eine pyroGlu-A β -Bildung konnte erstmals in transgenen *Drosophila* nachgewiesen werden.

Die Relevanz der Signalsequenz wird auch durch die zweite Gruppe der hergestellten transgenen Fliegen deutlich. Diese wurden mit Konstrukten transformiert, die die Signalsequenz von BiP besaßen. BiP (binding protein) ist ein Immunoglobulin-bindendes Chaperon-Protein in *Drosophila* (Kirkpatrick *et al.* 1995), somit handelt es sich hier im Fall der Signalsequenz um eine homologe Expression. Dieses Signalpeptid wird auch für eine rekombinante Expression von Proteinen in Schneider-Zellen eingesetzt, da hierdurch eine effiziente Sezernierung erreicht wird (Invitrogen). Die BiP-Konstrukte wurden im Vorversuch in Schneider-Zellen exprimiert und mittels ELISA konnte wie zuvor mit den TRH-A β -Konstrukten eine Sekretion der rekombinanten Proteine nachgewiesen werden. Dabei wurden ähnliche A β -Konzentrationen mit beiden Signalpeptiden im Medium gemessen. Demzufolge wäre zu erwarten gewesen, dass dies auch in transgenen *Drosophila*-Linien möglich gewesen wäre. Es zeigte sich jedoch, dass die Linien, die BiP-A β -Konstrukte exprimierten eine im Vergleich zur Maus-TRH-Signalsequenz erheblich geringere A β -Ablagerung aufwiesen. BiP-A β wurde *in vivo* offensichtlich ineffizient exprimiert. Das Unterbleiben der pyroGlu-A β -Bildung deutet außerdem auf eine fehlerhafte Prozessierung des Peptids hin, wobei auch die Lokalisation der Freisetzung zu beachten ist. Während die BiP-Signalsequenz im ER abgespalten wird (Kirkpatrick *et al.* 1995), erfolgt dies bei der TRH-Prä-Pro-Sequenz erst im Golgi-Apparat und in den sekretorischen Vesikeln (Cruz und Nillni 1996), wo auch hohe QC-Konzentrationen vorzufinden sind (Bockers *et al.* 1995). Inwieweit dieser Unterschied einen Einfluß auf die pyroGlu-Bildung hat, ist unklar. In anderen *Drosophila*-Modellsystemen für die AD kam die Enkephalin-Signalsequenz der Ratte zum Einsatz (Finelli *et al.* 2004). Es sind jedoch bisher keine quantitativen

Angaben über die zu erreichende A β -Konzentration in Fliegen publiziert worden, wie es in der vorliegenden Arbeit mittels ELISA dargestellt wurde.

Die Bildung von pyroGlu-A β in den A β 3-42(E3Q)-exprimierenden transgenen *Drosophila*-Linien, wie der Linie CS58, ist nicht nur ein Indiz für die korrekte Prozessierung des Transgens, sondern auch für eine QC-vermittelte Zyklisierung der A β -Peptide in *Drosophila*. Aufgrund der Erkenntnisse über die enzymatischen Eigenschaften der QC (Schilling *et al.* 2004) wurde eine pyroGlu-Bildung ebenfalls in den A β 3-42 exprimierenden Linien erwartet. In den untersuchten, A β 3-42-exprimierenden Linien konnte jedoch kein pyroGlu-A β nachgewiesen werden, ebenso wenig in den untersuchten A β 1-42 exprimierenden Linien (vgl. Abb. 3.9). Anhand von Datenbankanalysen (www.flybase.org) ist davon auszugehen, dass *Drosophila* mindestens eine Dipeptidylpeptidase (DPP) besitzt, die in der Lage wäre, A β 1-42 zu A β 3-42 zu prozessieren. Damit würde das N-terminale Glutamat wieder für eine Zyklisierung durch die QC zur Verfügung stehen. Es ist demnach nicht zu beurteilen, ob die fehlende pyroGlu-Bildung in A β 1-42 exprimierenden Linien aus der fehlenden Aktivität der DPP oder der verminderten Aktivität der QC hervorgeht. Für den Fall, dass in den A β 3-42 exprimierenden Linien pyroGlu-A β nachgewiesen worden wäre, läge die fehlende Aktivität bei der DPP. Bisher existieren jedoch hierzu, außer dem Datenbankeintrag, keine Daten. In Bezug auf die pyroGlu-A β -Bildung aus A β 3-42 kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Aktivität der endogenen *Drosophila* QC für die Glutamat-Zyklisierung nicht ausreicht, bzw. innerhalb des Versuchszeitraumes nicht genügend pyroGlu-A β generiert wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten durch Datenbankanalysen mehrere putative Glutaminylykolasen in *Drosophila* identifiziert werden. Die in der Datenbank als CG6168 annotierte Sequenz stellte sich als Pseudogen heraus und wurde für weitere Untersuchungen außer Acht gelassen. Die Identifizierung und Isolierung von QC-Isoformen aus *Drosophila* war bisher noch nicht verfolgt worden. Es handelt sich hierbei um die putativen QCs, die als CG5976 und CG32412 annotiert sind. Sie besitzen untereinander eine Sequenzidentität von

38%. Zur humanen QC beträgt die Identität 41% (CG5976) bzw. 38% (CG32412). Darüberhinaus besitzt CG5976 zwei Isoformen, CG5976A und CG5976B. Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrem ersten Exon. Das erste Exon ist bestimmend für die Lokalisation des funktionellen Proteins, es kodiert die Signalsequenz. Der N-Terminus vermittelt laut Datenbankanalysen den Transport in den sekretorischen Weg für Isoform A und eine Mitochondrienlokalisation im Fall von Isoform B. Das für die Funktion der QC kritische zweite Exon ist hingegen identisch. Offensichtlich handelt es sich hierbei um ein Gen, dessen Funktion sowohl intrazellulär in den Mitochondrien als auch im sekretorischen Weg von Bedeutung ist. Dies konnte bisher noch für keine andere QC gezeigt werden. CG32412 besitzt eine Signalsequenz, die auf eine Sekretion des Proteins hindeutet. Die Vorhersagen, die aufgrund der Sequenzinformation erhalten wurden, konnten durch homologe Expression in S2-Zellen bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.11, 3.12).

Die Präsenz von Pyroglutamylpeptiden, den mutmaßlichen Produkten der QC-Katalyse, wurde auch in Arthropoden sowie in dem Mollusken *Aplysia* beschrieben, was für evolutionär konservierte Mechanismen der pyroGlu-Peptid-Funktion und pyroGlu-Peptid-Bildung spricht (Baggerman *et al.* 2002, Garden *et al.* 1999, Furukawa *et al.* 2001).

Die Isolierung von Glutaminylzyklasen aus *Drosophila melanogaster* bestätigt diese evolutionär konservierten Mechanismen der pyroGlu-Peptid-Bildung und repräsentiert offenbar eine effektive Maschinerie, die hormonelle Funktion zu übertragen. Die Analyse der enzymatischen Aktivität der *Drosophila* QCs beweist außerdem eine hochkonservierte Enzymklasse zwischen Invertebraten und Vertebraten. Trotz der Sequenzunterschiede zwischen *Drosophila*- und Säuger-QC sind deren katalytische Mechanismen offensichtlich konserviert. Alle untersuchten tierischen QCs konnten als Zink-Metalloenzyme charakterisiert werden, wobei das Metall-Ion eine zentrale und essentielle Rolle für die katalytische Aktivität spielt (Schilling *et al.* 2007). Auch die Substratspezifität von Säuger- und *Drosophila*-QCs weist eine deutliche Ähnlichkeit auf. Dazu zählen, dass dem terminalen Glutamin-Rest präferentiell eine hydrophobe AS

folgt, dass negativ geladene Substrate eher schlecht umgesetzt werden und dass ein unprotonierter N-Terminus des Substrats für die Umsetzung notwendig ist. Wenn die genannten Eigenschaften erfüllt sind, scheint die Substrat-Selektivität der QCs allerdings gering zu sein, denn N-terminale pyroGlu-Bildung wurde für zahlreiche Peptide und Proteine in der Tier- und Pflanzenwelt beschrieben (Hass und Hermodson 1981).

Die Aufreinigung der *Drosophila* QCs und deren enzymatische Charakterisierung machten jedoch auch funktionelle Unterschiede zur humanen QC deutlich. Die Aktivität der *Drosophila*-QCs liegt deutlich unter der der humanen QC (vgl. Abb. 3.25). Möglicherweise ist dies ein Grund dafür, dass in den A β 1-42 und in den A β 3-42 exprimierenden transgenen *Drosophila*-Linien kein pyroGlu detektiert werden konnte. In Untersuchungen zur pyroGlu-A β -Bildung konnte gezeigt werden, dass bereits für die humane QC eine Überexpression nötig ist, um pyroGlu-A β nachzuweisen (Cynis *et al.* 2006). Demnach besteht die Möglichkeit, dass zur geringeren Substratspezifität der *Drosophila* QCs eine zu geringe Expression kommt. Wie die RT-PCR-Versuche zeigten, wird CG32412 kaum im Kopf exprimiert. Der verfügbare cDNA Klon stammt jedoch aus einer cDNA-Bibliothek, dessen Ursprung als Köpfe adulter Fliegen angegeben wird. Auch die Expression der CG5976-Isoformen ist in Köpfen gegenüber den Körpern der Fliegen sehr schwach. Das Expressionsmuster der QCs gibt daher einen weiteren Hinweis darauf, warum kein pyroGlu-A β in A β 3-42-exprimierenden Linien gefunden werden konnte.

Die Lokalisation von CG32412 im sekretorischen Weg machte dieses Enzym zum putativen Katalysator für die pyroGlu-Bildung an den A β 3-42-Peptiden und damit zum potentiellen Zielenzym für QC-Inhibitoren. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Säuger QCs durch Imidazol- und Cysteamin-Derivate kompetitiv gehemmt werden können (Schilling *et al.* 2003, Schilling *et al.* 2005). Der Vergleich der Dissociationskonstanten des QC-Inhibitors P150/03, einem Imidazol-Derivat, gegenüber CG32412, CG5976 und der humanen QC wurde zusammenfassend in Tabelle 4.1 dargestellt. Wie bereits bei der Substratspezifität

konnten auch Unterschiede in der Inhibitorspezifität innerhalb der *Drosophila* QCs und gegenüber der humanen QC identifiziert werden. Die Unterschiede in den K_i -Werten zwischen pH7 und pH8 sind bei CG5976 weniger deutlich ausgeprägt als bei CG32412, dessen K_i -Wert bei pH7 wesentlich niedriger ist als bei pH8. Da der K_i -Wert die Dissoziationskonstante der Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor darstellt, bedeutet ein niedriger K_i -Wert eine geringe Dissoziation der Verbindung und damit eine hohe inhibitorische Potenz. Der Vergleich der K_i -Werte von CG32412 und CG5976 zeigt einen geringeren Wert für CG5976 und somit eine bessere Inhibitoraffinität. Außerdem ist der Wert ähnlich dem der humanen QC, was für eine höhere Homologie zwischen diesen beiden QCs spricht. Diese Ähnlichkeit spiegelte sich bereits in der Sequenzidentität wider (humane QC-CG5976 41%; humane QC-CG32412 38%) und kann auch beim pH-Optimum der Enzyme festgestellt werden (Schilling, *et al.* 2007). Das pH-Optimum liegt für CG32412 bei pH 7,0-7,5 und für CG5976 bei pH 7,5-8,0, was dem der humanen QC entspricht.

Tabelle 4.1 Dissoziationskonstanten des kompetitiven QC-Inhibitors P150/03, bestimmt mit verschiedenen Glutaminylzyklasen. Aufgrund der pH-abhängigen Wechselwirkung wurden die K_i -Werte für pH 7 und pH 8 bestimmt. Die Reaktionen wurden bei 30°C durchgeführt, Gln-AMC wurde als Substrat verwendet. Daten entnommen aus Schilling *et al.* 2007 und Schilling *et al.* 2005.

Inhibitor	CG32412		CG5976		humane QC
	K_i [pH8] (μ M)	K_i [pH7] (μ M)	K_i [pH8] (μ M)	K_i [pH7] (μ M)	K_i
P150/03	3,14 \pm 0,05	0,94 \pm 0,09	0,097 \pm 0,005	0,101 \pm 0,002	0,06 \pm 0,0002

Diese Daten verdeutlichen, dass primär nicht das sezernierte CG32412 durch P150/03 inhibiert wird, sondern CG5976. Obwohl CG5976A ebenfalls sezerniert wird, konnte durch RT-PCR-Analyse gezeigt werden (vgl. Abb. 3.20), dass kaum Transkript in den Köpfen der Fliegen gebildet wurde. Im Gegensatz dazu konnten hohe Transkript-Konzentrationen der in Mitochondrien lokalisierten Isoform CG5976B nachgewiesen werden. Damit ist auch der geringe Erfolg bei der Inhibierung der pyroGlu-Bildung in den transgenen A β 3-42(E3Q)-exprimierenden

Drosophila-Linien zu erklären. Denn A β wird offensichtlich sezerniert und das N-terminale Glutamin von CG32412 zyklisiert, während sich die QC, die effizienter gehemmt wird, in den Mitochondrien befindet. Die vergleichsweise geringe Hemmung von CG32412 erklärt ebenfalls die hohe Inhibitor-Konzentration, die notwendig ist, um die pyroGlu-Bildung zu verringern. Vermutlich führt die Inhibierung der mitochondrialen QC mit P150/03 zur beobachteten Toxizität in den Fliegen.

In Säugern konnte bisher noch keine QC in Mitochondrien gefunden werden. Die physiologische Funktion von CG5976 in *Drosophila*-Mitochondrien ist unbekannt. Bisher sind auch keine Substrate für die mitochondriale QC beschrieben worden. Datenbankanalysen weisen jedoch auf mögliche Substrate in *Drosophila* hin. Hierzu zählen die Acyl-CoA-Dehydrogenase, die Succinat-Dehydrogenase sowie die Propionyl-CoA-Dehydrogenase (Schilling *et al.* 2007). Sekretorische QC-Substrate, wie Corazonin und das Adipokinetische Hormon, sind hingegen gut charakterisiert und deren N-terminale pyroGlu-Bildung nachgewiesen (Baggerman *et al.* 2002, Schaffer *et al.* 1990). Während die Glutaminyl-Zyklisierung sekretorischer Peptide von den Invertebraten zu den Vertebraten offenbar konserviert ist, scheint dies bei mitochondrialen Peptiden nicht der Fall zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein Einfluss eines QC-Inhibitors (P150/03) auf die A β -Aggregation beobachtet. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die gesamt-A β -Konzentration verringerte als auch die pyroGlu-Bildung verzögert werden konnte (vgl. Abb. 3.10, 3.11, 3.13, 3.14). Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass pyroGlu-A β weniger gut löslich ist und stärker aggregiert als N-terminal unmodifiziertes A β . Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass die A β -Konzentration in unterschiedlichen Versuchsansätzen offensichtlich erheblichen Schwankungen unterliegt. In jedem Versuchsansatz wurde eine Verringerung der pyroGlu-A β -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Es konnte jedoch nicht endgültig festgestellt werden, ob die verringerte gesamt-A β -Konzentration nach

Inhibitorbehandlung auf einen generellen Einfluss auf die A β -Expression, oder auf eine bessere Löslichkeit von unmodifiziertem A β bzw. auf eine verringerte Keimbildung durch pyroGlu-A β zurückzuführen ist.

Ein weiterer Umstand darf bei der Betrachtung der Daten und der Frage nach der nicht kompletten Vermeidung der pyroGlu-Bildung nicht vergessen werden. P150/03 wurde als QC-Inhibitor *in vitro*, bzw. *in silico* identifiziert. Es handelt sich hierbei, wie bereits beschrieben, um ein Imidazol-Derivat (Buchholz *et al.* 2006). In der sauren Umgebung in den sekretorischen Granulae der Zellen kann es zur Protonierung eines Stickstoffs im Imidazolring kommen, was wiederum die Interaktion mit dem Metall-Ion im aktiven Zentrum der QC beeinflusst (Schilling *et al.* 2003). Damit muss mit einer verminderten Inhibitorleistung von P150/03 gerechnet werden, was sich in der Detektion von pyroGlu-A β trotz Inhibitorbehandlung äußert. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Cynis *et al.* (2006) in ihren Untersuchungen an HEK293 und β -TC 3 Zellen. Auch dort wurde der Einfluss von P150/03 nachgewiesen. Die pyroGlu-Bildung konnte aber nicht komplett unterdrückt werden.

Ein zusätzlicher biochemischer Aspekt betrifft eine Eigenschaft von N-terminalem Glutamin. Die Inkubation von N-Glutaminyl-Peptiden in Abwesenheit eines Enzyms führt zur spontanen Glutamin-Zyklisierung (Gilbert *et al.* 1949, Dick Jr. *et al.* 2006). Unter Bedingungen von 100 mM MES, pH 7,0 und 30°C können innerhalb von 24 Stunden bis zu 20% der gesamt-Peptide zyklisiert werden (Schilling, pers. Mitteilung). Übertragen auf die durchgeführten Versuche mit *Drosophila* bedeutet das, dass eine teilweise Zyklisierung der A β 3-42(E3Q)-Peptide nicht durch die Aktivität der QC hervorgerufen wird, sondern durch die genannte spontane Zyklisierung entstehen könnte. Damit kann auch erklärt werden, warum trotz Inhibitorbehandlung noch pyroGlu-A β nachweisbar war. Eine Rolle spielt hierbei auch die für biochemische Verhältnisse lange Versuchsdauer. Zwar kann davon ausgegangen werden, dass A β ständig synthetisiert wird, was sich auch im gesamt-A β -Gehalt bei den älteren Tieren widerspiegelt. Bei einer bis zu 40-tägigen Versuchsdauer ist jedoch mit einem erheblichen Anteil spontan zyklisiertem pyroGlu-A β zu rechnen. Eine solche

spontane Zyklisierung konnte zwar für N-terminales Glutamat festgestellt werden, die Halbwertszeit der Zyklisierung liegt jedoch bei Monaten bis Jahren (Chelius *et al.* 2006).

Aufgrund der beobachteten Unterschiede zwischen den charakterisierten QCs, insbesondere der geringeren Substratspezifität der *Drosophila* QCs und der spezifischen Hemmung der mitochondrialen QC CG5976 ist ein verlässliches Drug-Screening-Modell vermutlich durch Implementierung der humanen QC möglich. In weiteren Schritten sollten neue transgene *Drosophila*-Linien hergestellt werden, die humane QC im sekretorischen Weg exprimieren. Derartige Linien könnten dann mit den verschiedenen A β -exprimierenden Linien rekombiniert und die pyroGlu-Bildung untersucht werden. Außerdem sollte die Hemmung der humanen QC zur Unterdrückung der pyroGlu-Bildung führen, da A β und QC ko-sezerniert werden.

Humane QC wurde bereits erfolgreich in Schneider-Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses sekretorische Enzym eines Säugers in *Drosophila* korrekt prozessiert werden kann (Booth *et al.* 2003). Die Generierung von doppelt transgenen Fliegen erscheint daher möglich. Durch eine Ko-Expression von humaner QC und A β 3-42 sollte eine Bildung von pyroGlu-A β erreicht werden. Die Generierung von pyroGlu-A β 42 aus dem entsprechenden Glutamyl-Präkursor spiegelt die *in vivo*-Verhältnisse besser wider. Die Untersuchungen zur Substratspezifität der QC ergaben, dass Glutamyl-Peptide ca. 10⁵-fach schlechter umgesetzt werden als die entsprechenden Substrate mit N-terminalem Glutamin (Schilling *et al.* 2004). Dies ist unter anderem auf deutlich höhere K_M-Werte zurückzuführen (Schilling pers. Mitteilung). Daher sind vermutlich für die Hemmung der Glutamyl-Zyklisierung geringere Inhibitorkonzentrationen notwendig. Eine Modellierung der pathophysiologischen Prozessierung sollte demnach besser auf eine Glutamyl-Zyklisierung fokussieren. Durch eine Implementierung der humanen QC sollte zudem auch die beobachtete Toxizität der Substanzen umgangen werden können, da die zu testenden Inhibitoren eine höhere Spezifität für dieses Enzym aufweisen (vgl. Tab. 4.1). Die anhand der

pyroGlu-A β -Bildung aus A β 3-42(E3Q) erhaltenen Ergebnisse erbringen jedoch bereits erste wichtige Grundlagen für weitere Untersuchungen.

Um die Konzentration von A β in den Fliegen zusätzlich zu erhöhen, sollte in weiteren Arbeiten angestrebt werden Stämme aufzubauen, die mehrere Transgene exprimieren können. Es können einerseits solche Stämme etabliert werden, die ein Konstrukt mehrfach und von verschiedenen Chromosomen exprimieren, um die A β -Konzentration insgesamt zu steigern. Andererseits können auch verschiedene Konstrukte rekombiniert werden. Letzteres ist dahingehend interessant, da in Untersuchungen an transgenen Mäusen eine Ko-Expression von A β 1-40 und A β 1-42 stark plaquefördernd war (McGowan *et al.* 2005). Obgleich mit dem Unterbleiben der Detektion von pyroGlu-A β 3-42 aus A β 3-42 ein ursprüngliches Ziel der Arbeit nicht erreicht werden konnte, lieferten die Analysen erste Ansatzpunkte für eine zukünftige Testung von QC-Inhibitoren in *Drosophila*.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein System etabliert werden, das die Generierung N-terminal verkürzter A β -Peptide in *Drosophila* ermöglicht. Dieses System umfasst A β -Peptide, deren N-terminale AS zukünftig individuell festgelegt werden kann und die als Signalsequenz die TRH-Prä-Pro-Sequenz besitzt. Darüberhinaus sind erstmals die Expression und der Nachweis der pyroGlu-A β -Bildung in *Drosophila* gelungen. Damit wurde eine grundlegende Basis für ein neues *Drosophila*-Modellsystem geschaffen. Die Etablierung dieses Modellsystems ermöglicht nun analog die Expression weiterer verkürzter A β -Spezies und die weiterführende Untersuchung der N-terminalen Modifizierung, insbesondere der pyroGlu-Bildung.

Die gegenüber der humanen QC geringe Enzymaktivität der *Drosophila*-QCs scheint eine Ursache bei der unzureichenden pyroGlu-Bildung der A β -exprimierenden Linien zu sein. Darüberhinaus ist eine deutliche QC-Überexpression notwendig, um pyroGlu-Bildung in einer A β 3-42-exprimierenden Zellkultur nachzuweisen (Cynis *et al.* 2006). Das legt die Vermutung nahe, dass aus diesem Grund keine pyroGlu-Bildung von A β in A β 1-42- und A β 3-42-exprimierenden transgenen Fliegen nachweisbar war. Im Umkehrschluss sollte die

Überexpression humaner QC in A β -exprimierenden Fliegen eine pyroGlu-Bildung zur Folge haben. Dazu könnten in Zukunft transgene, humane QC-exprimierende *Drosophila*-Linien hergestellt werden. Nach der Kreuzung mit einer stark A β 3-42-exprimierenden Linie sollte eine pyroGlu-A β -Bildung nachweisbar und durch Behandlung mit QC-Inhibitoren zu unterdrücken sein. Dieses doppelt transgene Modell könnte zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Linien bei der weiteren Charakterisierung von QC-Inhibitoren Anwendung finden.

5. Zusammenfassung

N-terminal verkürzte Amyloid- β -Peptide ($A\beta$) spielen offenbar eine wesentliche Rolle im Verlauf und der Schwere der Alzheimer'schen Demenz (AD). Insbesondere durch Pyroglutamylierung modifizierte Peptide, denen eine erhöhte Stabilität, beschleunigte Aggregation und Neurotoxizität unterstellt wird, stellen eine Hauptform dar. Für die Entstehung dieser N-terminalen Modifikation werden in neueren Untersuchungen Glutaminylzyklasen (QCs) verantwortlich gemacht, die daher ein potentielles Zielenzym der Wirkstoffentwicklung darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals anhand des Modellsystems *Drosophila melanogaster* die Rolle von QC für die Entstehung von $A\beta_{N3pE}$ untersucht sowie P150/03 als ein Inhibitor der QC getestet. Anhand von Datenbankanalysen konnten Gene für *Drosophila*-QCs identifiziert werden, die mit CG32412 und CG5976 annotiert sind. Ein Vergleich der Primärstrukturen der QCs weist auf verschiedene subzelluläre Lokalisationen der Enzyme hin. Mittels homologer Expression der cDNAs in S2-Zellen und anschließender Zellfraktionierung und Western-Blot Analyse bzw. immunzytologisch konnte eine mitochondriale Lokalisation von CG5976B sowie die Sezernierung von CG32412 belegt werden. Transgene *Drosophila*-Linien wurden generiert und charakterisiert, die die $A\beta$ -Spezies $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{3-42}$ sowie $A\beta_{3-42}(E3Q)$ in Form eines Fusionsproteins mit der TRH-Prä-Pro-Sequenz exprimieren. Die Prozessierung der Peptide konnte in S2-Zellen mittels ELISA und Western-Blot Analyse und in den transgenen Fliegen mittels ELISA verifiziert werden. Erste Behandlungsversuche mit P150/03, einem kompetitiven QC-Inhibitor, führten sowohl zur Verringerung der gesamt- als auch der pyroGlu- $A\beta$ -Konzentration in $A\beta_{3-42}(E3Q)$ exprimierenden Linien.

Im Rahmen der Arbeit wurden erstmals N-terminal verkürzte und pyroGlu-modifizierte $A\beta$ -Peptide in *Drosophila* exprimiert. Die Ergebnisse stellen eine Grundlage für weitere Modelle dar, die in die Charakterisierung von QC-Inhibitoren eingebunden werden können.

6. Literaturverzeichnis

Abraham G.N. and Podell D.N. (1981) Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal. *Mol Cell Biochem* **38 Spec No**, 181-190.

Allinson T.M., Parkin E.T., Turner A.J., Hooper N.M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, **74**, 342-352.

Almeida C.G., Takahashi R.H., Gouras G.K. (2006) Beta-Amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci*, **26**, 4277-4288.

Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr*, **64**, 146-148.

Alzheimer A. (1911) Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Ges Neurol Psychiatr*, **4**, 356-385.

Amrani A., Wintjens S., Zerhouni S., Azarkan M., Nijs M., Vincentelli J., Looze Y. (1997) The conversion of N-terminal glutaminyl residues of plant proteins into 5-oxoproline: a posttranslational modification in quest of a physiological function. *Rec Res Dev Phytochem*, **1**, 25-37.

Ando K., Oishi M., Takeda S., Iijima K., Isohara T., Nairn A.C., Kirino Y., Greengard P., Suzuki T. (1999) Role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation. *J Neurosci*, **19**, 4421-4427.

Awade A.C., Cleuziat P., Gonzales T., Robert-Baudouy J. (1994) Pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp): an enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu-proteins. *Proteins*, **20**, 34-51.

Baggerman G., Cerstiaens A., De Loof A., and Schoofs L. (2002) Peptidomics of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system. *J Biol Chem*, **277**, 40368-40374.

Bales K.R., Verina T., Dodel R.C., Du Y., Altstiel L., Bender M., Hyslop P., Johnstone E.M., Little S.P., Cummins D.J., Piccardo P., Ghetti P., Paul S.M. (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet*, **17**, 263-264.

6. Literaturverzeichnis

- Barnes K., Doherty S., Turner A.J. (1995) Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. *J Neurochem*, **64**, 1826-1832.
- Bateman Jr. R.C., Temple J.S., Misquitta S.A., Booth R.E. (2001) Evidence for essential histidines in human pituitary glutaminy cyclase. *Biochemistry*, **40**, 11246-11250.
- Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP3.0. *J Mol Biol*, **340**, 783-795.
- Bibel M., Richter J., Schrenk K., Tucker K.L., Staiger V., Korte M., Goetz M., Barde Y.A. (2004) Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci*, **7**, 1003-1009.
- Bielschowsky M. (1902) Die Silberimprägnation der Axenzylinder. *Neurol Centralbl*, **21**, 579-584.
- Birnboim H.C., Doley J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res*, **7**, 1513-1523.
- Bockers T.M., Kreutz M.R., Pohl T. (1995) Glutaminy cyclase expression in the bovine/porcine hypothalamus and pituitary. *J Neuroendocrinol*, **7**, 445-453.
- Boler J., Enzmann F., Folkers K., Bowers C.Y., Shally A.V. (1969) The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyro-glutamyl-histidil-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun*, **37**, 705-710.
- Booth R.E., Misquitta S.A., Bateman R.C.Jr. (2003) Human pituitary glutaminy cyclase: expression in insect cells and dye affinity purification. *Protein Expr Purif*, **32**, 141-146.
- Braak H., Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*, **82**, 239-259.
- Brand A., Perrimon N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.
- Buchholz M., Heiser U., Schilling S., Niestroj A., Zunkel K., Demuth H.U. (2006) The First Potent Inhibitors for Human Glutaminy Cyclase: Synthesis and Structure-Activity Relationship. *J Med Chem*, **49**, 664-677.

6. Literaturverzeichnis

Busby W.H., Humm J., Kizer J.S., Youngblood W.W., Quackenbush G.E. (1987) An enzyme(s) that converts glutamyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. *J Biol Chem* **262**, 8532-8536.

Buxbaum J.D., Thinakaran G., Koliatsos V., O'Callahan J., Slunt H.H., Price D.L., Sisodia S.S. (1998) Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci*, **18**, 9629-9637.

Chelius D., Jing K., Lueras A., Rehder D.S., Dillon T.M., Vizek A., Rajan R.S., Li T., Treuheit M.J., Bondarenko P.V. (2006) Formation of Pyroglutamic Acid from N-Terminal Glutamic Acid in Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal Chem*, **78**, 2370-2376.

Claros M.G., Vincens P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, **241**, 779-786.

Cook D.G., Forman M.S., Sung J.C., Leight S., Kolson D.L., Iwatsubo T., Lee V.M., Doms R.W. (1997) Alzheimer's A β (1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/ intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med*, **3**, 1021-1023.

Crowther D.C., Kinghorn K.J., Duthie F.A.I., Gubb D., Lomas D.A. (2004) Inhibitors of A β aggregation rescue a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. In *Proc of the 45th Ann Dros Res Conference; Washington DC, USA*. The Genetics Society of America; 2004:95.

Cruz I.P., Nilni E.A. (1996) Intracellular sites of prothyrotropin-releasing hormone processing. *J Biol Chem*, **271**, 22736-22745.

Cynis H., Schilling S., Bodnar M., Hoffmann T., Heiser U., Saido T. C., Demuth H.U. (2006) Inhibition of glutamyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, **1764**, 1618-1625.

Dahl S.W., Slaughter C., Lauritzen C., Bateman R.C.Jr., Connerton I., Pedersen J. (2000) *Carica papaya* glutamine cyclotransferase belongs to a novel plant enzyme subfamily: cloning and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr Purif*, **20**, 27-36.

Daigle I., Li C. (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**, 12045-12049.

DeStrooper B., Annaert W. (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*, **113**, 1857-1870.

6. Literaturverzeichnis

- Dick Jr. L.W., Kim C., Qiu D., Cheng K.C. (2006) Determination of the Origin of the N-Terminal Pyro-Glutamate Variation in Monoclonal Antibodies Using Model Peptides. *Biotech and Bioengineer*, **97**, 544-553.
- Edbauer D., Winkler E., Regula J.T., Pesold B., Steiner H., Haass C. (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*, **5**, 486-488.
- Finelli A., Kelkar A., Song H.J., Yang H., Konsolaki M. (2004) A model for studying Alzheimer's Abeta42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 365-375.
- Fischer W.H., Spiess, J. (1987) Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3628-3632.
- Fossgreen A., Bruckner B., Czech C., Masters C.L., Beyreuther K., Paro R. (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**, 13703-13708.
- Furukawa Y., Nakamaru K., Wakayama H., Fujisawa Y., Minakata H., Ohta S., Morishita F., Matsushima O., Li L., Romanova E., Sweedler J.V., Park J.H., Romero A., Cropper E.C., Dembrow N.C., Jing J., Weiss K.R., Vilim F.S. (2001) The enterins: a novel family of neuropeptides isolated from the enteric nervous system and CNS of Aplysia. *J Neurosci*, **21**, 8247-8261.
- Garavelli J.S. (2000) The RESID Database of protein structure modifications: 2000 update. *Nucleic Acids Res*, **28**, 209-211.
- Garden R.W., Moroz T.P., Gleeson J.M., Floyd P.D., Li L., Rubakhin S.S., Sweedler J.V. (1999) Formation of N-pyroglutamyl peptides from N-Glu and N-Gln precursors in Aplysia neurons. *J Neurochem*, **72**, 676-681.
- Ghisso J., Revesz T., Holton J., Rostagno A., Lashley T., Houlden H., Gibb G., Anderton B., Bek T., Bojsen-Moller M., Wood N., Vidal R., Braendgaard H., Plant G., Frangione B. (2001) Chromosome 13 dementia syndromes as a model of neurodegeneration. *Amyloid*, **8**, 277-284.
- Gilbert J.B., Price V.E., Greenstein J.P. (1949) Effect of anions on the non-enzymatic desamidation of glutamine. *JBC*, **180**, 209-218.
- Glenner G.G., Wong C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **120**, 885-890.

6. Literaturverzeichnis

- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., *et al.* (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease [see comments]. *Nature*, **349**, 704-706.
- Goedert M., Spillantini M.G. (2006) A Century of Alzheimer's Disease. *Science*, **314**, 777-781.
- Goldgaber D., Lerman M.I., McBride O.W., Saffiotti U., Gajdusek D.C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, **235**, 877-880.
- Goren H.J., Bauce L.G., Vale W. (1977) Forces and structural limitations of binding of thyrotrophin-releasing factor to the thyrotrophin-releasing receptor: the pyroglutamic acid moiety. *Mol Pharmacol*, **13**, 606-614.
- Gravina S.A., Ho L., Eckmann C.B., Long K.E., Otovos L., Younkin L.H., Suzuki N., Younkin S.G. (1995) Amyloid β protein ($A\beta$) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at $A\beta$ 40 or $A\beta$ 42(43). *J Biol Chem*, **270**, 7013-7016.
- Greeve I., Kretschmar D., Tschape J.A., Beyn A., Brellinger C., Schweizer M., Nitsch R.M., Reifegerste R. (2004) Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J Neurosci*, **24**, 3899-3906.
- Haass C., Lemere C.A., Capell A., Citron M., Seubert P., Schenk D., Lannfelt L., Selkoe D.J. (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*, **1**, 1291-1296.
- Hardy J., Duff K., Hardy K.G., Perez-Tur M., Hutton M. (1998) Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci*, **1**, 355-358.
- Hardy J., Selkoe D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353-356.
- Harigaya Y., Saido T.C., Eckman C.B., Prada C.M., Shoji M., Younkin S.G. (2000) Amyloid β Protein Starting at Position 3 Is a Major Component of the Amyloid Deposits in the Alzheimer's Disease Brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**, 422-427.

6. Literaturverzeichnis

- Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B., Selkoe D.J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci*, **19**, 8876-8884.
- Hartmann T., Bieger S.C., Bruhl B., Tienari P.J., Ida N., Allsop D., Roberts G.W., Masters C.L., Dotti C.G., Unsicker K., Beyreuther K. (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat med*, **3**, 1016-1020.
- Hass G.M., Hermodson M.A. (1981) Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry*, **20**, 2256-2260.
- He W., Barrow C.J. (1999) The A beta 3-Pyroglutamyl und 11-Pyroglutamyl Peptides Found in Senile Plaques Have Greater β -Sheet Forming and Aggregation Propensities in Vitro than Full-Length A β . *Biochemistry*, **38**, 10871-10877.
- Ho A., Sudhof T.C. (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**, 2548-2553.
- Hosoda R., Saido T.C., Otvos L.Jr., Arai T., Mann D.M., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Iwatsubo T. (1998) Quantification of modified amyloid peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 1089-1095.
- Huang K.F., Liu Y.L., Cheng W.J., Ko T.P., and Wang A.H. (2005) Crystal structures of human glutaminyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13117-13122.
- Hung A.Y., Koo E.H., Haass C., Selkoe D.J. (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9439-9443.
- Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., *et al.* (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, **393**, 702-705.
- Hwang J.R., Siekhaus D.E., Fuller R.S., Taghert P.H., Lindberg I. (2000) Interaction of *Drosophila melanogaster* prohormone convertase 2 and 7B2. Insect cell-specific processing and secretion. *J Biol Chem*, **275**, 409-417.

6. Literaturverzeichnis

Igaki T., Kanuka H., Inohara N., Sawamoto K., Núñez G., Okano H., Miura M. (2000) Drob-1, a *Drosophila* member of the Bcl-2 / CED-9 family that promotes cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 662-667.

Iijima K., Liu H.P., Chiang A.S., Hearn S.A., Konsolaki M., Zhong Y. (2004) Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: A potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6623-6628.

Iqbal K., Alonso A. del C., Chen S., Chohan M.O., El-Akkad E., Gong C.X., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., Tanimukai H., Grundke-Iqbal I. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, **1739**, 198-210.

Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Shirotani K., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Hama E., Lee H.J., Saido T.C. (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by Neprilysin. *Science*, **292**, 1550-1552.

Iwatsubo T. (2004) The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol*, **14**, 379-383.

Jarret J.T., Berger E.P., Lansbury P.T.Jr. (1993) The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, **32**, 4693-4697.

Kamal A., Almenar-Queralt A., LeBlanc J.F., Roberts E.A., Goldstein L.S. (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature*, **414**, 643-648.

Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill G. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-736.

Kawarabayashi T., Younkin L.H., Saido, T.C., Shoji M., Ashe K.H., Younkin S.G. (2001) Age-Dependent Changes in Brain, CSF, and Plasma Amyloid β Protein in the Tg2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci*, **21**, 372-381.

Kirkpatrick, R. B., Ganguly, S., Angelichio, M., Griego, S., Shatzman, A., Silverman, C., and Rosenberg, M. (1995). Heavy Chain Dimers as well as Complete Antibodies are Efficiently Formed and Secreted from *Drosophila* Via a BiP-Mediated Pathway. *J Biol Chem*, **270**, 19800-19805.

6. Literaturverzeichnis

- Klafki H.W., Wiltfang J., Staufenbiel M. (1996) Electrophoretic separation of betaA4 peptides (1-40) and (1-42). *Anal Biochem*, **237**, 24-29.
- Koo E.H., Sisodia S.S., Archer D.R., Martin L.J., Weidemann A., Beyreuther K., Fischer P., Masters C.L., Price D.L. (1990) Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 1561-1565.
- Kräpelin E. (1910) *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. II. Band* (Barth Verlag, Leipzig)
- Kuo Y.M., Emmerling M.R., Woods A.S., Cotter R.J., Roher A.E. (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 1988-1991.
- Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T.E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K.L., Wals P., Zhang C., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L. (1998) Diffusible, non-fibrillar ligands derived from Abeta 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 6448-6453.
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., *et al.* (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus [see comments]. *Science*, **269**, 973-977.
- Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S.H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M., McGowan E. (2001) Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science*, **293**, 1487-1491.
- Leyssen M., Ayaz D., Hebert S.S., Reeve S., De Strooper B., Hassan B.A. (2005) Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the *Drosophila* brain. *Embo J*, **24**, 2944-55.
- Lindsley D.L., Zimm G.G. (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, Calif. [u.a.]
- Lorent K., Overbergh L., Moechars D., De Strooper B., Van Leuven F., Van den Berghe H. (1995) Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience*, **65**, 1009-1025.

6. Literaturverzeichnis

- Lorenzo A., Yuan M., Zhang Z., Paganetti P.A., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Mautino J., Vigo F.S., Sommer B., Yankner B.A. (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, **3**, 460-464.
- Lührs T., Ritter C., Adrian M., Riek-Loher D., Bohrmann B., Döbeli H., Schubert D., Riek R. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 17342-17347.
- Luo L.Q., Martin-Morris L.E., White K. (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci*, **10**, 3849-3861.
- Luo L., Tully T., White K. (1992) Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron*, **9**, 595-605.
- Mahley R.W., Weisgraber K.H., Huang Y. (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 5644-5651.
- Martin-Morris L.E., White K. (1990) The *Drosophila* transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development*, **110**, 185-195.
- Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 4245-4249.
- Mayeux R. (1998) Evaluation and use of diagnostic tests in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **25**, 273-281.
- McGowan E., Pickford F., Kim J., Onstaed L., Eriksen J., Yu C., Skipper L., Murphy M.P., Beard J., Das P., Jansen K., DeLucia M., Lin W.L., Dolios G., Wang R., Eckman C.B., Dickson D.W., Hutton M., Hardy J., Golde T. (2005) A β Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition in Mice. *Neuron*, **47**, 191-199.
- Mentrup B., Londershausen M., Spindler K., Weidemann W. (1999a) Isolation and characterization of insect PC2-like prohormone convertase cDNA. *Insect Mol Biol*, **8**, 305-310.
- Mentrup B., Weidemann (1999b) The exon-intron organization of the prohormone convertase PC2 gene from the insect *Lucilia cuprina*. *Gene*, **27**, 29-33.

6. Literaturverzeichnis

- Messer M. (1963) Enzymatic cyclization of L-glutamine and L-glutaminyl peptides. *Nature*, **197**, 1299.
- Mintun M.A., Larossa G.N., Sheline Y.I., Dence C.S., Lee S.Y., Mach R.H., Klunk W.E., Mathis C.A., DeKosky S.T., Morris J.C. (2006) [11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology*, **67**, 446-452.
- Möller H.J., Hampel H., Teipel S. (2006) Anlässlich des hundertsten Jahrestages der Erstbeschreibung der Alzheimerschen Erkrankung: Die Bedeutung der Alzheimer-Krankheit für den Einzelnen und die Gesellschaft.
<http://psywifo.klinikum.uni-muenchen.de/forschung/index.html>
- Morty R.E., Bulau P., Pelle R., Wilk S., Abe K. (2006) Pyroglutamyl peptidase type I from *Trypanosoma brucei*: a new virulence factor from African trypanosomes that de-blocks regulatory peptides in the plasma of infected hosts. *Biochem J*, **394**, 635-645.
- Nillni E.A., Sevarino K.A., Jackson I.M.D (1993) Identification of the thyrotropin-releasing hormone prohormone and its post-translational processing in a transfected AtT20 tumoral cell line. *Endocrinology*, **132**, 1260-1270.
- Oberender P. (2006) Gesundheitspolitische und sozioökonomische Bedeutung von Demenzen.
<http://www.kompetenznetz-demenzen.de/fachpublikum/6289.html>
- Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kaye R., Metherate R., Mattson M.P., Akbari Y., LaFerla F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, **39**, 409-421.
- Park J.H., Gimbel D.A., GrandPre T., Lee J.K., Kim J.E., Li W., Lee D.H., Strittmatter S.M. (2006) Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci*, **26**, 1386-1395.
- Perez R.G., Soriano S., Hayes J.D., Ostaszewski B., Xia W., Selkoe D.J., Chen X., Stokin G.B., Koo E.H. (1999) Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42. *J Biol Chem*, **274**, 18851-18856.
- Petersen R.C., Smith G.E., Waring S.C., Ivnik R.J., Tangalos E.G., Kokmen E. (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.*, **56**, 303-308.

6. Literaturverzeichnis

- Piccini A., Russo C., Gliozzi A., Relini A., Vitali A., Borghi R., Giliberto L., Armirotti A., D'Arrigo C., Bachi A., Cattaneo A., Canale C., Torrassa S., Saido T.C., Markesbery W., Gambetti P., Tabaton M. (2005) β -Amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, **280**, 34186-34192.
- Pohl T., Zimmer M., Mugele K., Spiess J. (1991) Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10059-10063.
- Poorkaj P., Bird T.D., Wijsman E., Nemens E., Garruto R.M., Anderson L., Andreadis A., Wiederholt W.C., Raskind M., Schellenberg G.D. (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann neurol*, **43**, 815-825.
- Probst A., Langui D., Ulrich J. (1991) Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain Pathol*, **1**, 229-239.
- Radzicka A., Wolfenden R. (1996) Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases. *J Am Chem Soc*, **118**, 6105-6109.
- Roberson E.D., Mucke L. (2006) 100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. *Science*, **314**, 781-784.
- Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Woods A.S., Cotter R.J., Gowing E., Ball M.J. (1993) beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10836-10840.
- Rosen D.R., Martin-Morris L., Luo L.Q., White K. (1989) A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2478-2482.
- Rubin G.M., Spradling A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, **218**, 348-353.
- Russo C., Saido T.C., DeBusk L.M., Tabaton M., Gambetti P., Teller J.K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloide β -peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett*, **409**, 411-416.
- Russo C., Violani E., Salis S., Venezia V., Dolcini V., Damonte G., Benatti U., Arrigo C., Patrone E., Carlo P., Schettini G. (2002) Pyroglutamate-modified amyloid β -peptides – A β N3-(pE) – strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J Neurochem*, **82**, 1480-1489.

6. Literaturverzeichnis

- Saido T.C., Iwatsubo T., Mann D.M., Shimada H., Ihara Y., Kawashima S. (1995) Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron*, **14**, 457-466.
- Saido T.C., Yamao-Harigaya W., Iwatsubo T., Kawashima S. (1996) Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci Lett*, **215**, 173-176.
- Sang T.K., Jackson G.R. (2005) *Drosophila* Models of Neurodegenerative Disease. *J Am Soc Exp NeuroTherap*, **2**, 438-446.
- Schaffer M.H., Noyes B.E., Slaughter C.A., Thorne G.C., Gaskell S.J. (1990) The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. *Biochem J*, **269**, 315-320.
- Scheuner D., Eckmann C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T.D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy L., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S. (1996) Secreted Amyloid β -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**, 864-870.
- Schilling S., Hoffmann T., Rosche F., Manhart S., Wasternack C., Demuth H.U. (2002) Heterologous expression and characterization of human glutaminyl cyclase: evidence for a disulfide bond with importance for catalytic activity. *Biochemistry*, **41**, 10849-10857.
- Schilling S., Niestroy A.J., Rahfeld J.U., Hoffmann T., Wermann M., Zunkel K., Wasternack C., Demuth H.U. (2003) Identification of human glutaminyl cyclase as a metalloenzyme. Potent inhibition by imidazole derivatives and heterocyclic chelators. *J Biol Chem*, **278**, 49773-49779.
- Schilling S., Hoffmann T., Manhart S., Hoffmann M., Demuth H.U. (2004) Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett*, **563**, 191-196.
- Schilling S., Lauber T., Schaupp M., Manhart S., Scheel E., Böhm G., Demuth H.U. (2006) On the Seeding and Oligomerization of pGlu-Amyloid peptides (*in vitro*). *Biochemistry*, **45**, 12393-12399.
- Schilling S., Lindner C., Koch, B., Wermann M., Rahfeld J.U., von Bohlen A., Rudolph T., Reuter G., Demuth H.U. (2007) Isolation and characterization of glutaminyl cyclases from *Drosophila*: evidence for enzyme forms with different subcellular localization. *Biochemistry*, noch nicht erschienen.

6. Literaturverzeichnis

- Schönknecht P., Pantel J., Kruse A., Schröder J. (2005) Prevalence and natural course of aging-associated cognitive decline in a population based sample of "young-old" subjects. *American Journal of Psychiatry*, **172**, 2071-2077.
- Seiki M. (1990) Amplification of genomic DNA. In: PCR-Protocols-A guide to methods and applications. *Academic Press*, pp 13-20.
- Selkoe D.J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, **8**, 447-453.
- Selkoe D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, **81**, 741-766.
- Selkoe D., Kopan R. (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 565-597.
- Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., *et al.* (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease [see comments]. *Nature*, **375**, 754-760.
- Simons M., Schwarzler F., Luthjann D., von Bergmann K., Beyreuther K., Dichgans J., Wormstall H., Hartmann T, Schulz J.B. (2002) Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: a 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Neurol.*, **52**, 346-350.
- Sinha S., Anderson J.P., Barbour R., Basi G.S., Caccavello R., Davis D., Doan M., Dovey H.F., Frigon N., Hong J., Jacobson-Croak K., Jewett N., Keim P., Knops J., Lieberburg I., Power M., Tan H., Tatsuno G., Tung J., Schenk D., Seubert P., Suomensaaari S.M., Wang S., Walker D., John V., *et al.* (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain [see comments]. *Nature*, **402**, 537-540.
- Slunt H.H., Thinakaran G., Von Koch C., Lo A.C., Tanzi R.E., Sisodia S.S. (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta- amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem*, **269**, 2637-2644.
- Soba P., Eggert S., Wagner K., Zentgraf H., Siehl K., Kreger S., Lower A., Langer A., Merdes G., Paro R., Masters C.L., Muller U., Kins S., Beyreuther K. (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J*, **24**, 3624-34.

6. Literaturverzeichnis

- Song I., Chuang C.Z., Bateman Jr. R.C. (1994) Molecular cloning, sequence analysis and expression of human pituitary glutaminyl cyclase. *J Mol Endocrinol*, **13**, 77-86.
- Sparks D.L., Sabbagh M.N., Connor D.J., Lopez J., Launer L.J., Browne P., Wasser D., Johnson-Traver S., Lochhead J., Ziolkowski C. (2005) Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol.*, **62**, 753-757.
- Sudoh S., Kawamura Y., Sato S., Wang R., Saido T.C., Qyama F., Sakaki Y., Komano H., Yanagisawa K. (1998) Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. *J Neurochem*, **71**, 1535-1543.
- Suzuki N., Cheung T.T., Cai X.D., Odaka A., Otvos L.Jr., Eckman C., Golde T.E., Younkin S.G. (1994) An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP717) mutants. *Science*, **264**, 1336-1340.
- Sykes P.A., Watson S.J., Temple J.S., Bateman R.C.J. (1999) Evidence for tissue-specific forms of glutaminyl cyclase. *FEBS Lett*, **455**, 159-161.
- Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A., St George-Hyslop P., Van Keuren M.L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D.M., Neve R.L. (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, **235**, 880-884.
- Thal L.J. (2006) Prevention of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **20**, 97-99.
- Thal L.J., Kantarci K., Reiman E.M., Klunk W.E., Weiner M.W., Zetterberg H., Galasko D., Praticò D., Griffin S., Schenk D., Siemers E. (2006) The Role of Biomarkers in Clinical Trials for Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **20**, 6-15.
- Tomlinson A., Kimmel B.E., Rubin G.M. (1988) rough, a *Drosophila* homeobox gene required in photoreceptors R2 and R5 for inductive interactions in the developing eye. *Cell* **55**: 771-784.
- Torroja L., Packard M., Gorczyca M., White K., Budnik V. (1999) The *Drosophila* beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, **19**, 7793-7803.
- Tseng B.P., Kitazawa M., LaFerla F.M. (2004) Amyloid beta-peptide: the inside story. *Curr Alzheimer Res*, **1**, 231-239.

6. Literaturverzeichnis

- Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, **213**, 1394-1397.
- Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, **286**, 735-741.
- Wasco W., Bupp K., Magendantz M., Gusella J.F., Tanzi R.E., Solomon F. (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**, 10758-10762.
- Wasco W., Gurubhagavatula S., Paradis M.D., Romano D.M., Sisodia S.S., Hyman B.T., Neve R.L., Tanzi R.E. (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet*, **5**, 95-100.
- Wang Y., Ha Y. (2004) The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell*, **15**, 343-353.
- Wetsel W.C., Liposits Z., Seidah N.G., Collins S. (1995) Expression of candidate pro-GnRH processing enzymes in rat hypothalamus and an immortalized hypothalamic neuronal cell line. *Neuroendocrinology*, **62**, 166-177.
- Wiltfang J., Esselmann H., Bibl M., Hüll M., Hampel H., Kessler H., Frölich L., Schröder J., Peters O., Jessen F., Luckhaus C., Pernecky R., Jahn H., Fiszer M., Maler J.M., Zimmermann R., Bruckmoser R., Kornhuber J., Lewczuk P. (2007) Amyloid β peptide ratio 42/40 but not A β 42 correlates with phosphor-Tau in patients with low- and high-CSF A β 40 load. *J Neurochem*, **101**, 1053-1059.
- Wintjens R., Belrhali H., Clantin B., Azarkan M., Bompard C., Baeyens-Volant D., Looze Y., Villeret V. (2006) Crystal structure of papaya glutaminyl cyclase, an archetype for plant and bacterial glutaminyl cyclases. *J Mol Biol*, **357**, 457-470.
- Wirhth O., Multhaup G., Bayer T.A. (2004) A modified beta-amyloid hypothesis: intraneural accumulation of the beta-amyloid peptide - the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry*, **91**, 513-520.
- Wolozin B. (2001) A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5371.

6. Literaturverzeichnis

Yan R., Bienkowski M.J., Shuck M.E., Miao H., Tory M.C., Pauley A.M., Brashier J.R., Stratman N.C., Mathews W.R., Buhl A.E., Carter D.B., Tomasselli A.G., Parodi L.A., Heinrikson R.L., Gurney M.E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity [see comments]. *Nature*, **402**, 533-537.

Yankner B.A., Dawes L.R., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite M.L., Neve R.L. (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, **245**, 417-420.

Yoshikawa K., Aizawa T., Hayashi Y. (1992) Degeneration *in vitro* of postmitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature*, **359**, 64-67.

Zheng H., Koo E.H. (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*, 1, 5.

Anhang

A1 Vektoren und Konstrukte

Tabelle A1 Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Vektoren und Konstrukte mit zugehörigem Insert, Tag und Verwendung.

Vektor	Insert	Tag	Nutzung
pBS	TRH A β 1-40	-	Original von probiodrug AG
	TRH A β 3-40	-	Original von probiodrug AG
	TRH A β 3-40(E3Q)	-	Original von probiodrug AG
	TRH A β 1-42	-	Original von probiodrug AG
	TRH A β 3-42	-	Original von probiodrug AG
	TRH A β 3-42(E3Q)	-	Original von probiodrug AG
pUAST	TRH A β 1-40	-	Transgene Stämme CS88-CS106, CS119
	TRH A β 3-40	-	Transgene Stämme CS65-CS77, CS118
	TRH A β 3-40(E3Q)	-	Transgene Stämme CS107-CS116
	TRH A β 1-42	-	Transgene Stämme CS22-CS36
	TRH A β 3-42	-	Transgene Stämme CS1-CS20
	TRH A β 3-42(E3Q)	-	Transgene Stämme CS38-CS60
pMT	TRH A β 1-42	-	Expression in Schneider-Zellen
	TRH A β 3-42	-	Expression in Schneider-Zellen
	TRH A β 3-42(E3Q)	-	Expression in Schneider-Zellen
pUAST	BiP-A β 1-42	-	Transgene Stämme NL1-NL9
	BiP-A β 3-42	-	Transgene Stämme NLE1-NLE5
	BiP-A β 3-42(E3Q)	-	Transgene Stämme NLQ1-NLQ13
pMT	BiP-A β 1-42	-	Expression in Schneider-Zellen
	BiP-A β 3-42	-	Expression in Schneider-Zellen
	BiP-A β 3-42(E3Q)	-	Expression in Schneider-Zellen
pOT	CG32412	-	Original EST Klon
pOT	CG5976A	-	Original EST Klon
pQE	CG5976B	-	Original EST Klon
pMT	CG5976B	-	Expression in Schneider-Zellen
	CG5976B	His	Expression in Schneider-Zellen
	CG5976B	V5, His	Expression in Schneider-Zellen
pMT	CG32412	-	Expression in Schneider-Zellen
	CG32413	His	Expression in Schneider-Zellen
pCDNA	hQC	-	Humane QC, Original von probiodrug AG
pUAST			Transformationsvektor
pCoBlast			Resistenzplasmid für Schneider-Zellen
pTurbo			Transposasequelle

A2 Stabile S2 Zelllinien

Tabelle A2 Im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte stabile S2 Zelllinien mit dem jeweiligen Insert und Tag, sowie pCoBlast als Resistenzplasmid.

Vektor	Insert	Tag
pMT	TRH A β 1-42	-
	TRH A β 3-42	-
	TRH A β 3-42(E3Q)	-
pMT	BiP-A β 1-42	-
	BiP-A β 3-42	-
	BiP-A β 3-42(E3Q)	-
pMT	CG5976B	-
	CG5976B	His
pMT	CG32412	-
	CG32413	His

A3 Transgene Stämme *Drosophila melanogaster*

Tabelle A3 Im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte transgene Stämme von *Drosophila melanogaster* mit Stammbezeichnung, transgenem Konstrukt, Insertionschromosom sowie homo- oder heterozygoter Lebensfähigkeit.

Nr.	Stamm	Konstrukt	Insertions- chromosom	Lebensfähigkeit hv-homozygot vital rl-rezessiv letal
1	CS 1	TRH-A β 3-42	2	hv
2	CS 2	TRH-A β 3-42	2	hv
3	CS 3	TRH-A β 3-42	2	hv
4	CS 4	TRH-A β 3-42	x	hv
5	CS 5	TRH-A β 3-42	2	hv
6	CS 6	TRH-A β 3-42	3	hv
7	CS 7	TRH-A β 3-42	2	hv
8	CS 8	TRH-A β 3-42	2	hv
9	CS 9	TRH-A β 3-42	2	hv
10	CS 10	TRH-A β 3-42	2	rl
11	CS 11	TRH-A β 3-42	2	hv
12	CS 12	TRH-A β 3-42	3	hv
13	CS 13	TRH-A β 3-42	3	hv
14	CS 14	TRH-A β 3-42	2	hv
15	CS 15	TRH-A β 3-42	2	hv
16	CS 16	TRH-A β 3-42	3	hv
17	CS 17	TRH-A β 3-42	3	hv
18	CS 18	TRH-A β 3-42	x	hv
19	CS 19	TRH-A β 3-42	3	hv

Anhang

20	CS 20	TRH-Aß 3-42	3	hv
21	CS 21	TRH-Aß 3-42	x	hv
22	CS 22	TRH-Aß 1-42	3	hv
23	CS 23	TRH-Aß 1-42	x	hv
24	CS 24	TRH-Aß 1-42	3	hv
25	CS 25	TRH-Aß 1-42	2	hv
26	CS 26	TRH-Aß 1-42	3	hv
27	CS 27	TRH-Aß 1-42	2	rl
28	CS 28	TRH-Aß 1-42	2	rl
29	CS 29	TRH-Aß 1-42	2	hv
30	CS 30	TRH-Aß 1-42	2	hv
31	CS 31	TRH-Aß 1-42	2	hv
32	CS 32	TRH-Aß 1-42	2	hv
33	CS 33	TRH-Aß 1-42	3	rl
34	CS 34	TRH-Aß 1-42	3	rl
35	CS 35	TRH-Aß 1-42	2	hv
36	CS 36	TRH-Aß 1-42	3	hv
37	CS 37	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	x	hv
38	CS 38	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	2	hv
39	CS 39	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
40	CS 40	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	2	hv
41	CS 41	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
42	CS 42	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	x	hv
43	CS 43	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	x	hv
44	CS 44	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	x	hv
45	CS 45	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
46	CS 46	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	rl
47	CS 47	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
48	CS 48	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
49	CS 49	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
50	CS 50	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
51	CS 51	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
52	CS 52	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
53	CS 53	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	x	hv
54	CS 54	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
55	CS 55	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	2	hv
56	CS 56	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
57	CS 57	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	hv
58	CS 58	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	rl
59	CS 59	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	rl
60	CS 60	TRH-Aß 3-42 (E3Q)	3	rl
61	CS 61	TRH-Aß 3-40	3	hv
62	CS 62	TRH-Aß 3-40	3	hv
63	CS 63	TRH-Aß 3-40	2	rl
64	CS 64	TRH-Aß 3-40	x	hv
65	CS 65	TRH-Aß 3-40	2	hv
66	CS 66	TRH-Aß 3-40	2	hv

Anhang

68	CS 68	TRH-Aß 3-40	x	hv
69	CS 69	TRH-Aß 3-40	3	hv
70	CS 70	TRH-Aß 3-40	3	hv
71	CS 71	TRH-Aß 3-40	x	hv
72	CS 72	TRH-Aß 3-40	3	hv
73	CS 73	TRH-Aß 3-40	3	rl
74	CS 74	TRH-Aß 3-40	x	hv
75	CS 75	TRH-Aß 3-40	2	hv
76	CS 76	TRH-Aß 3-40	3	hv
77	CS 77	TRH-Aß 3-40	2	hv
78	CS 78	TRH-Aß 3-40	x	hv
79	CS 79	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	2	hv
80	CS 80	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	2	hv
81	CS 81	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	2	hv
82	CS 82	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	x	hv
83	CS 83	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	2	hv
84	CS 84	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	3	hv
85	CS 85	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	x	hv
86	CS 86	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	3	rl
87	CS 87	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	3	hv
88	CS 88	TRH-Aß 1-40	2	hv
89	CS 89	TRH-Aß 1-40	x	hv
90	CS 90	TRH-Aß 1-40	3	hv
91	CS 91	TRH-Aß 1-40	3	hv
92	CS 92	TRH-Aß 1-40	3	hv
93	CS 93	TRH-Aß 1-40	3	hv
94	CS 94	TRH-Aß 1-40	3	rl
95	CS 95	TRH-Aß 1-40	3	hv
96	CS 96	TRH-Aß 1-40	x	hv
97	CS 97	TRH-Aß 1-40	2	hv
98	CS 98	TRH-Aß 1-40	2	hv
99	CS 99	TRH-Aß 1-40	3	hv
100	CS 100	TRH-Aß 1-40	2	hv
101	CS 101	TRH-Aß 1-40	2	hv
102	CS 102	TRH-Aß 1-40	2	hv
103	CS 103	TRH-Aß 1-40	2	rl
104	CS 104	TRH-Aß 1-40	3	rl
105	CS 105	TRH-Aß 1-40	3	hv
106	CS 106	TRH-Aß 1-40	3	hv
107	CS 107	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	2	hv
108	CS 108	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	3	rl
109	CS 109	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	x	hv
110	CS 110	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	2	hv
111	CS 111	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	x	hv
112	CS 112	TRH-Aß 3-40 (E3Q)	3	hv

Anhang

113	CS 113	TRH-A β 3-40 (E3Q)	2	rl
114	CS 114	TRH-A β 3-40 (E3Q)	3	hv
115	CS 115	TRH-A β 3-40 (E3Q)	2	hv
116	CS 116	TRH-A β 3-40 (E3Q)	x	hv
117	CS 117	TRH-A β 3-40	3	hv
118	CS 118	TRH-A β 3-40	3	hv
119	CS 119	TRH-A β 1-40	3	hv
120	NL1	BiP-A β 1-42	x	hv
121	NL2	BiP-A β 1-42	3	hv
122	NL3	BiP-A β 1-42	3	hv
123	NL4	BiP-A β 1-42	x	hv
124	NL5	BiP-A β 1-42	3	hv
125	NL6	BiP-A β 1-42	x	hv
126	NL7	BiP-A β 1-42	3	hv
127	NL8	BiP-A β 1-42	2	rl
128	NL9	BiP-A β 1-42	3	hv
129	NLE1	BiP-A β 3-42	3	hv
130	NLE2	BiP-A β 3-42	x	hv
131	NLE3	BiP-A β 3-42	2	hv
132	NLE4	BiP-A β 3-42	n.d.	
133	NLE5	BiP-A β 3-42	3	hv
134	NLQ1	BiP-A β 3-42 (E3Q)	2	rl
135	NLQ2	BiP-A β 3-42 (E3Q)	3	hv
136	NLQ3	BiP-A β 3-42 (E3Q)	3	rl
137	NLQ4	BiP-A β 3-42 (E3Q)	3	rl
138	NLQ5	BiP-A β 3-42 (E3Q)	n.d.	
139	NLQ6	BiP-A β 3-42 (E3Q)	n.d.	
140	NLQ7	BiP-A β 3-42 (E3Q)	3	hv
141	NLQ8	BiP-A β 3-42 (E3Q)	x	hv
142	NLQ9	BiP-A β 3-42 (E3Q)	3	hv
143	NLQ10	BiP-A β 3-42 (E3Q)	2	hv
144	NLQ11	BiP-A β 3-42 (E3Q)	2	hv
145	NLQ12	BiP-A β 3-42 (E3Q)	x	hv
146	NLQ13	BiP-A β 3-42 (E3Q)	2	rl

A4 Verwendete Vektoren

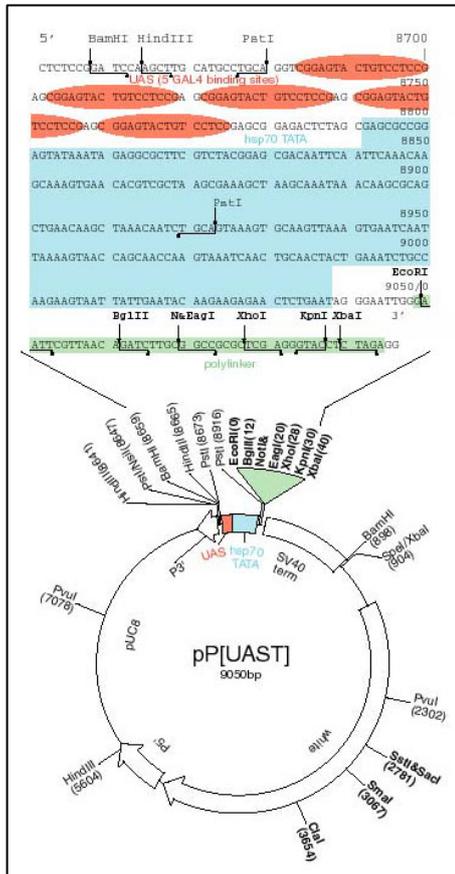


Abbildung A1 Schematische Darstellung des Transformationsvektors pP[UAST] (www.gurdon.cam.ac.uk/~brandlab/reagents/pUAST.html).

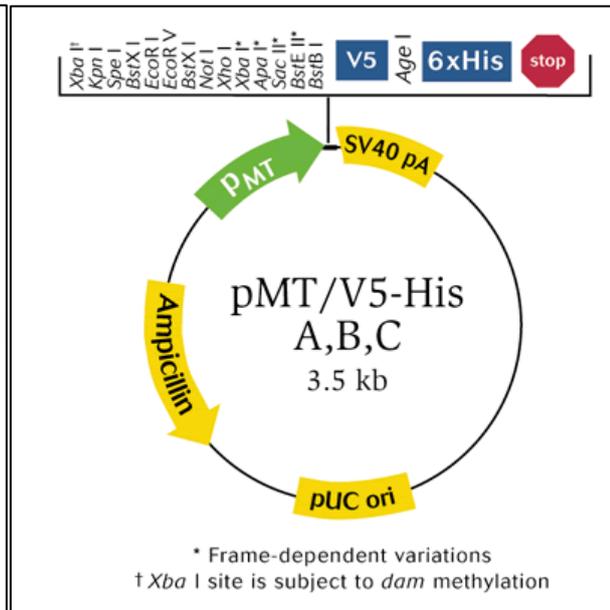


Abbildung A2 Schematische Darstellung des Transformationsvektors pM/V5-His A,B,C (www.invitrogen.com).

A5 Selektierte Fliegen

Tabelle A4 Anzahl selektierter Fliegen für den Versuch 3.5

Alter	PBS	P150/03 in PBS		
	Negativkontrolle	Niedrige Dosis (1 mM)	Mittlere Dosis (10 mM)	Hohe Dosis (100 mM)
10 Tage	139 Köpfe	116 Köpfe	keine positiven Fliegen überlebten	Larven starben am Tag nach der Behandlung
20 Tage	109 Köpfe	81 Köpfe		
40 Tage	82 Köpfe	31 Köpfe		

Tabelle A5 Anzahl selektierter Fliegen für den Versuch 3.7. Die Fliegen wurden direkt nach dem Schlüpfen (vorher) und beim Ernten im entsprechenden Alter (nachher) gezählt und daraus die Überlebensrate berechnet.

Alter		36				58			
		PBS-Kontrolle		3 mM P150/03		PBS-Kontrolle		3 mM P150/03	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
23-29d	vorher	177	157	51	54	63	56	22	7
23-29d	nachher	64	103	17	38	47	52	17	7
23-29d	%überlebend	36	66	33	70	75	93	77	100
16-22d	vorher	226	198	68	58	98	96	29	25
16-22d	nachher	97	121	25	36	77	85	21	21
16-22d	%überlebend	43	61	37	62	79	89	72	84
8-15d	vorher	188	209	69	62	100	80	33	45
8-15d	nachher	178	194	52	57	93	78	32	42
8-15d	%überlebend	95	93	75	92	93	98	97	93

Publikationsliste

Rudolph T., Yonezawa M., Lein S., Heidrich K., Kubicek S., Schäfer C., Phalke S., Walther M., Schmidt A., Jenuwein T., Reuter G. (2007) Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell*, **26**, 103-115.

Schilling S., Lindner C., Koch, B., Wermann M., Rahfeld J.U., von Bohlen A., Rudolph T., Reuter G., Demuth H.U. (2007) Isolation and characterization of glutaminyl cyclases from *Drosophila*: evidence for enzyme forms with different subcellular localization. *Biochemistry*, online erschienen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die den genutzten Werken wörtlich bzw. inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit wird erstmalig zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht. Ich habe mich zuvo noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Halle, den 11. September 2007

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. Gunter Reuter für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas und für die Möglichkeit, es in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen, bedanken.

Ebenso herzlich danke ich Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth, als Urheber dieses Alzheimer-Projekts, für die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Dr. Stephan Schilling danke ich für seine hervorragende fachliche Betreuung, für die technische Zusammenarbeit beim Anfertigen der ELISAs, für unermüdliches Korrekturlesen und für seine großartige moralische Unterstützung.

Für anregende Diskussionen, fachliche Anleitung und gute Fliegentipps möchte ich mich bei Dr. Thomas Rudolph bedanken.

Dr. Bernd Lindner danke ich für tapferes und fleißiges Manuskriptlesen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Drosophilagenetik gilt mein Dank für das gute Arbeitsklima und für die sozialen Aktivitäten, besonders hervorgehoben seien hier Matthias, Manu und Sandy.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich auch in schwierigen Phasen immer unterstützt haben, und natürlich meinem Ehemann Hendrik.

LEBENS LAUF

CHRISTIANE LINDNER

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum	28. August 1979
Geburtsort	Weimar / Thüringen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet

SCHULBILDUNG

09/1986 - 07/1998	Abschluss: Abitur am Hoffmann von Fallersleben-Gymnasium Weimar Leistungsfächer: Deutsch und Biologie Abschlussnote: 1,6
-------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

HOCHSCHULBILDUNG

10/1998 - 03/1999	Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fachrichtung Biologie
04/1999 - 03/2004	Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachrichtung Biologie Diplom Abschlussnote: 1,4
05/2004 - 12/2006	Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie in Kooperation mit der probiodrug AG Halle Themenschwerpunkt: Alzheimer'sche Krankheit

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

09/2000	Schering AG Jena, Qualitätskontrolle, Werkstudentin
10/2000 - 12/2000	Bayer AG Leverkusen, Zentrale Forschung - Abteilung Mikrobiologie, Praktikum

03/2001	Vogelwarte Helgoland, Stationshelfer
07/2002 - 09/2002	University of Oxford, Department of Zoology, Praktikum
01/2002 - 08/2003	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik, studentische Hilfskraft
05/2003 - 03/2004	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik, Anfertigen der Diplomarbeit

BERUFSERFAHRUNG

05/2004 - 12/2006	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik, wissenschaftliche Mitarbeiterin
01/2007 - 04/2007	Verfassen der Dissertation
05/2007 - 06/2007	BBI - Bildungs- und Beratungsinstitut GmbH Halle, Teilnahme am Projekt „Career Women - International Business“
07/2007 - 08/2007	Hallesche Essig- und Senffabrik GmbH, Tollwitz, Betriebsleiterin

KENNTNISSE

Fremdsprachen	Englisch - sehr gut Französisch - Grundkenntnisse Russisch - Grundkenntnisse
PC	MS Office - Word, Excel, Powerpoint, Access Internetdatenbanken
Führerschein	Klassen B, C1, M, L

Halle / Saale, 11.09.2007