

**Molekulare und funktionelle Charakterisierung der
Neurodegeneration in der *RasGAP (vap)* Mutante
in *Drosophila melanogaster***

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
Claudia Kiermayer aus Osterhofen
2003

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 12.5.2003.

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly.

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Günter Hauska (Vorsitzender)
Prof. Dr. Stephan Schneuwly (1.Gutachter)
Prof. Dr. Ralph Witzgall (2.Gutachter)
Prof. Dr. Charlotte Helfrich-Förster (3. Prüfer)

Für meinen Vater
Herbert Kiermayer

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Botella, J.A., Kretzschmar, D., Kiermayer, C., Feldmann, P., Hughes, D.A., Schneuwly, S. (2003). Deregulation of the Egfr/Ras Signaling Pathway Induces Age-related Brain Degeneration in the *Drosophila* Mutant *vap*. *Mol Biol Cell.* 14(1):241-250.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	9
2.1. Neurodegeneration beim Menschen	10
2.2. <i>Drosophila</i> als Modellorganismus für Neurodegeneration	12
2.2.1. Ansätze mit 'reverse genetics'	12
2.2.2. Ansätze mit 'forward genetics'	14
2.3. Der Ras-GTPase Aktivator RasGAP	16
2.3.1. Struktur des <i>Drosophila</i> RasGAP Proteins	16
2.3.2. Funktion des <i>Drosophila</i> RasGAP Proteins	17
2.4. Der Ras-Signaltransduktionsweg	19
2.5. Die Bedeutung des Ras Signaltransduktionsweges in <i>Drosophila</i>	21
2.6. Zielsetzung	23
3. Material und Methoden	25
3.1. Material	26
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
3.1.2. Standardlösungen	26
3.1.3. Antikörper	26
3.1.4. Oligonukleotide	27
3.1.5. Fliegenstämme	28
3.2. Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1. Northern Blot	29
3.2.2. Reverse Transkription	29
3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
3.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	31
3.2.5. Reinigung von DNA aus Agarosegelen	31
3.2.6. Western Blot	31
3.2.7. Microarray Analyse	32
3.3. Immunhistochemie	33
3.3.1. Paraffinschnitte adulter Gehirne	33
3.3.2. Antikörperfärbung an Paraffinschnitten	33
3.3.3. Quantifizierung des Neurodegenerationsphänotyps	34
3.4. Verhaltenstest	34
4. Ergebnisse	35
4.1. Isolierung und Charakterisierung der <i>vap</i> Mutante	36
4.1.1. Isolierung der <i>vap</i> Mutante aufgrund progressiver Degeneration im Zentralen Nervensystem	36
4.1.2. Ultrastrukturelle Analyse des neuronalen Zelltodes	37

4.1.3.	Genetische und Molekulare Analysen identifizieren RasGAP als das in der <i>vap</i> Mutante betroffene Gen	39
4.2.	Expressionsanalyse	40
4.2.1.	Analyse der RasGAP Expression während der Entwicklung	40
4.2.2	Analyse der RasGAP Expression in den <i>vap</i> Mutanten	41
4.2.3	Vergleich der MAPK-Aktivität zwischen Wildtyp-Fliegen und <i>vap</i>	43
4.3.	Genetische Funktionsanalyse von RasGAP	45
4.3.1.	Rettungsversuch mit der wildtypischen RasGAP cDNA	45
4.3.2.	Rettungsversuche mit mutierten RasGAP cDNA Konstrukten	46
4.3.3.	Analyse genetischer Interaktionen mit dem EGFR/Ras Signalweg	48
4.4.	Analyse des veränderten phototaktischen Verhaltens der <i>vap</i> Mutante	53
4.4.1.	Die Phototaxisreaktion in der <i>vap</i> Mutante	53
4.4.2.	Rettung des Verhaltensphänotyps	55
4.4.3	Funktionelle Analyse mit verschiedenen cDNA Konstrukten	56
4.4.4.	Analyse genetischer Interaktion mit dem EGFR/Ras/MAPK Signaltransduktionsweg	58
4.5.	Microarrayanalyse	62
4.5.1.	Analyse der veränderten Genexpression in Köpfen der <i>vap</i> Mutante	62
4.5.2.	Einteilung der deregulierten Gene in funktionelle Gruppen	63
4.5.3.	Analyse der veränderten Genexpression in <i>vap</i> Larven	70
4.5.3.1.	Differentiell regulierte Gene in <i>vap</i> ² Larven	71
4.5.3.2.	Differentiell regulierte Gene in Larven die RasGAP überexprimieren	72
4.5.3.3.	Reziprok regulierte Gene	73
4.5.4.	Verifizierung der Microarray Daten ausgewählter Gene	74
4.5.5.	Identifizierung neuer genetischer Interaktionen	76
4.5.5.1.	Analyse der Interaktion von <i>vap</i> mit dem <i>β-amyloid precursor protein-like</i> Gen	77
4.5.5.1.1.	Analyse der veränderten Expression von <i>Appl</i> in der <i>vap</i> Mutante	77
4.5.5.1.2.	Analyse der genetischen Interaktion zwischen <i>vap</i> und <i>Appl</i>	79
4.5.5.2.	Analyse der Interaktion von <i>vap</i> mit dem <i>Glutamic acid decarboxylase 1</i> Gen	82
4.5.5.3.	Analyse der Interaktion von <i>vap</i> mit dem <i>Rpd3</i> Gen	84
4.5.5.3.1.	Analyse der Interaktion von <i>vap</i> mit Repressoren der Transkription	84
4.5.5.3.2.	Die Wirkung des HDAC Inhibitors Natriumbutyrat auf den Neurodegenerationsphänotyp	86
4.5.5.3.3.	Einfluss der Acetylierung auf den Verhaltensphänotyp	88
5.	Diskussion	90
5.1.	Mechanismen der Entstehung der Neurodegeneration in der <i>vap</i> Mutante	91
5.1.1.	Mutationen in RasGAP als Auslöser für den Neurodegenerationsphänotyp	91
5.1.2.	Autophagischer Zelltod als Mechanismus der Neurodegeneration	92
5.1.3.	Rolle des EGFR/Ras Signaltransduktionsweges bei der Entstehung der Neurodegeneration	93
5.1.4.	Rolle der RasGAP Proteindomänen für die Entstehung der Neurodegeneration	94
5.2.	Phototaktisches Verhalten der <i>vap</i> Mutante	97
5.2.1.	Ursachen des gestörten phototaktischen Verhaltens	97
5.2.2.	Rolle der EGFR/Ras/MAPK Signalkaskade beim phototaktischen Verhalten	98
5.2.3.	Einfluss der RasGAP Domänen für die Komplementation des Phototaxisphänotyps	99

5.3.	Identifizierung möglicher neuer Kandidaten für die Entstehung von Neuordegeneration	101
5.3.1.	Bedeutung der Microarray-Analyse	101
5.3.1.	Differentiell regulierte Gene in adulten Köpfen	101
5.3.2.	Differentiell regulierte Gene im dritten Larvenstadium	110
6.	Anhang	113
7.	Literaturangaben	123

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Struktur des <i>Drosophila</i> RasGAP Proteins	16
Abb. 2: Der Ras GTPase Zyklus	18
Abb. 3: Mögliche Interaktionspartner von p120RasGAP	19
Abb. 4: Der Ras Signaltransduktionsweg	20
Abb. 5: Induktion der R7 Photorezeptorzelle im <i>Drosophila</i> Auge	21
Abb. 6: Gegenüberstellung von bekannten Komponenten des Ras Signalweges in <i>Drosophila</i> und Säugetieren	22
Abb. 7: Neurodegenerationsphänotyp im Gehirn der <i>vap</i> Mutante	37
Abb. 8: Ultrastrukturelle Analyse im Medullakortex der <i>vap</i> Mutante	38
Abb. 9: Genetische Kartierung der <i>vap</i> Mutation	39
Abb. 10: Molekulare Charakterisierung der mutanten <i>vap</i> Allele	40
Abb. 11: Western Blot Analyse der RasGAP Expression in verschiedenen Entwick- lungsstadien	41
Abb. 12: Western Blot Analyse der mutanten <i>vap</i> Allele	42
Abb. 13: Western Blot Analyse der MAPK-Aktivität in der <i>vap</i> Mutante	44
Abb. 14: Rettung des Degenerationphänotyps der <i>vap</i> Mutante	46
Abb. 15: Funktionelle Analyse mit verschiedenen RasGAP cDNA Konstrukten	48
Abb. 16: Genetische Interaktion von <i>vap</i> ² mit Komponenten des EGFR/Ras Signal- transduktionsweges	51
Abb. 17: Quantifizierung der genetischen Interaktion von <i>vap</i> ² mit Komponenten des EGFR/Ras Signaltransduktionsweges.	52
Abb. 18: Verteilungskurven von <i>vap</i> ² Fliegen im Vergleich zu <i>CantonS</i> und <i>sine</i> <i>oculis</i> Fliegen ermittelt im Phototaxisapparat	54
Abb. 19: Verteilungskurven zur Rettung des Verhaltensphänotyps	56
Abb. 20: Verteilungskurven zur funktionellen Analyse	57
Abb. 21: Verteilungskurven zu den Interaktionen mit ‘upstream’ Elementen des EGFR/Ras/MAPK Signalweges	60
Abb. 22: Verteilungskurven zu den Interaktionen mit ‘downstream’ Elementen des EGFR/Ras/MAPK Signalweges	61
Abb. 23: Verifizierung der Microarraydaten mit Northern Blots	75
Abb. 24: Northern Blot Analyse des <i>Appl</i> Transkripts in adulten Köpfen	77
Abb. 25: Western Blot Analyse der veränderten <i>Appl</i> Expression in der <i>vap</i> Mutante	78
Abb. 26: Rekombinationsexperiment mit dem <i>App</i> ^d und dem <i>w vap</i> ² Allel	80
Abb. 27: Analyse der genetischen Interaktion zwischen <i>vap</i> ² und <i>Appl</i>	81
Abb. 28: Northern Blot Analyse des <i>Gad1</i> Transkripts in adulten Köpfen	82
Abb. 29: Analyse der genetischen Interaktion zwischen <i>vap</i> ² und <i>Gad1</i>	83

Abb. 30: Verteilungskurve zur Analyse der möglichen Interaktion zwischen <i>vap</i> und <i>Gad1</i>	84
Abb. 31: Northern Blot Analyse des <i>Rpd3</i> Transkripts in adulten Köpfen	85
Abb. 32: Analyse der genetischen Interaktion zwischen <i>vap</i> ² und <i>Rpd3</i> , und <i>Sin3A</i>	86
Abb. 33: Der Effekt von Natriumbutyrat auf den Neurodegenerationsphänotyp von <i>vap</i> ² Fliegen	87
Abb. 34: Einfluss der Allele <i>Rpd3</i> ⁰⁴⁵⁵⁶ und <i>Sin3A</i> ⁰⁸²⁶⁹ , und von NaBu auf den Verhaltensphänotyp	89
Abb. 35: Mögliches Modell für den Einfluss des EGFR/Ras Signalweges auf den Neurodegenerationsphänotyp	96
Abb. 36: Modell für den möglichen Einfluss des EGFR/Ras/MAPK Signalweges auf den Verhaltens phänotyp	100
Abb. 37: Mögliches Modell für den Einfluss der Deacetylierung auf den <i>vap</i> Neurodegenerationsphänotyp	109

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Vererbbare neurodegenerative Erkrankungen und die Gene, deren mutierte Allele mit ihrer Entstehung in Verbindung gebracht werden	12
Tabelle 2: Transgene Modelle für humane neurodegenerative Krankheiten in <i>Drosophila</i>	14
Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits	26
Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper	26
Tabelle 5: Liste der verwendeten Oligonukleotide	27
Tabelle 6: Liste der verwendeten Fliegenstämme	28
Tabelle 7: Quantifizierung der genetischen Interaktionen mit <i>vap</i> ² im Verhaltenstest	59
Tabelle 8: Differentiell exprimierte Gene in den adulten Köpfen der <i>vap</i> Mutante	64
Tabelle 9: Verifizierung der Microarraydaten	75
Tabelle 10: Differentiell exprimierte Gene in <i>vap</i> ² Larven	114
Tabelle 11: Differentiell exprimierte Gene in RasGAP überexprimierenden Larven	117
Tabelle 12: Gene, die sowohl in den Larven wie in den adulten Köpfen in die gleiche Richtung differentiell reguliert werden	121
Tabelle 13: Reziprok regulierte Gene in <i>vap</i> ² Larven und in Larven, in denen RasGAP überexprimiert wird	122

1. Zusammenfassung

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* hat sich in den letzten Jahren zunehmend als ein wertvoller Modellorganismus für die Erforschung humaner neurodegenerativer Erkrankungen erwiesen. In verschiedenen Studien wurden zum einen neue Gene identifiziert, die in Verbindung mit neuronalem Zelltod stehen, und zum anderen wurden Gene, die im Menschen mit Neurodegeneration in Verbindung gebracht werden, in *Drosophila* untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass der vollständige bzw. partielle Funktionsverlust des *vap* (*vacuolar peduncle*) Genes zu progressiver Neurodegeneration im adulten Gehirn von *Drosophila* führt, wobei der morphologische Prozess der absterbenden Neuronen auf einen Mechanismus hinweist, der als Autophagie bezeichnet wird. *vap* kodiert für das Ras GTPase-aktivierende Protein RasGAP, dass als negativer Regulator von Ras fungiert. Es konnte gezeigt werden, dass der *vap* Neurodegenerationsphänotyp durch verschiedene Elemente des EGFR/Ras Signaltransduktionsweges modifiziert werden kann. Eine funktionelle Analyse führte zu der Erkenntnis, dass die Expression der intakten SH2-SH3-SH2 Domäne des RasGAP Proteins ausreicht, um den neuronalen Zelltod zu verhindern, während die GAP-katalytische Domäne in diesem Zusammenhang entbehrlich scheint. Offensichtlich nimmt RasGAP über einen, von Ras unabhängigen Mechanismus Einfluss auf das Überleben von Neuronen, der jedoch über den EGFR/Ras Signalweg modifiziert werden kann.

Mutationen in RasGAP führen außerdem zu einem Verhaltensphänotyp, der aber im Gegensatz zum Neurodegenerationsphänotyp auf eine erhöhte Aktivierung von Ras zurückgeführt werden kann. Die funktionelle Analyse ergab, dass sowohl die SH2-SH3-SH2 Domänen als auch die GAP-katalytische Domäne für ein normales Verhalten funktionell vorliegen müssen. Zusätzlich konnte durch die Inhibierung des EGFR/Ras Signalweges eine Suppression dieses Phänotyps erreicht werden.

Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurde ein Überblick über die Gene erstellt, die aufgrund der Mutation in *RasGAP* in der *vap* Mutante im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimiert werden. Dieses Expressionsprofil verweist auf mögliche Mechanismen, die der Neurodegeneration in der *vap* Mutante unterliegen. So scheint z.B. die synaptische Plastizität, das Kalziumgleichgewicht oder das Ubiquitinsystem gestört zu sein. Interessanterweise handelt es sich dabei um Vorgänge, die auch beim neuronalen Zelltod im Menschen eine Rolle spielen, womit bestätigt wurde, dass Erkenntnisse, die man mit *Drosophila* als

Modellsystem erlangt, von Relevanz für den Menschen sind. Zusätzlich wurde für die drei Gene, *appl*, *Gad1* und *Rpd3* nachgewiesen, dass ihre veränderte Regulation im engen Zusammenhang mit den degenerativen Prozessen in der *vap* Mutante stehen.

2.Einleitung

2.1. Neurodegeneration beim Menschen

Der Begriff der ‘Neurodegeneration’ wird weitläufig in der Grundlagenforschung und in der Medizin im Zusammenhang mit pathologischen Vorgängen, die das Nervensystem betreffen diskutiert. Im engeren Wortsinn bezieht sich ‘Neuro’ auf Nervenzellen, und ‘Degeneration’ verweist auf deren Struktur- und Funktionsverlust. Tatsächlich stellen die neurodegenerativen Erkrankungen eine große Gruppe von heterogenen Erkrankungen dar, die durch einen fort schreitenden Verlust von mehr oder weniger spezifischen Neuronenpopulationen gekennzeichnet sind, der mit einem allmählichen Verlust geistiger Fähigkeiten einhergeht, und schließlich zum Tod der Patienten führt. Die Ursachen, die im einzelnen zur Entstehung der Neurodegeneration führen, sind noch weitgehend unbekannt. Selbst wenn kausale Zusammenhänge bekannt sind, kann über deren Bedeutung für die Entstehung der Erkrankung meist nur spekuliert werden, da sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren zu deren Ausprägung beitragen. Trotz des sporadischen Auftretens einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen, konnte gezeigt werden, dass viele dieser Erkrankungen vererbt werden, also eine genetische Basis aufweisen. Das gehäufte familiäre Auftreten bestimmter Erkrankungen bietet die Gelegenheit, deren genetischen Grundlagen zu erforschen. Zu den am meisten diskutierten neurodegenerativen Erkrankungen gehören beispielsweise die Alzheimersche Erkrankung (AD), Chorea Huntington (HD) und die Parkinsonsche Erkrankung (PD). Bei diesen Krankheiten sind erblich auftretende Formen der Demenz bekannt, für deren Entstehung bereits zugrundeliegende Gene identifiziert wurden, die im folgenden näher erörtert werden sollen.

Die Alzheimer Erkrankung

AD stellt mit einem Anteil von etwa 10% an der Weltbevölkerung die häufigste Form der Demenz in der älteren Bevölkerung dar (Selkoe, 1999). Sie ist zum einen durch den Verlust von Neuronen und Synapsen vorzugsweise in limbischen und kortikalen Gehirnregionen, und durch das Auftreten von intra- und extraneuronalen Ablagerungen gekennzeichnet (Yankner, 1996). Die intraneuronalen Ablagerungen, sogenannte neurofibrilläre Bündel (NFB) (Alzheimer, 1906), sind zytoplasmatische Bündel aus gepaarten, helikalen Filamenten. Sie bestehen aus hyperphosphorylierten, unlöslichen Formen des mikrotubulusassoziierten Proteins Tau (Selkoe, 1999). Bei den extrazellulären Ablagerungen handelt es sich um die senilen Plaques (Redlich, 1898), deren Hauptbestandteil das A β -Peptid ist, welches ein ca. 4

kDa großes Fragment des β -Amyloid Precursor Proteins (APP) darstellt (Glenner und Wong, 1984; Kang *et al.*, 1987). Obwohl die genaue Ursache für AD nicht bekannt ist, scheinen genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Die Untersuchung von familiären Fällen haben bis jetzt drei Gene mit dieser Krankheit in Verbindung gebracht: ungefähr die Hälfte aller autosomal dominant vererbten Formen von AD lassen sich auf Mutationen in dem *Amyloid precursor protein*, in *Presenilin 1 (PS-1)* oder *Presenilin 2 (PS-2)* zurückführen (Review: Roger und Rosenberg, 2000). Mutationen in jedem dieser Gene verursachen eine verstärkte Produktion des A β -Peptids (Scheuner *et al.*, 1996). Ein vierter Gen, das bei der sporadischen Form von AD eine Rolle spielt, ist Apolipoprotein E . Man nimmt an, dass das 4 ϵ Allel dieses Gens aufgrund seiner hohen Affinität für A β , dessen Aggregation fördert (Selkoe, 1999).

Die Parkinsonsche Erkrankung

Nach AD ist die Parkinsonsche Erkrankung, die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, von der ca. 1 % der 65 Jährigen betroffen sind, wobei dieser Wert auf 4-5 % bis zum Alter von 85 Jahren ansteigt. Charakterisiert wird diese Krankheit durch den selektiven Verlust dopaminproduzierender Neuronen in der Substantia nigra pars compacta. Dies führt zu einer Dopaminverarmung im Striatum, und zu der Bildung von intrazellulären Einschlüssen, den sogenannten Lewy Bodies (LB) (Dawson und Dawson, 2003). α -synuclein wurde als das erste Gen identifiziert, dass verantwortlich ist für eine autosomal rezessiv vererbte Form von PD (Polymeropoulos *et al.*, 1997), und eine entscheidende Rolle bei der Bildung von LBs zu spielen scheint (Goedert *et al.*, 1998). Für die autosomal dominanten Formen von PD werden die Gene *Parkin* , dessen Funktion bis jetzt unbekannt ist (Kitada *et al.*, 1998), *UCH-L1* das für eine Ubiquitin carboxyterminale Hydrolase L1 kodiert (Leroy *et al.*, 1998), und *DJ-1*, dessen Funktion ebenfalls noch nicht bekannt ist, diskutiert (Bonifati *et al.*, 2002).

Chorea Huntington

HD ist ebenfalls eine autosomal vererbte, dominante neurodegenerative Erkrankung, die durch den spezifischen Verlust von Neuronen im Striatum, gekennzeichnet ist (Feigin und Zgaljardic, 2002). Sie gehört neben verschiedenen Spinal Cerebelaren Ataxien (SCA1-6) zu der Gruppe der sogenannten Polyglutamin Erkrankungen, die durch die Expansion von CAG-Triplets, die für Glutamin kodieren, in bestimmten Genen verursacht werden. Bei jeder dieser Krankheiten bilden sich intranukleäre Einschlüsse in den betroffenen Neuronen, bestehend

aus fehlgefalteten Proteinen, die das mutierte Protein und Ubiquitin enthalten. (Review: Ross, 1997). Huntingtin (Htt) wurde 1993 identifiziert (Hoogeveen *et al.*, 1993), dessen mutiertes Allel zeigt im ersten Exon erhöhte CAG Wiederholungen. SCA1 und SCA3 werden ebenfalls durch Polyglutaminexpansionen in der kodierenden Region von *Ataxin-1* (SCA1) (Burright *et al.*, 1995) und *Ataxin-3* (SCA3) (Paulson *et al.*, 1997) verursacht.

Tabelle1: Vererbbare neurodegenerative Erkrankungen und die Gene, deren mutierte Allele mit ihrer Entstehung in Verbindung gebracht werden

Krankheit	Gen	Mutation/ Effekt	Referenz
AD	<i>App</i>	Erhöhte Produktion von Aβ	Suzuki <i>et al.</i> , 1994
	<i>PS1</i>	Erhöhte Produktion von Aβ	Scheuner <i>et al.</i> , 1996
	<i>PS2</i>	Erhöhte Produktion von Aβ	Scheuner <i>et al.</i> , 1996
	<i>ApoE4ε</i>	Verstärkte Aggregation von Aβ	Ma <i>et al.</i> , 1994
PD	<i>α-synuclein</i>	Fördert Bildung von Lewy Bodies	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997
	<i>Parkin</i>	-	Kitada <i>et al.</i> , 1998
	<i>UCH-L1</i>	-	Leroy <i>et al.</i> , 1998
	<i>Dj-1</i>	-	Bonifati <i>et al.</i> , 2002
HD	<i>Huntingtin</i>	Polyglutamin	Hoogeveen <i>et al.</i> , 1993
SCA1	<i>Ataxin-1</i>	Polyglutamin	Burright <i>et al.</i> , 1995
SCA3	<i>Ataxin-3</i>	Polyglutamin	Paulson <i>et al.</i> , 1997

2.2. Drosophila als Modellorganismus für Neurodegeneration

Die oben beschriebene Identifizierung von Genmutationen in Familien in denen neurodegenerative Erkrankungen gehäuft auftreten hat es ermöglicht, Modelle zu entwickeln, die helfen können diese Krankheiten zu untersuchen. Bei der Erforschung der zu Grunde liegenden molekularen Prozesse ist man auf Tiermodelle angewiesen, die einen methodisch leichten Zugang erlauben. Dazu gehört auch der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*, der im Zusammenhang mit Neurodegeneration bereits erfolgreich eingesetzt wurde, wobei sowohl ‘reverse’ als auch ‘forward’ genetische Ansätze verfolgt wurden (Review: Fortini und Bonini, 2000; Mutsuddi und Nambu, 1998).

2.2.1. Ansätze mit ‘reverse genetics’

Bei der Strategie der reversen Genetik, wurden die *Drosophila* Homologen oder die menschlichen Gene selbst, die mit bestimmten Krankheiten in Verbindung gebraucht werden,

entweder überexprimiert oder inaktiviert. Die daraus resultierenden Phänotypen, reproduzieren zum Teil die typischen Merkmale dieser Erkrankungen beim Menschen.

Modelle für AD

In einem Modell für AD wurden z.B. wildtypische und mutierte Formen des menschlichen *TAU* Gens in *Drosophila* exprimiert, was eine progressive Degeneration von spezifischen Neuronen, und die Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau Protein zur Folge hatte. Im Gegensatz zum Menschen bildeten sich jedoch nicht die typischen neurofibrillären Bündel (Wittman *et al.*, 2001). Die Überexpression von wildtypischen und mutierten menschlichem APP in *Drosophila* führte zu einem verstärktem Zelltod im Gehirn von Larven (Fossgreen *et al.*, 1998). In Fliegen, in denen das *Drosophila* Homologe APP-like (APPL) in Neuronen überexprimiert wurde, zeigten sich Defekte im Transport entlang der Axone (Torroja *et al.*, 1999a). Die normalen Funktionen von APP bzw. APPL sind weitgehend unbekannt, *in vitro* Experimente legten jedoch die Vermutung nahe, dass APP ein vesikulärer Rezeptor für Kinesin I sein könnte (Kamal *et al.*, 2000). Diese Hypothese wurde durch *in vivo* Untersuchungen in *Drosophila* gestützt (Gunawardena und Goldstein, 2001).

Modelle für PD

Durch die Expression von wildtypischem und mutiertem humanen *α-synuclein* wurde ebenfalls ein *Drosophila* Modell für die Parkinsonsche Erkrankung etabliert. Dessen Expression in dopaminergen Neuronen, führte zu einer altersabhängigen, progressiven Degeneration dieser Neurone. *α-synuclein* akkumulierte dabei in Lewy Body-ähnlichen Aggregaten, die wie die menschlichen Lewy Body mit Ubiquitin assoziiert waren. (Feany und Bender, 2000; Takahashi *et al.*, 2003). Es wird bereits nach Möglichkeiten gesucht, die toxische Wirkung von menschlichem *α-synuclein* in *Drosophila* zu mildern bzw. zu verhindern. Es zeigte sich z.B., dass durch die Koexpression von Hsp70 und *α-synuclein* die dopaminergen Neuronen vor einer Degeneration geschützt werden können. Die Bildung von Aggregaten blieb dabei erhalten, deren Assoziation mit Hsp70 konnte jedoch gezeigt werden. Man vermutet, dass Hsp70 die Toxizität der Aggregate verändern kann. (Auluck *et al.*, 2002)

Jackson und Kollegen (1998) exprimierten N-terminale Fragmente des humanen Huntingins, die 2, 75, und 120 Glutaminrepeats enthielten, im Auge von *Drosophila*. Wie im Menschen induzierte das Polyglutamin Htt progressive Degeneration in der Retina, in Verbindung mit intranukleären Einschlüssen. Auch die Expression von Ataxin-3 mit 27 oder 78

Glutaminrepeats induzierte Neurodegeneration im Fliegenauge (Warrik *et al.*, 1998). Beiden Studien war gemeinsam, dass die Schwere der Degeneration mit der Länge der Polyglutaminrepeats korrelierte. Im Falle der Überexpression von *Ataxin-1*, war nicht nur das durch Glutaminreste erweiterte, sondern auch das normale Protein für Neuronen toxisch (Fernandez-Funez *et al.*, 2000). Die Expression von Transgenen, die im Wesentlichen nur aus Polyglutaminresten bestanden, führte ebenfalls zum progressiven Zelltod und nukleären Einschlüssen. Wurde aber andererseits das *Drosophila dishevelled* Gen, dessen normale Polyglutaminrepeats auf 108 Reste erweitert worden waren, transgen exprimiert, war dies für die entsprechenden Zellen nicht toxisch. Dies deutet darauf hin, dass das Protein, das die Glutaminerweiterung aufweist, deren Toxizität beeinflussen kann. (Marsh *et al.*, 2000)

Tabelle 2: Transgene Modelle für humane neurodegenerative Krankheiten in *Drosophila*

Krankheit	Exprimiertes Protein	Effekt in <i>Drosophila</i>	Referenz
AD	Tau	Neurodegeneration, hyperphosphoryliertes Tau	Wittman <i>et al.</i> , 2001
	APP	Neurodegeneration	Fossgreen <i>et al.</i> , 1998
PD	α -synuclein	Neurodegeneration, zytoplasmatische Einschlüsse	Feany und Bender, 2000
HD	htt (2, 75 oder 120 Q)	Neurodegeneration, nukleäre Einschlüsse	Takahashi <i>et al.</i> , 2003 Jackson <i>et al.</i> , 1998
SCA1	Ataxin-1 (30 oder 82 Q)	Neurodegeneration, nukleäre Einschlüsse	Fernandez-Funez <i>et al.</i> , 2000
SCA3	Ataxin-3 (27 oder 78 Q)	Neurodegeneration, nukleäre Einschlüsse, Letalität	Warrik <i>et al.</i> , 1998
	Poly Q	Neurodegeneration, nukleäre Einschlüsse, Letalität	Marsh <i>et al.</i> , 2000

2.2.2. Ansätze mit ‘forward genetics’

Beim dem ‘forward’ genetischen Ansatz werden klassische Mutagenesen durchgeführt, bei denen Mutationen aufgrund eines bestimmten Phänotyps selektiert werden. Bereits vor über 20 Jahren wurde von Heisenberg und Böhl (1979) eine Methode zur Isolierung von Mutanten mit anatomischen Gehirndefekten etabliert. Dabei wurden auch Neurodegenerationsmutanten wie zum Beispiel die *Vacuolar medulla* (*Vam*) Mutante, oder die *swiss cheese* (*sbs*) Mutante, die beide eine progressive Vakuolisierung bestimmter Gehirnregionen zeigen, identifiziert. Ziel der Analyse der Gene, die der Neurodegeneration zugrundeliegen, ist es, allgemeingültige Zusammenhänge, die entscheidend sind für das Überleben bzw. das Absterben von Nervenzellen aufzudecken. In der Hoffnung diese auf andere Organismen und nicht zuletzt auf den Menschen übertragen zu können.

Das *sws* Gen kodiert für ein Homologes des Neuropathy Target Esterase Proteins aus Vertebraten. Das mutante *sws* Allel verursacht in *Drosophila* Degeneration in allen Gehirnregionen, der das Absterben von Neuronen und Gliazellen im Gehirnkortex zu Grunde liegt. Typisch für diese Mutante ist, dass die Neuronen und Axone mit abnorm vielen membranösen Schichten umwickelt sind (Kretzschmar *et al.*, 1997). Das Phänomen der Hyper- bzw. Hypomyelinisation von Nervenzellen kennt man auch von verschiedenen menschlichen Neuropathien, wie z.B. der Charcot-Marie-Tooth oder die Congenital Hypomyelination Erkrankung (Review: Warner *et al.*, 1999).

Spongecake und *eggroll* sind zwei Mutanten, die aufgrund ihrer verkürzten Lebensdauer isoliert wurden. Die histologische Analyse ihrer Gehirne zeigte, dass es sich bei beiden ebenfalls um Neurodegenerationsmutanten handelt. In der *spongecake* Mutante sind die Neuropile der optischen Loben von der Degeneration betroffen, wobei membrangebundene Vakuolen entstehen, die denen gleichen, die man aus der Creutzfeld-Jakob Erkrankung kennt. Die Degeneration in der *eggroll* Mutante verteilt sich über das ganze Gehirn, die Gliazellen und Neurone enthalten dabei multilaminare Strukturen, die man auch in der menschlichen Tay-Sachs Erkrankung identifiziert hat. (Min und Benzer, 1997)

In der Neurodegenerationsmutante *löchrig* (*loe*) ist eine Isoform der SNF4/AMP-aktivierten Protein Kinase mutiert, die einer Rolle in der Cholesterinhomöostase spielt, was zu einem niedrigen Level an Cholesterinestern in der Mutante führt. Die Degeneration der *loe* Mutante konnte durch eine Mutation in dem *Appl* Gen und durch das Füttern von Statin supprimiert werden. Statin ist ein Inhibitor der HMG-CoA Reduktase, und wird in der Behandlung von Alzheimerpatienten eingesetzt (Tschäpe *et al.*, 2002).

Welche Bedeutung die Erforschung dieser *Drosophila* Modelle für das Verständnis von humanen Erkrankungen hat, hängt jedoch davon ab, wie relevant Erkenntnisse über Neurodegeneration, die man in der Fruchtfliege findet, für die Verhältnisse beim Menschen sind. Hinsichtlich der motorischen Defekte, die die humanen Erkrankungen kennzeichnen, wird *Drosophila* kein vorteilhaftes Modell sein, da die morphologischen und physiologischen Unterschiede zwischen *Drosophila* und dem Menschen offensichtlich zu groß sind. Auf zellulärer Ebene sind die Gemeinsamkeiten groß: *Drosophila* und der Mensch weisen viele Gene auf, die in ihrer Sequenz und im Bezug auf ihre Funktion konserviert sind. Sie besitzen

gleiche Zellstrukturen, und ähnliche Signalkaskaden vermitteln Prozesse wie Signalübertragung in Zellen oder Musterbildung in der Entwicklung.

2.3. Der Ras-GTPase Aktivator RasGAP

Die *vap* Mutante, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, wurde in einem Screen nach neuen Neurodegenerationsmutanten, d.h. in einem ‘forward’ genetischen Ansatz, isoliert. Bei dem Gen, das in dieser Mutante ursächlich für das Entstehen des Degenerationsphänotyps ist, handelt es sich um den Ras-GTPase Aktivator *RasGAP* (Kapitel 4.1.).

2.3.1. Struktur des *Drosophila* RasGAP Proteins

In Säugetierzellen wurden vier verschiedene Typen von GAP Proteinen beschrieben: p120RasGAP, Neurofibromin, Gap1^m, Gap1^{IP4B} und SynGAP (Review: Donovan, 2002; Kim *et al.*, 1998). RasGAP das *Drosophila* Ortholog des menschlichen p120RasGAP wurde von Feldmann *et al.* 1999 identifiziert. RasGAP ist damit, neben Gap1 (Gaul *et al.*, 1992) und *Drosophila* NF1 (The *et al.*, 1997), das dritte Ras regulierende GAP-Protein, das bis jetzt in *Drosophila* bekannt ist. Die Aminosäuresequenz ist zwischen RasGAP und p120RasGAP zu 47 % identisch. Wie sein Säugetierhomologes, kann das *Drosophila* Protein in zwei Regionen unterteilt werden. Der N-terminale Teil enthält eine Tandemanordnung aus SH2-SH3-SH2 Domänen, eine PH und eine C2 Domäne. Der C-terminale Bereich beinhaltet die hoch konservierte GAP-katalytische Domäne.



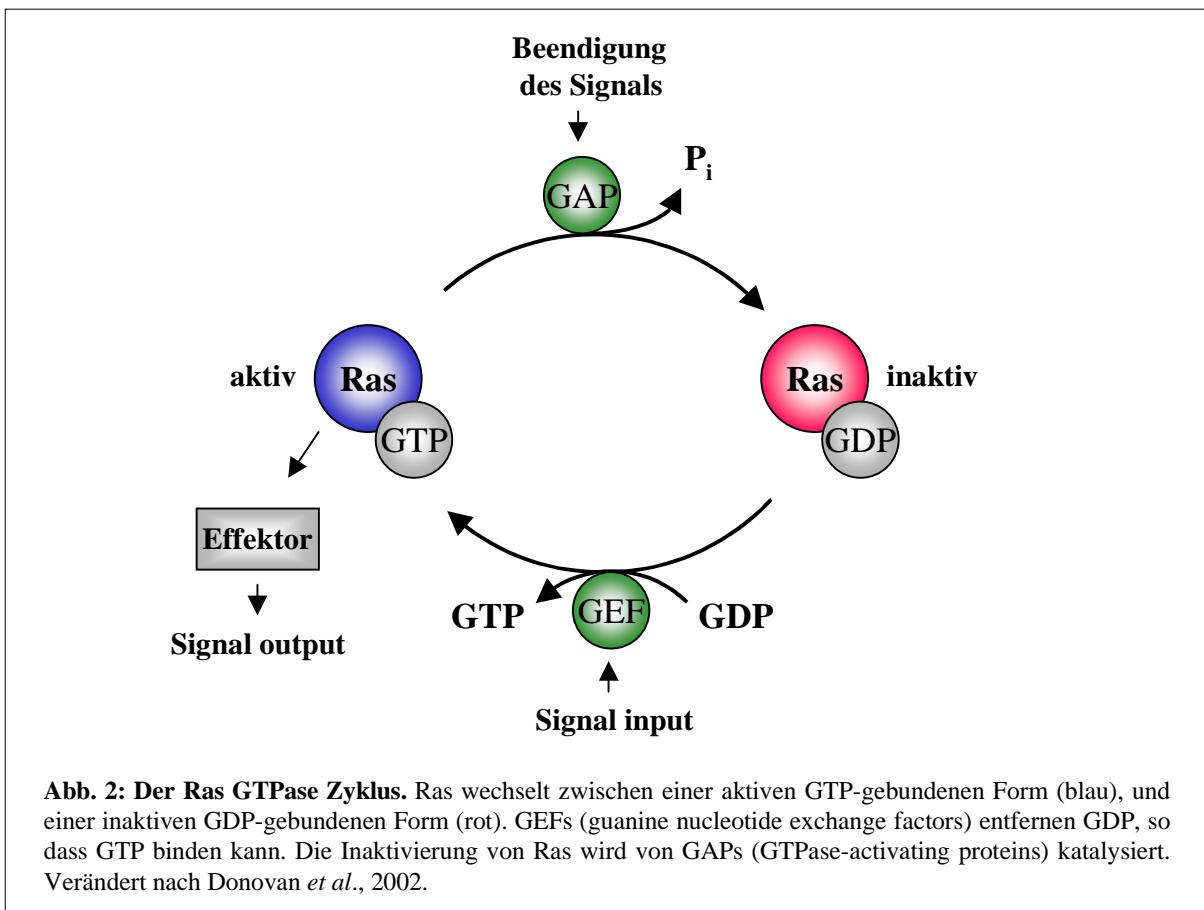
Abb. 1: Struktur des *Drosophila* RasGAP Proteins. Der N-Terminale Bereich des RasGAP Proteins beinhaltet eine Tandemanordnung aus zwei SH2 und einer SH3 Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, gefolgt von einer PH und einer C2 Domäne, die unter anderem Protein-Lipid-Interaktionen ermöglichen. Am C-Terminus befindet sich die GAP-katalytische Domäne, die die Aktivität von Ras negativ reguliert.

SH2 (Src homology 2) und SH3 Domänen sind Module, die Protein-Protein Interaktionen in von Proteintyrosinkinasen aktivierten Signaltransduktionswegen vermitteln. Dabei binden SH2 Domänen an Sequenzen, die Phosphotyrosine beinhalten, während SH3 Domänen Wechselwirkungen zu prolinreichen Peptiden vermitteln (Review: Schlessinger, 1994). Pleckstrin Homology (PH) Domänen finden sich in Proteinen, die an der Signalübertragung innerhalb von Zellen beteiligt sind, oder die an das Zytoskelett binden. Die Funktion dieser Domäne ist bis jetzt nicht genau definiert, es wird diskutiert, dass sie an heterotrimere G-Proteine, Lipide, phosphorylierte Ser/Thr-Reste oder an Membranen binden (Review: Lemmon *et al.*, 2002). Bei C2-Domänen handelt es sich um kalziumbindende Domänen, die zusätzlich zu Ca^{2+} an verschiedene Liganden, wie Phospholipide und intrazelluläre Proteine binden (Review: Duncan *et al.*, 2000). Die GAP-katalytische Domäne beschleunigt die intrinsische GTPase Aktivität von Ras (Review: Wittinghofer *et al.*, 1997).

2.3.2. Funktion des *Drosophila* RasGAP Proteins

GTPase aktivierende Proteine sind im allgemeinen negative Regulatoren von Ras. Feldmann und Kollegen (1999) konnten *in vitro* zeigen, dass *Drosophila* RasGAP wie sein Säugetierhomologes die GTPase-Aktivität von H-Ras aus Säugetieren stimulieren kann. Ras Proteine sind Proteine die an der Plasmamembran verankert werden, und die Guanin-Nukleotide binden. Sie werden als molekulare Schalter bezeichnet, da sie einen Wechsel zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Konformation durchlaufen (Abb. 2).

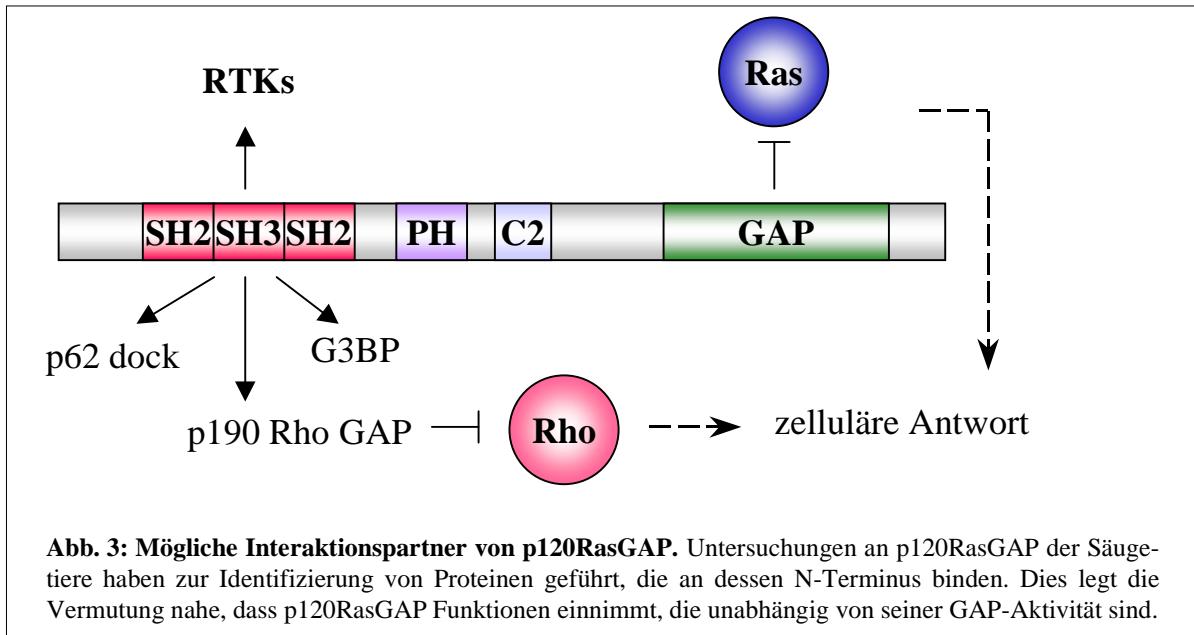
Dieser Zyklus wird auf zwei Arten reguliert. GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktivieren Ras, indem sie den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP stimulieren. GAPs (GTPase activating proteins) erhöhen die intrinsische GTPase Aktivität der Ras Proteine, wodurch das gebundene GTP mit einer erhöhten Rate zu GDP hydrolysiert wird (Review: Wittinghofer *et al.*, 1997).



Es wurde gezeigt, dass RasGAP als Inhibitor von Signalwegen agieren kann, die *in vivo* über Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und Ras vermittelt werden. Seine Überexpression supprimierte Phänotypen im Flügel von *Drosophila*, die durch aktivierte Formen von Heartless und Breathless, zwei RTKs die zur FGF- (fibroblast growth factor) Rezeptor Familie gehören, induziert wurden (Feldman *et al.*, 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass RasGAP als negativer Effektor des Torso Signalweges fungiert, der in der Embryonalentwicklung die terminalen Strukturen spezifiziert (Cleghon *et al.*, 1998).

Möglicherweise übernimmt RasGAP aber auch Funktionen, die unabhängig von seiner GAP-Aktivität sind (Abb.3). Im Falle des p120RasGAP Proteins wurden Interaktionspartner identifiziert, die an dessen N-Terminus binden. So binden die SH2 Domänen an bestimmte plasmamembranassoziierte RTKs, wie den platelet-direved groth factor β (PDGF)-Rezeptor (Anderson *et al.*, 1990), und an die cytosolischen Proteine p190RhoGAP (Settelmann *et al.*, 1992) und p62dock (Carpino *et al.*, 1997). Der N-Terminus inklusive SH2 und SH3 Domänen, kann Rho-abhängige Effekte z.B. bei der Bildung von Stressfasern inhibieren (McGlade *et al.*, 1993). Ein Protein, das mit der SH3 Domäne assoziiert ist G3BP, ein

cytoplasmatisches Protein, das RNA-bindende Motive beinhaltet (Parker *et al.*, 1996). Selbst eine Funktion für p120RasGAP als ein Effektor von Ras wird diskutiert (Tocque *et al.*, 1997).

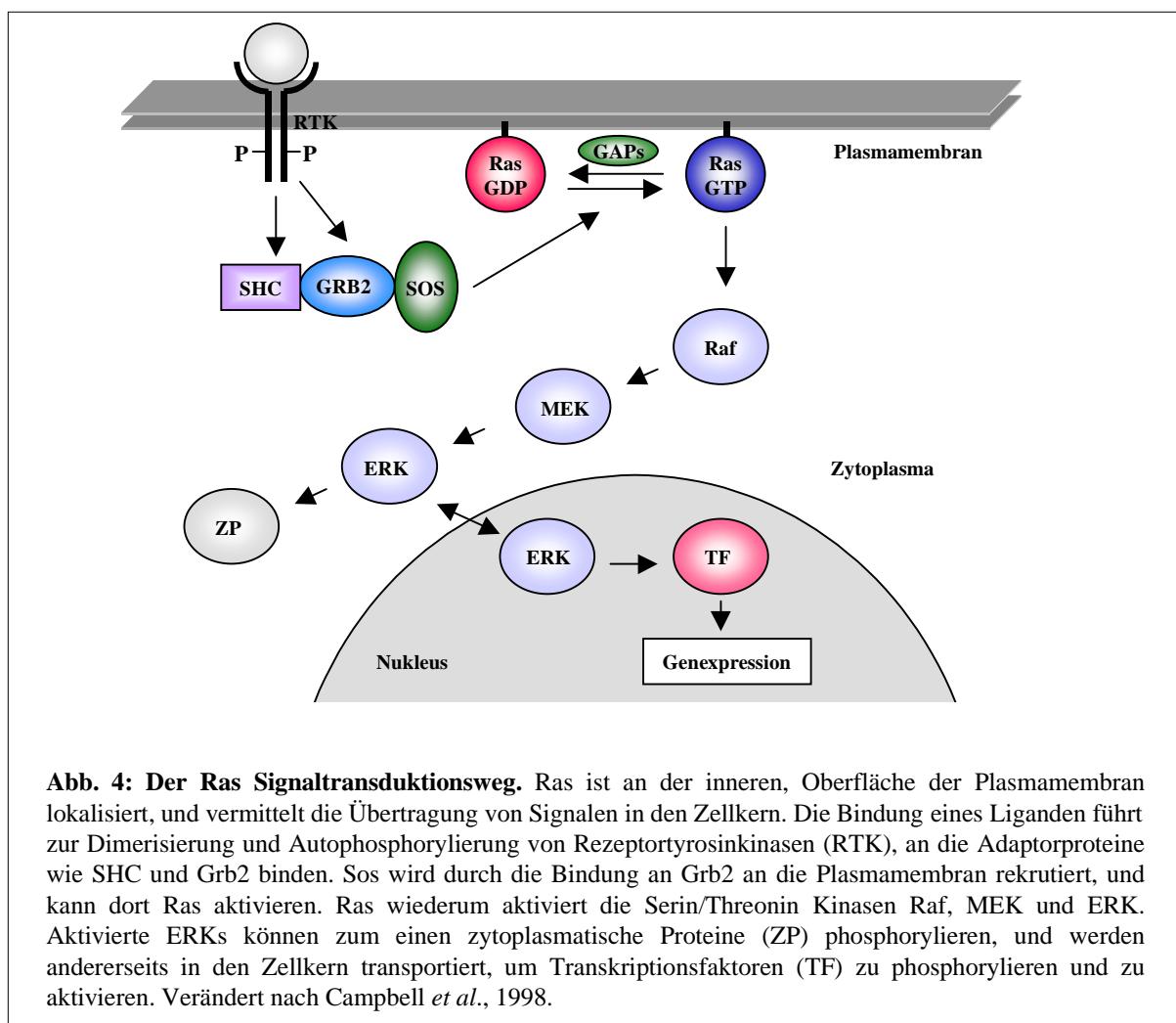


2.4. Der Ras-Signaltransduktionsweg

Signaltransduktionswege, die über Ras vermittelt werden, sind in Eukaryoten hoch konserviert, und kontrollieren Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod (Review: Crespo und Leon, 2002; Moodie und Wolfman, 1994). Säugetierzellen kodieren für drei Ras-Proteine von 21 kDa, H-, K- und N-Ras, die zur Familie kleiner GTPasen (20-35 kDa) gehören (Leon *et al.*, 1987). Sie wurden durch die transformierende Wirkung ihres viralen Gegenstücks v-Ras entdeckt, das von Mäuse-Sarkom-Viren kodiert wird. Dieses virale Onkogen unterscheidet sich von dem normalen Zellulären dadurch, dass es eine vermindernde GTPase-Aktivität aufweist, die es permanent aktiv erhält. Mutationen an spezifischen Aminosäurepositionen von Ras verhindern eine effektive Interaktion mit GAP, und führen zu einem konstitutiv aktivem Ras, diese aktivierende Mutationen werden in einer Großzahl von menschlichen Tumoren gefunden (Review: Bos, 1989).

Ras vermittelt im allgemeinen Signale von Rezeptoren der Plasmamembran über zytoplasmatische Proteine in den Nukleus. Dabei werden Rezeptortyrosinkinasen (RTKs)

durch ihre Liganden wie z.B. Wachstumsfaktoren aktiviert, die die Dimerisierung und Autophosphorylierung der RTKs induzieren. An die phosphorylierten Rezeptoren binden über spezifische Phosphotyrosin/SH2-Interaktionen Adaptorproteine wie Shc und Gbr2. Über die Bindung an Grb2 wird Sos, ein GEF, an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert Ras. Das aktive Ras Protein aktiviert daraufhin eine Kaskade von Kinassen: Raf, MEK (MAPK/ERK Kinassen 1 und 2) und ERK1/2 (MAPK: mitogen-activated protein kinase; ERK: extracellular receptor-stimulated kinase). Aktivierte ERKs phosphorylieren zum einen zytoplasmatische Zielproteine, und werden zum anderen selbst in den Nukleus befördert, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren (Review: Schlessinger, 1993; Campbell *et al.*, 1998).

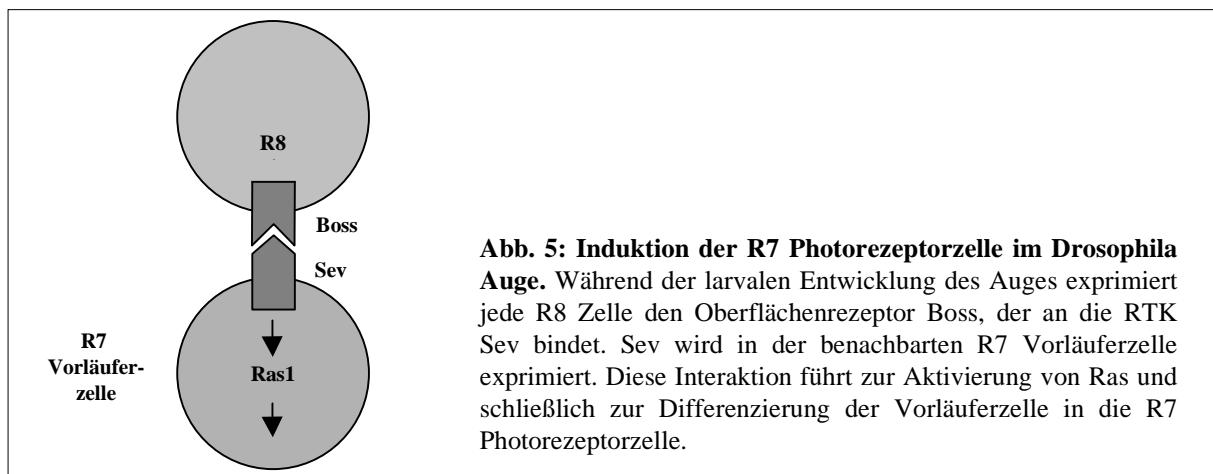


Diese vereinfachte Darstellung des Ras Signalweges impliziert eine lineare Abfolge der Ereignisse, die jedoch den tatsächlichen Bedingungen in der Zelle wohl nicht gerecht wird.

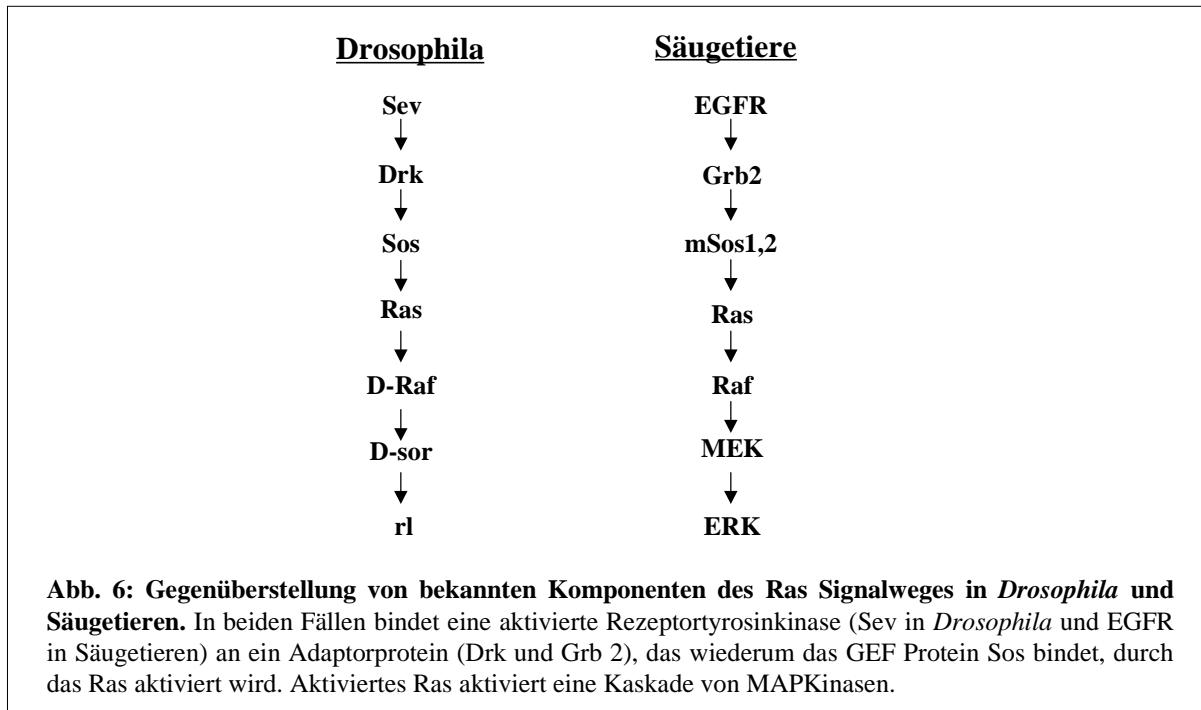
Man weiß heute, dass Signalwege im allgemeinen eine hohe Komplexität aufweisen, und ein Netzwerk bilden. Ras kann von verschiedenen Rezeptoren aktiviert werden, und Ras selbst gibt Signale an verschiedene Effektorproteine weiter. Jedes Element des Signalweges kann theoretisch Modulationen unterliegen (Review: Campbell *et al.*, 1998).

2.5. Die Bedeutung des Ras Signaltransduktionsweges in *Drosophila*

Drosophila besitzt ein Homologes für H-, K-, und N-ras, das Ras1 (Ras oncogen at 85D) genannt wird (Simon *et al.*, 1991). Zwei weitere Ras Proteine, Ras2 (Ras oncogen at 64D) und Ras3 (auch Rap1 genannt) wurden in *Drosophila* identifiziert, deren Homologie zum Ras der Vertebraten weniger ausgeprägt ist, und die andere Funktionen einzunehmen scheinen (Neuman-Silberberg, 1984). Von besonderer Bedeutung für das Verständnis der Funktion von Ras war die Aufklärung seiner Rolle bei der Spezifizierung der R7 Photorezeptorzelle im Komplexauge von *Drosophila*. Das Komplexauge von *Drosophila* ist aus ca. 800 identischen Einheiten aufgebaut, die Ommatidien genannt werden. Jedes Ommatidium besteht aus acht Photorezeptorzellen (R1-R8) und 12 nichtneuronalen Hilfszellen (Review: Wolf und Ready, 1993). 1976 wurde die *sev* (*sevenless*) Mutante identifiziert, in der sich die R7 Zelle nicht entwickelt (Harris *et al.*, 1976). *sev* kodiert für eine RTK, die in den R7 Zellen exprimiert wird. Weitere genetische Analysen zeigten, dass Boss (Bride of Sevenless), der Ligand für Sev, ausschließlich in der R8 Photorezeptorzelle exprimiert wird. Wenn Boss an den Rezeptor Sev bindet und ihn aktiviert, wird die Differenzierung der R7 Vorläuferzelle zur R7 Photorezeptorzelle induziert.



Es zeigte sich, dass dieser Effekt über einen Ras1-Signalweg vermittelt wird, dessen Komponenten eine starke Homologie zu den Komponenten die man in Säugetierzellen gefunden hat aufweisen, und die gleichen Funktionen einnehmen: Das Adaptorprotein Drk (Downstream of receptor kinase) bindet an das aktivierte Sev Protein über eine SH2 Domäne, und bindet über zwei SH3 Domänen Sos (Son of sevenless). Das GEF Protein Sos aktiviert Ras1, das wiederum DRaf, Dsor (eine MAPKK) und Rolled (eine MAPK) aktiviert (Abb. 6) (Review: Schlessinger, 1993; Wassarman, 1995).



Die Aktivität von Ras1 in der Entwicklung von *Drosophila* ist nicht auf das Auge beschränkt. Es spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Oogenese, oder bei der Differenzierung der Imaginalscheiben, wobei es von verschiedenen RTKs stimuliert wird. Ras1 agiert stromabwärts des EGFR (epidermal growth factor receptor) z.B. in den Follikelzellen während der Oogenese (Schnorr und Berg, 1996), oder während der Entwicklung des ventralen Ektoderms (Golembio *et al.*, 1996). Ras1 ist eine Komponente des Signalweges stromabwärts des Torso-Rezeptors, der die terminalen Strukturen im Embryo spezifiziert (Hou *et al.*, 1995). Außerdem interagiert Ras1 mit den RTKs Breathless und Heartless (Reichman-Fried *et al.*, 1994; Beiman *et al.*, 1996).

Ras1 kontrolliert nicht nur die Differenzierung von Zellen, sondern auch deren Wachstum wie unter anderem Untersuchungen im Flügel von *Drosophila* zeigten. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression bzw. das Fehlen von Ras1 gegensätzliche Effekte für die Flügelzellen hatte. Zellen, in denen Ras1 nicht aktiv war waren kleiner, hatten reduzierte Wachstumsraten, und Akkumulierten in der G₁-Phase. Während die Aktivierung von Ras1 zu größeren Zellen, erhöhten Wachstumsraten führte, und den Übergang von der G₁ in die S-Phase unterstützte (Prober und Edgar, 2000).

Hinweise für eine mögliche weitere Funktion von Ras1 als ein wesentlicher Zellüberlebensfaktor kam aus Studien am sich entwickelnden Augen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Ras1 das Überleben von Photorezeptorzellen gewährleistet, indem es während der Entwicklung das proapoptotische Gen *hid* reprimiert. Dieser Effekt wird offensichtlich durch den EGFR/Ras/MAPK-Signalweg vermittelt. Es gibt Hinweise, dass das Hid Protein ein direktes Zielprotein der MAPK darstellt und durch Phosphorylierung durch dieselbe inhibiert wird (Bergmann *et al.*, 1998; Kurada und White, 1998). Zum anderen führt eine Überexpression von Argos, einem Inhibitor des EGFR/Ras Signalweges, zu extensivem Zelltod während der Augenentwicklung (Sawamoto *et al.*, 1998). Erwähnen muss man in diesem Zusammenhang aber auch, dass die Funktion von Ras1 für das Überleben von Zellen kontextabhängig ist. Die Aktivierung von Ras1 kann auch Zelltod induzierend wirken, wie Studien von Rubin und Kollegen (1998) mit Hilfe eines aktivierte Ras1 Proteins in Augenimaginalscheiben zeigen konnten.

Die oben erwähnten Studien wurden ausschliesslich während der Organentwicklung durchgeführt, während die Rolle des Ras1 Proteins in bereits differenzierten Geweben bzw. Zellen weit weniger beachtet wurde.

2.6 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, sollte der Einfluss des *RasGAP* Gens auf das Überleben von Neuronen im adulten Gehirn von *Drosophila* untersucht werden. Für die Analyse sollten verschiedene Allele der *RasGAP* Mutante *vap*, welche sich durch eine unterschiedlich starke Ausprägung der Neurodegeneration auszeichnen, näher charakterisiert werden. Hierfür sollte zunächst eine Untersuchung der RasGAP Expression klären, auf welcher Ebene –

transkriptional oder translational - der Funktionsverlust in den verschiedenen Mutanten anzusiedeln ist und inwieweit eine Korrelation mit dem Neurodegenerationsphänotyp besteht. Ferner sollten Rettungsexperimente mit verschiedenen RasGAP Rescuekonstrukten zeigen, ob erstens der RasGAP Funktionsverlust ursächlich für die Entstehung von Neurodegeneration ist und zweitens sollten die Funktionen der RasGAP Proteindomänen für das Auftreten von neuronalem Zelltod näher untersucht werden.

Da es sich bei RasGAP um einen negativen Regulator der Ras1 Funktion handelt, sollte im weiteren durch genetische Interaktionstudien die Rolle einzelner Komponenten des EGFR/RAS Signaltransduktionweges und deren Einfluss bei der Entstehung von Neurodegeneration näher beschrieben werden. Darüber hinaus wurden die verschiedenen *vap* Mutanten auch auf ihr phototaktisches Verhalten hin untersucht, da die Neurodegeneration neben dem Zentralgehirn auch die optischen Loben umfasst und somit eine Störung in der Reizverarbeitung nahe legte.

Abschließend war ein weiteres Ziel neue Kandidatengene zu identifizieren, die zusammen mit RasGAP an der Entstehung von Neurodegeneration beteiligt sind, und interessante Kandidaten in Hinblick auf eine mögliche Rolle in neurodegenerativen Prozessen zu charakterisieren. Hierfür wurde der Ansatz des Microarrays ausgewählt und nach Kandidaten-Genen gesucht, die im mutanten *RasGAP*-Hintergrund dereguliert exprimiert werden. Eine erste Auswahl von putativen Interaktoren wurde bereits getestet und wird in dieser Arbeit zum Schluss diskutiert.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Expand high Fidelity PCR System</i>	Roche
<i>Superscript II RT, DNA/RNA-Größenstandards</i>	Gibco BRL (Eggenstein)
Oligonukleotide	Invitrogen
<i>Biodyn A Nylonmembran 0,2 µm</i>	Pall (Dreieich)
<i>Protran Nitrocellulose Transfer Membran</i>	Schleicher&Schüll
<i>Megaprime DNA labeling Kit</i>	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit, RNeasy Mini Kit, RNeasy Midi Kit, Oligotex mRNA Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Vectastain Elite ABC Kit</i>	Vector Laboratories
<i>Enhanced Chemiluminescence Kit, Mouse IgG</i>	Amersham Pharmacia
dNTP Set	Roth (Karlsruhe)
<i>Taq Plus Long PCR System</i>	Stratagene (Heidelberg)
alle sonstigen Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	Amersham Pharmacia, BioRad (Hercules, CA), Biozym (Hess, Oldendorf), Difco (Detroit, MI), Fluka (Neu-Ulm), Merck, Roth
n-Butyric Acid B-5887 (Natriumbutyrat)	Sigma

3.1.2. Standardlösungen

Alle Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Protokollen von Ausubel *et al.* (1996) hergestellt.

3.1.3. Antikörper

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Tier	Verdünnung	Herkunft	Literatur
mab 49	Maus	1:1000 für Paraffinschnitte 1:100 für Western Blots	A. Hofbauer	Zinsmaier et al., 1990
anti-MAPK-P	Maus	1:2000	Sigma (M8159)	Gabay et al., 1997
anti-RasGAP	Ratte	1:3	D. Hughes	Feldmann et al., 1999
Ab952 (anti-App)	Kaninchen	1:4000	K. White	Torroja et al., 1996
anti-rat IgG HRP		1:5000	Pierce	
anti-mouse IgG HRP		1:1000	Amersham	
anti-rabbit		1:1000	Amersham	

3.1.4. Oligonukleotide

Tabelle 5: Liste der verwendeten Oligonukleotide		
Bezeichnung	Sequenz	Verwendungszweck; Annealingtemperatur
Ap1	5' TCTGCCCTGCGGAATCTCG 3'	Identifizierung der Ap1 ^d Mutatuation; 56°C
Ap2	5' CGCCTGCGGTAGCTGCCTCAT 3'	
Appl-1	5' GCGGAGTACGATAGCGGAGAGGAG 3'	Sondenherstellung für Ap1 Transkript; 56°C
Appl-2	5' TGCGCAGTGCCAGAATGTAGTCA 3'	
Gad1 1	5' CTTGGGGCGGTGGATTGTTGATG 3'	Sondenherstellung für Gad1 Transkript; 56°C
Gad1 2	5' CCTTGTGCCCGGTGTCGTAGC 3'	
Amy-d 1	5' ACTCCCCCGCGTATGTCCTTCCTT 3'	Sondenherstellung für Amy-d Transkript; 56°C
Amy-d 2	5' CGCGGCTACCTCGGCTGAA 3'	
Cbp53E 1	5' TTCCTGTGCCGCCAACGTGTTA 3'	Sondenherstellung für Cbp53E Transkript; 59°C
Cbp53E 2	5' GCGATATTTGGCCAGTGTAGCA 3'	
CG11533-1	5' CTCCAAGTACCATAGCA 3'	Sondenherstellung für CG11533 Transkript; 48°C
CG11533-2	5' GATTTTTGTTCTCCGTTGAC 3'	
Syn-1	5' CACTGCAACGGAAGCTGGAGAAG 3'	Sondenherstellung für Syn Transkript; 58°C
Syn-2	5' CCTGCGGCCGGGTGTATTTG 3'	
to-1	5' GTCCCGTGGGCATAACTCTAAC 3'	Sondenherstellung für to Transkript; 58°C
to-2	5' GGCTGGACTCCGGCTTCATC 3'	
Rpd3-1	5' TCCTCTTCGCGAATTGTCCTTG 3'	Sondenherstellung für Rpd3 Transkript; 58°C
Rpd3-2	5' TCATCTCATCGGCAGTGGCTTTAT 3'	
trc-1	5' CGCAGGCCAGGAGAAC 3'	Sondenherstellung für trc Transkript; 59°C
trc-2	5' AAAGCGTCATCATATCACCAACAG 3'	
SytI-1	5' CAAAACAAATGCCCAAATG 3'	Sondenherstellung für SytI Transkript; 59°C
SytI-1	5' CGACGAGGAACACGAGTATGATGA 3'	
RIS	5' TAGAGCTTGGGTGACTTGGCTCAGG 3'	Identifizierung vap ² Mutation; 60°C
S	5' ACAGGAAGAATAGATGTTCAGGGCTCGAG AT 3'	
CT18	5' TTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	Reverse Transkription

3.1.5. Fliegenstämme

Tabelle 6: Liste der verwendeten Fliegenstämme		
Stamm	Herkunft	Literatur
wt Canton-S	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
w ¹¹¹⁸	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
sine oculis	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
vap ¹		de Belle und Heisenberg, 1996
vap ²		Melzig <i>et al.</i> , 1998
vap ³		Melzig <i>et al.</i> , 1998
P [elav-GAL4]	Stammsammlung	Robinow und Withe, 1988
P [appl-GAL4]	Stammsammlung	Torroja <i>et al.</i> , 1999
P [hs-DER]	B. Shilo	Schweitzer <i>et al.</i> , 1955
P [UAS-Ras1]		Karim und Rubin, 1998
P [hs-rho]		Sturtevant <i>et al.</i> , 1993
P [UAS-RasGAP]	D. Hughes	Feldmann <i>et al.</i> , 1999
P [UAS-RasGAP ^{R695K}]	D. Hughes	
P [UAS-22.2]	D. Hughes	
P [UAS-17.20]	D. Hughes	
P [UAS-Gad1]	A. Prokop	
P [UAS-Appl ⁺]		Luo <i>et al.</i> , 1992
GAP1 ^{EP45}		Rørth, 1996
flb ^{top1P02}	M. Freemann	Clifford und Schüpbach, 1999
sty ^{S73}		Casci <i>et al.</i> , 1999
drk ^{k02401}	Bloomington	Roch <i>et al.</i> , 1999
Ras ^{deltaC40B}		Hou <i>et al.</i> , 1995
Appl ^d	K. Withe	Torroja <i>et al.</i> , 1996
Gad1 ^{A8}	Bloomington	Harrison <i>et al.</i> , 1995
Rpd ³⁰⁴⁵⁵⁶	Bloomington	Spradling <i>et al.</i> , 1999
Sin3A ⁰⁸²⁶⁹	Bloomington	Spradling <i>et al.</i> , 1999
Raf ¹¹⁻²⁹	Bloomington	Schalet, 1986
rl ^{10A}	M. Freemann	Biggs <i>et al.</i> , 1994
l(1) phl ^{CI10} ; rl ^{Sem}	E. Hafen	Brunner <i>et al.</i> , 1994
Sos ^{34Ea-6}	Bloomington	Woodruff and Ashburner, 1979
pnt ^{A88}	Bloomington	Yagi. and Hayashi, 1997
aop ¹	Bloomington	Gabay <i>et al.</i> , 1996
Fm7c	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1993

Alle Fliegenstämme wurden unter Standardbedingungen, in Gläsern mit Drosophilamedium (Maismehl, Agar, Sojamehl, Melasse, Malzextrakt, Hefe und 3g/l Nipagin als Fungizid), bei

25°C und 65 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Kreuzungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Für die Hitzeschockexperimente wurden die Fliegengläser, wenn nicht anders angegeben, in ein Wasserbad gegeben, in dem sich zyklisch fünf Stunden bei 28°C und eine Stunde bei 35°C abwechselten.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Northern Blot

Für die Northern Blot Hybridisierung wurde gesamtRNA nach der Guanidinium-Isothiocyanat-Methode aus adulten Köpfen von 5 Tage alten Fliegen, oder aus Larven nach Ausubel *et al.*, Unit 4.2 (1996) isoliert. Verwendet wurden je ca. 3g Fliegen, die in flüssigem N₂ abgesammelt worden waren, und deren Köpfe durch Vortexen und Sieben abgetrennt wurden. Die gesamt RNA wurde einer Poly-A-Selektion unterzogen, die mit dem *Oligotex mRNA Mini Kit* der Firma QIAGEN, entsprechend dem Protokoll des QIAGEN-Handbuches durchgeführt wurde. Die mRNA wurde nach Ausubel *et al.* Unit 2.1 (1996) gefällt und in 11 µl deionisiertem Formamid aufgenommen. Jeweils ca. 8 µg mRNA und 5 µg eines RNA-Größenstandards (Gibco BRL) wurden auf ein Formaldehydgel geladen, und die folgende Northern Hybridisierung ebenfalls nach Ausubel *et al.* (1996) durchgeführt. Mit dem *Megaprime DNA-Labelling system* der Firma Amersham life science wurden die genspezifischen Sonden mit [α ³² P]-dCTP markiert, wobei nach den Angaben des Herstellers vorgegangen wurde. Die quantitative Auswertung der Gele erfolgte mit dem *Cyclone Storage Phosphor System Phosphoimager* (Packard) in Kombination mit der *OptiQuant* Analysesoftware. Um mögliche Ladungsunterschiede auszugleichen, wurde die Signaldichte jeder auszuwertenden Bande (Net Digital Light Units/mm²) durch die Signaldichte der rp49 Bande in der gleichen Spur dividiert. Der Wert für die Wildtypkontrolle wurde auf 1.0 gesetzt, und die übrigen Werte relativ dazu berechnet.

3.2.2. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde je 5-10 µg gesamt RNA, die mit dem *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) isoliert worden war, eingesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 0,3 g Fliegen.

Standardansatz:

10 µl	mRNA + DEPC-H ₂ O
+ 2 µl	cDNA-Synthese Primer (dT ₁₈ , ca. 18pmol)
→	10 min 70°C; kurz zentrifugieren und auf Eis stellen
+ 4 µl	5 x Superscript II <i>first strand buffer</i> (<i>Gibco BRL</i>)
+ 2 µl	0.1 M DTT (<i>Gibco BRL</i>)
+ 1µl	dNTP (10 mM)
→	2 min bei 42°C
+ 1 µl	<i>Superscript II RT</i> (200 U; <i>Gibco BRL</i>)
→	50 min 42°C
1.3 µl	RNase A (0.5 µg/µl)
→	10 min 37°C
→	10 min 70°C

Für die anschließende PCR-Reaktion, die wie unter Punkt beschrieben durchgeführt wurde, wurden je 2 µl Reaktionsprodukt als Template eingesetzt.

3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Für die PCR-Reaktionen wurde das *Polymerase ExpandTM High Fidelity PCR System* der Firma Boehringer Mannheim verwendet.

Standardreaktionsansatz:

In einem Endvolumen von 25 µl wurden folgende Lösungen vereint:

400 nM	Primer 1
400 nM	Primer 2
100 nM	dNTPs
60 ng	Template
	10 x PCR-Puffer (<i>Low Salt Buffer</i>)
2.5 U	DNA-Polymerase (<i>Tag Plus Long Polymerase</i>)

Die Reaktionsansätze wurden mit 25 µl Mineralöl überschichtet. Es wurde standardmäßig 'hot start' -PCR (Chotná, 1992) durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

Die PCR-Reaktionen durchliefen im *RoboCycler Gradient 40* (Stratagene) folgendes Programm:

95°C	4 min	1 x
95°C	30 sec	
X°C	1 min	30 x
68°C	2 min	
95°C	30 sec	
X°C	1 min	1 x
68°C	7 min	

X: die Annealing Temperaturen wurden für jedes Primerpaar optimiert (Tab. 5).

Für die ‘single fly PCR’ wurde DNA wie von Gloor *et al.* (1993) beschrieben isoliert, und jeweils 1 µl als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden anschließend über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, und die entsprechenden Banden aus dem Gel gereinigt, wie im Punkt angegeben.

3.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Analyse der PCR Produkte wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet, die nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt wurden. Der DNA wurde 6x Stoppuffer zugegeben (Sambrook *et al.*, 1989), und gemeinsam mit dem 1 kb Standardmarker (100 ng/µl) der Firma Gibco BRL auf das Gel geladen. Als Elektrophoresepuffer wurde stets 1x TAE (Sambrook *et. al.*, 1989) verwendet, und die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung von 90 V. Die Gele wurden anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt, und die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.5. Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA Fragmente wurden aus den Gelen ausgeschnitten, und mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* der Firma QIAGEN, entsprechend dem Protokoll des Quiagen-Handbuches gereinigt.

3.2.6. Western Blot

Larven, Köpfe bzw. Körper wurden in Extraktionspuffer (100mM HEPES pH 7,5; 0,5 M KCL; 25% Glycerin; 50mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 0,1 M β-Glycerophosphat; 0,5 mM

Na_3VO_4 pH 11; 0,5 mM PMSF; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin; 1 mM DTT; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin) homogenisiert. Gleiche Mengen der Homogenate wurden über SDS-PAGE Gele aufgetrennt (Sambrook et al., 1989), und durch ‘wet-blotting’ auf Nitrozellulose-membranen (Schleicher&Schüll) transferiert. Nach Blocken der unspezifischen Bindestellen (1 Std. in 1% BSA/TBST) wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (in 5 % Milchpulver/TBST) inkubiert. Die Membranen wurden gewaschen (2x 15 min TBST) und 2-3 Stunden mit dem jeweiligen sekundären Antikörpern inkubiert. Die eingesetzten Verdünnungen können der Tab. 4 entnommen werden. Nach erneutem Waschen (2x 15 min TBST), folgte die Detektion des Signals mit dem *Enhanced Chemiluminescence Kit* (Amersham-Pharmacia) und anschließender Autoradiographie. Für die Quantifizierung der anti-dpERK und der anti-App1 Western Blots wurde die *NIH image 1.60 Software* verwendet, wobei drei voneinander unabhängige Blots ausgewertet wurden.

3.2.7. Microarray Analyse

Die gesamtRNA aus Larven, und adulten Köpfen von 5 Tage alten Fliegen, wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) isoliert, und davon 5 μg in einem Formaldehyd Gel (Ausubel et al., 1996) auf ihre Integrität überprüft. Die Hybridisierung der GeneChips wurde von der von Affimetrix lizenzierten Firma: Affimetrix Service Supplier, Steinbeis-Transferzentrum Proteom-Analyse, Rostock, durchgeführt. Folgendes Protokoll wurde dabei verwendet: Die Erststrang-Synthese erfolgte mit einem T7-(dT)24 Primer und der *SuperScript II Reversen Transkriptase* (Gibco), wobei 30-40 μg gesamt RNA eingesetzt wurden. Die Zweitstrang-Synthese wurde entsprechend dem *Superscript Choice System* (Gibco) durchgeführt. Es folgte eine *in vitro* Transkription (*BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit*; Enzo), und die *Drosophila* Genom Arrays wurden mit der fragmentierten cRNA hybridisiert. Für die Waschschrifte wurde die *GeneChip Fluidics Station* (Affimetrix) verwendet. R-phycoerythrin-streptavidin (Molecular Probes) und ein biotinlierter anti-Streptavidin Antikörper (Vector Laboratories), wurden für die Färbung benutzt. Die Daten wurden mit dem *GeneArray Scanner* (Hewlett Packard) erfasst, und die Auswertung der Daten erfolgte mit von Affimetrix zur Verfügung gestellten Software, und wurde in Microsoft Excel analysiert.

3.3. Immunhistochemie

3.3.1. Paraffinschnitte adulter Gehirne

Das Einbetten und Schneiden der Gehirne wurde nach Ashburner (1989), Protokoll 112 durchgeführt.

3.3.2. Antikörperfärbung an Paraffinschnitten

Die Antikörperfärbungen wurden mit dem *Vectastain Elite ABC Kit, Mouse IgG* der Firma Vector Laboratories durchgeführt, wobei, mit zeitlichen Abweichungen, nach den Angaben des Herstellers vorgegangen wurde.

Paraffinschnitte wurden wie folgt behandelt:

1h < 60°C	Xylol
jeweils 3 min bei RT	99 % ETOH
	96 % ETOH
	90 % ETOH
	80 % ETOH
	70 % ETOH
	H ₂ O bidest
	mit PBT 0.1 % (130 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM NaH ₂ PO ₄ , 0.1 % Triton X-100, pH 7.4) überschichten
1 h 37°C + 1 h R T	mit primärem Antikörper ab 49 1:1000 verdünnt überschichten
10 min RT	mit PBT 0.1 % waschen 1x wechseln
1 h RT	mit sekundärem Antikörper (ABC KIT) 1:500 verdünnt überschichten
10 min RT	mit PBT 0.1 % waschen 1x wechseln
2 h RT	mit Vectasain ABC-Reagenz überschichten
5 min RT	mit PBT 0.1 % waschen
5 min RT	mit DAB-Urea-H ₂ O ₂ färben , mit H ₂ O bidest stoppen und mit Glycergel eindeckeln

3.3.3. Quantifizierung des Neurodegenerationsphänotyps

Für jeden Genotyp wurden, wenn nicht anders angegeben, je drei aufeinanderfolgende Hemisphären aus fünf Köpfen ausgewertet. Dabei wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil des Gewebes der Lobula, der Medulla und des Zentralhirns, der von der Vakuolisierung betroffen war, ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit der *analySIS 2.1* (Soft-Imaging Software GmbH, München) Software.

3.4. Verhaltenstest

Das phototaktische Verhalten der Fliegen wurde nach der von Benzer (1967) beschriebenen Methode in dem dazugehörigen Apparat getestet. Wobei für jedes Experiment zwischen 60 und 70 Fliegen eingesetzt wurden. Der Apparat bestand aus 10 Röhren, die paarweise gegenüberliegend angeordnet waren, und einem Röhrchen als Startposition, in das die Fliegen zu Beginn gesetzt wurden. Es ergaben sich so für jeden Durchgang 5 aufeinanderfolgende Zyklen, d.h. den Fliegen wurde 5 mal die Gelegenheit gegeben auf die Reizquelle zu reagieren, mit einer festen Zyklusdauer von 1 min. Der Durchmesser der Röhren betrug 1,5 cm. Der beleuchtete bzw. abgedunkelte Bereich wurde nach 70 cm erreicht. Die Lichtquelle wurde mit einer Entfernung von 15 cm am Ende der Röhren angebracht. Es wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Bewegung der Tiere zum Licht überprüft wurde ('zum Licht'-Experiment). Dazu wurde eine Reihe der Röhren abgedunkelt, einschließlich der Startposition, und die gegenüberliegende Reihe beleuchtet. Die Tendenz der Fliegen im beleuchteten Bereich zu bleiben ('vom Licht-Experiment') wurde getestet, indem die Reihe der Röhren mit der Startposition beleuchtet wurde, und die Anzahl der Fliegen, die sich in den abgedunkelten Bereich bewegten, festgehalten wurde. Nach Abschluß der 5 Zyklen wurde gezählt, wie viele Fliegen sich in den Röhren 1-6 (1 entspricht der Startposition) befanden. Für jeden Genotyp wurden die Daten aus drei Experimenten ausgewertet, dafür wurde die durchschnittliche prozentuale Anzahl der Fliegen für jedes Röhrchen ermittelt und der 'Standard Error of the Mean' (SEM) berechnet

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung und Charakterisierung der *vap* Mutante

Im folgenden Kapitel 4.1 sollen die Grundlagen dargestellt werden, auf denen die Experimente der vorliegenden Arbeit aufbauen.

4.1.1. Isolierung der *vap* Mutante aufgrund progressiver Degeneration im Zentralen Nerversystem

Eine Sammlung von U. Schäfer und H. Jäckle zur Verfügung gestellten P-Element Linien (Melzig *et al*, 1998) wurde auf neue X-chromosomal gekoppelte Gene, die an der Entstehung altersabhängiger Neurodegeneration beteiligt sind, untersucht. Es wurden etwa 1000 Linien gealtert und histologisch auf das Vorhandensein von Vakuolen, die als Hinweis für degenerative Vorgänge gewertet werden, getestet. Unter anderem wurden dabei zwei Linien identifiziert, *vap*² und *vap*³, die eine sich altersabhängig verstärkende Vakuolisierung des Zentralen Nervensystems (ZNS) zeigen. (J. Botella, persönliche Mitteilung).

Die neu isolierten *vap*² und *vap*³ Linien konnten einer Komplementationsgruppe zugeordnet werden, die den Neurodegenerationsphänotyp der *vacuolar peduncle* (*vap*¹) Mutante nicht zu komplementieren vermögen. *vap*¹ wurde ursprünglich in einem Screen nach Mutanten, die anatomische Gehirndefekte zeigen, isoliert (Heisenberg and Böhl, 1979). Alle drei untersuchten Allele zeichnen sich durch progressive Degeneration im Gehirn aus, die mit einer 100 %igen Penetranz auftritt. Sowohl die optischen Loben als auch das Zentralgehirn sind betroffen, während die Retina von der Degeneration unberührt bleibt (Abb. 7). In *vap*¹ Fliegen kann die Vakuolisierung bereits nach 7 Tagen festgestellt werden, in *vap*² und *vap*³ Fliegen wird der Phänotyp erst nach 15 bzw. 30 Tagen sichtbar (Daten nicht gezeigt). Charakteristisch für die *vap* Mutanten ist ebenfalls eine verkürzte Lebensdauer. Die maximale Lebensspanne von *vap*¹ Fliegen beträgt 29 Tage, während *vap*² Fliegen maximal 50 Tage leben. Im Vergleich dazu beträgt die maximale Lebensspanne der parentalen Linie *w*¹¹¹⁸ 90 Tage (Kiermayer, 1999).

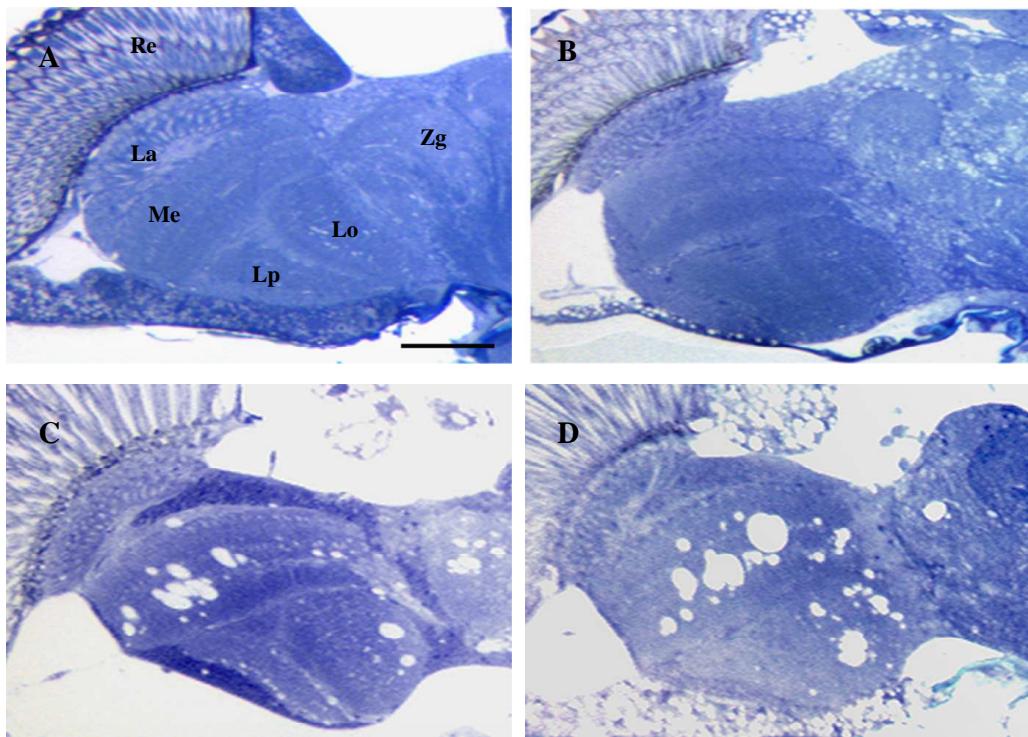
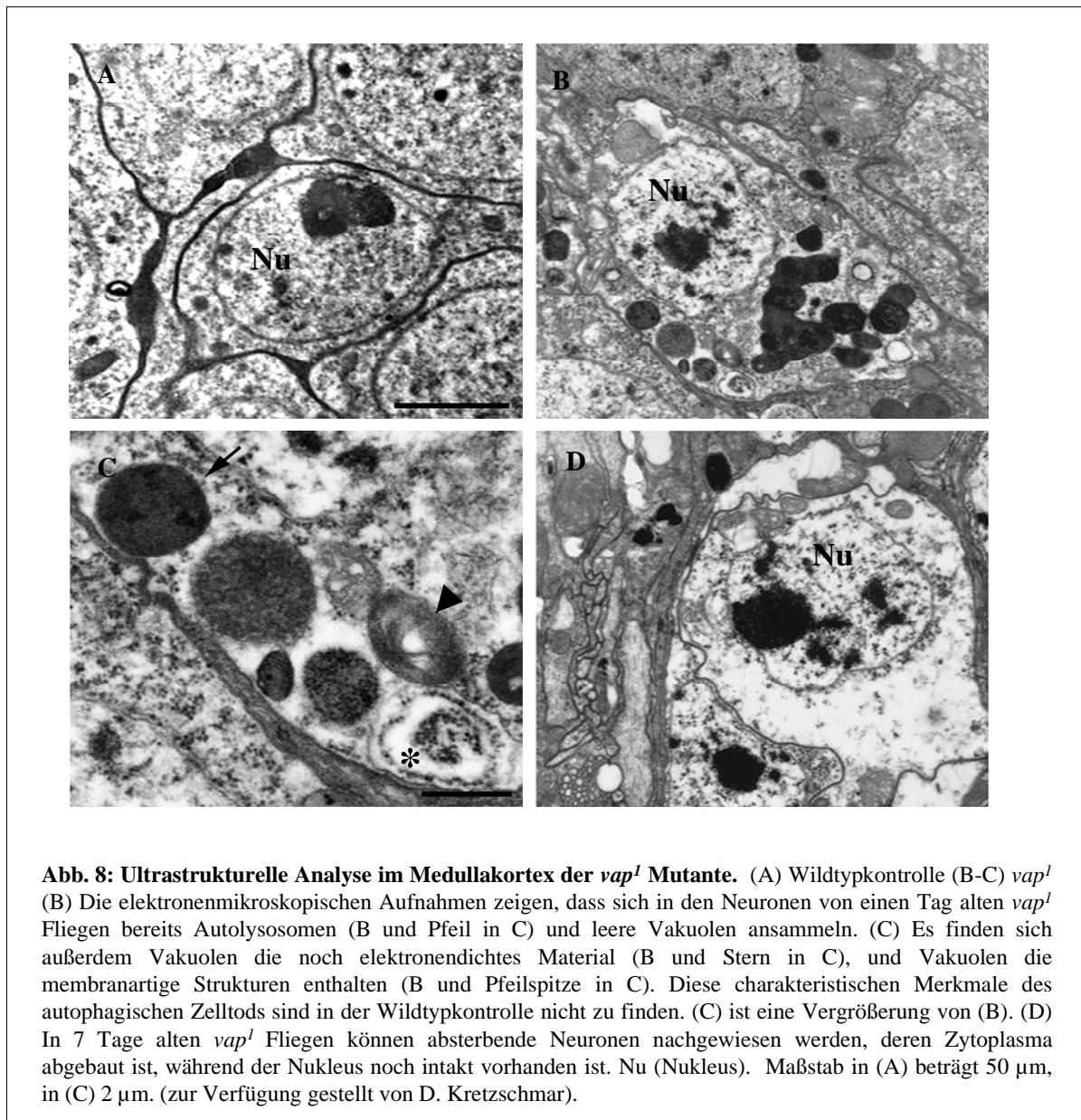


Abb. 7: Neurodegenerationsphänotyp im Gehirn der *vap* Mutante. Gezeigt sind Toluidinblaufärbungen von horizontalen Semidünnsschnitten. (A) Wildtypkontrolle (B) In 1 Tag alten *vap*^l Fliegen kann kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. (C) 7 Tage alte *vap*^l Fliegen zeigen Vakuolen in den optischen Loben, wobei die Medulla und die Lobula besonders betroffen sind, und im Zentralgehirn. (D) In *vap*^l Fliegen, die 14 Tage lang gealtert wurden, ist der Grad der Vakuolisierung verstärkt, was zeigt, dass die Degeneration des Gewebes mit dem Alter fortschreitet. Re (Retina), La (Lamina), Me (Medulla), Lp (Lobulaplatte), Lo (Lobula), Zg (Zentralgehirn). Maßstab: 50µm.

4.1.2. Ultrastrukturelle Analyse des neuronalen Zelltodes

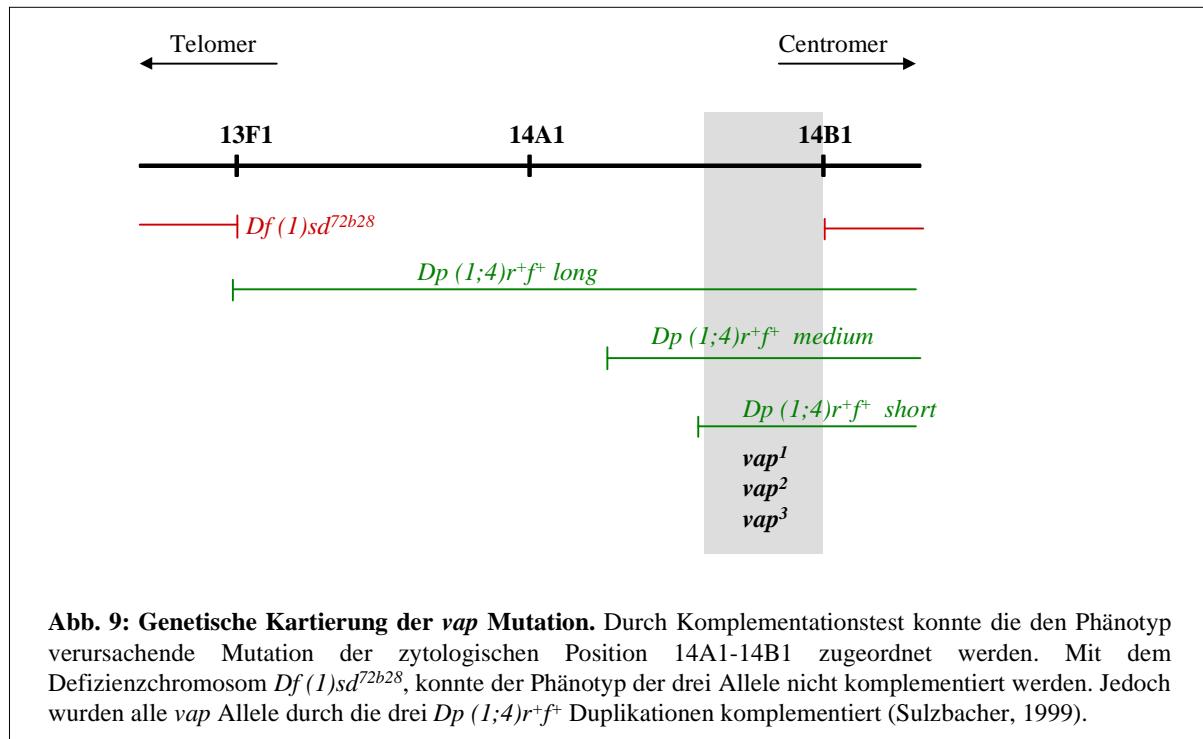
Ultrastrukturelle Analysen haben gezeigt, dass die beobachtete Degeneration in der *vap* Mutante auf das Absterben von Neuronen zurückzuführen ist. Die morphologische Struktur der Gliazellen erscheint in den elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen normal, dass diese nicht von den degenerativen Prozessen betroffen sind wurde ebenfalls durch Färbungen mit verschiedenen molekularen Gliazellmarkern bestätigt (D. Kretzschmar, persönliche Mitteilung). Die Morphologie der Neuronen in EM Schnitten (Abb. 8) weist nicht auf eine apoptotische Ursache des Zellsterbens, sondern auf einen Prozess hin, der als Autophagie bezeichnet wird. Beim autophagischen Zelltod bauen eukaryotische Zellen ihr eigenes Zytoplasma und die Organellen ab. Teile des Zytoplasmas werden in sogenannten Autophagosomen gesammelt und abgebaut (Review: Dunn, 1994). Bereits in Neuronen von

ein Tag alten *vap¹* Fliegen häufen sich Autolysosomen, Vakuolen, die elektronendichthes Material enthalten und leere Vakuolen an (Abb. 8B und C). In 7 Tage alten *vap* Fliegen lassen sich Neuronen finden, deren Zytoplasma vollständig degradiert ist, während der Zellkern noch in seiner ursprünglichen Form vorhanden ist (Abb. 8D). All dies sind charakteristische Merkmale des autophagischen Zelltodes, die in wildtypischen Neuronen nicht nachweisbar sind (Abb. 8A). Anzeichen von Apoptose konnten in der *vap* Mutante nicht gefunden werden. Durch eine TUNEL-Färbung (Gavrieli *et al.*, 1992) konnten keine apoptotischen Zellkerne nachgewiesen werden (J. Botella, persönliche Mitteilung). Ferner führte die pan-neuronale Expression des antiapoptotischen Proteins p35 ebenfalls zu keiner Verminderung der Degeneration, und schließt somit eine apoptotische Zelltodursache aus.



4.1.3. Genetische und Molekulare Analysen identifizieren RasGAP als das in der *vap* Mutante betroffene Gen

Durch Komplementationstests mit der Defizienz $Df(1)sd^{72b28}$, und den Duplikationen $Dp(1;4)r^{+}f^{+}$ long, medium und short, die den entsprechenden Defizienzbereich abdecken, konnte die den Phänotyp verursachende Mutation in den drei *vap* Allelen der zytologischen Position 14A1-14B1 zugeordnet werden (Abb. 9) (Sulzbacher, 1999).



Die molekulare Analyse der verschiedenen Allele zeigte, dass der Ras GTPase Aktivator *RasGAP* von der jeweiligen Mutation betroffen ist (Abb. 10). In der EMS-Mutante *vap*¹ erzeugt eine A zu G Transition ein Stop-Codon, dass zu einem Kettenabbruch noch vor der GAP katalytischen Domäne führen sollte (D. Kretzschmar, persönliche Mitteilung). Eine Deletion von 239 bp ab der Position 999 bp der *RasGAP* cDNA (Accession number AJ012609) entfernt in *vap*² die Spleißdonorstelle an der Position 1099 bp des vierten Introns. Wie durch RT-PCR gezeigt werden konnte, erzeugt der dadurch veränderte Spleißvorgang ein verkürztes Transkript, das für ein um 64 Aminosäuren (aa 206-269) kürzeres Protein kodieren sollte, in dem die SH3 Domäne und Teile der stromaufwärts folgenden SH2 Domäne fehlen (Kiermayer, 1999). Das *vap*³ Allel wird durch eine P-Element Insertion im

ersten Intron verursacht. In einem ‘Jump-out’ Experiment (Grigliatti, 1998) konnte der *vap*³ Phänotyp revertiert werden (Sulzbacher, 1999).

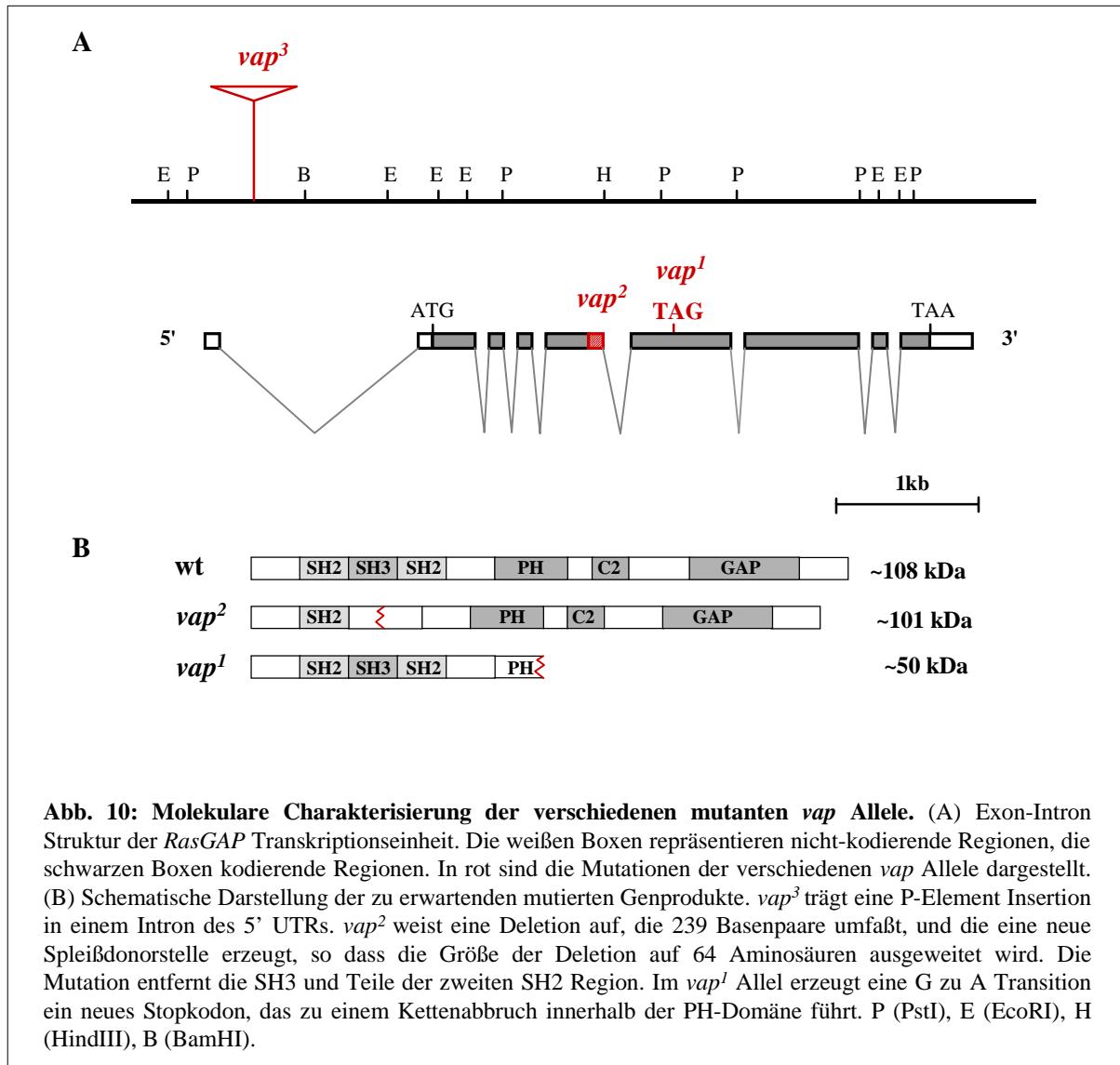


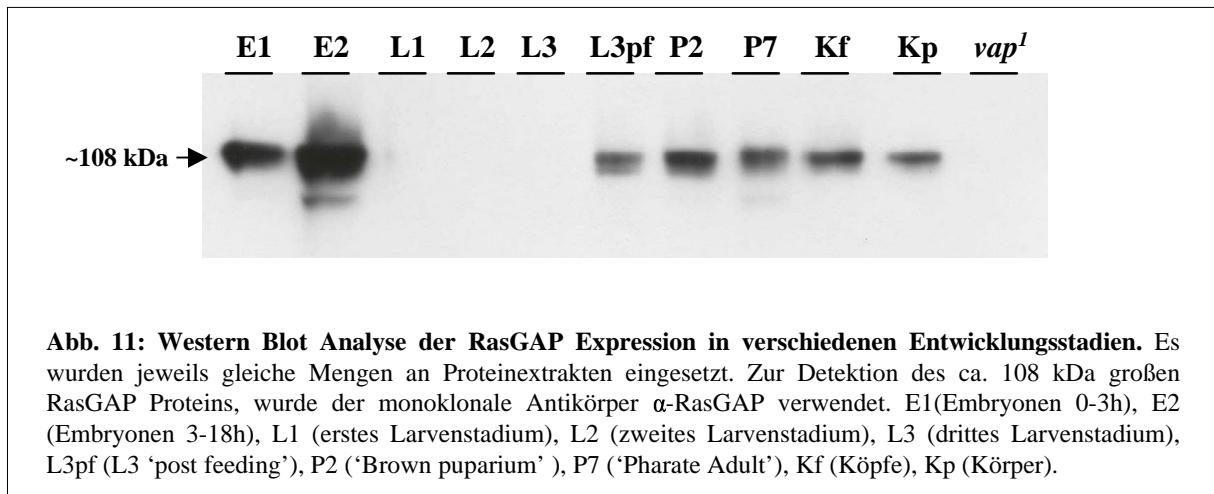
Abb. 10: Molekulare Charakterisierung der verschiedenen mutanten *vap* Allele. (A) Exon-Intron Struktur der *RasGAP* Transkriptionseinheit. Die weißen Boxen repräsentieren nicht-kodierende Regionen, die schwarzen Boxen kodierende Regionen. In rot sind die Mutationen der verschiedenen *vap* Allele dargestellt. (B) Schematische Darstellung der zu erwartenden mutierten Genprodukte. *vap*³ trägt eine P-Element Insertion in einem Intron des 5' UTRs. *vap*² weist eine Deletion auf, die 239 Basenpaare umfasst, und die eine neue Spleißdonorstelle erzeugt, so dass die Größe der Deletion auf 64 Aminosäuren ausgeweitet wird. Die Mutation entfernt die SH3 und Teile der zweiten SH2 Region. Im *vap*¹ Allel erzeugt eine G zu A Transition ein neues Stopkodon, das zu einem Kettenabbruch innerhalb der PH-Domäne führt. P (PstI), E (EcoRI), H (HindIII), B (BamHI).

4.2. Expressionsanalyse

4.2.1. Analyse der RasGAP Expression während der Entwicklung

Als erstes sollte die RasGAP Expression während der Entwicklung in wildtypischen Fliegen untersucht werden. Dafür wurden aus dem *w¹¹¹⁸* Stamm von verschiedenen Embryonen-, Larven- und Puppenstadien, von adulten Köpfen und Körpern, und von ganzen *vap*¹ Fliegen

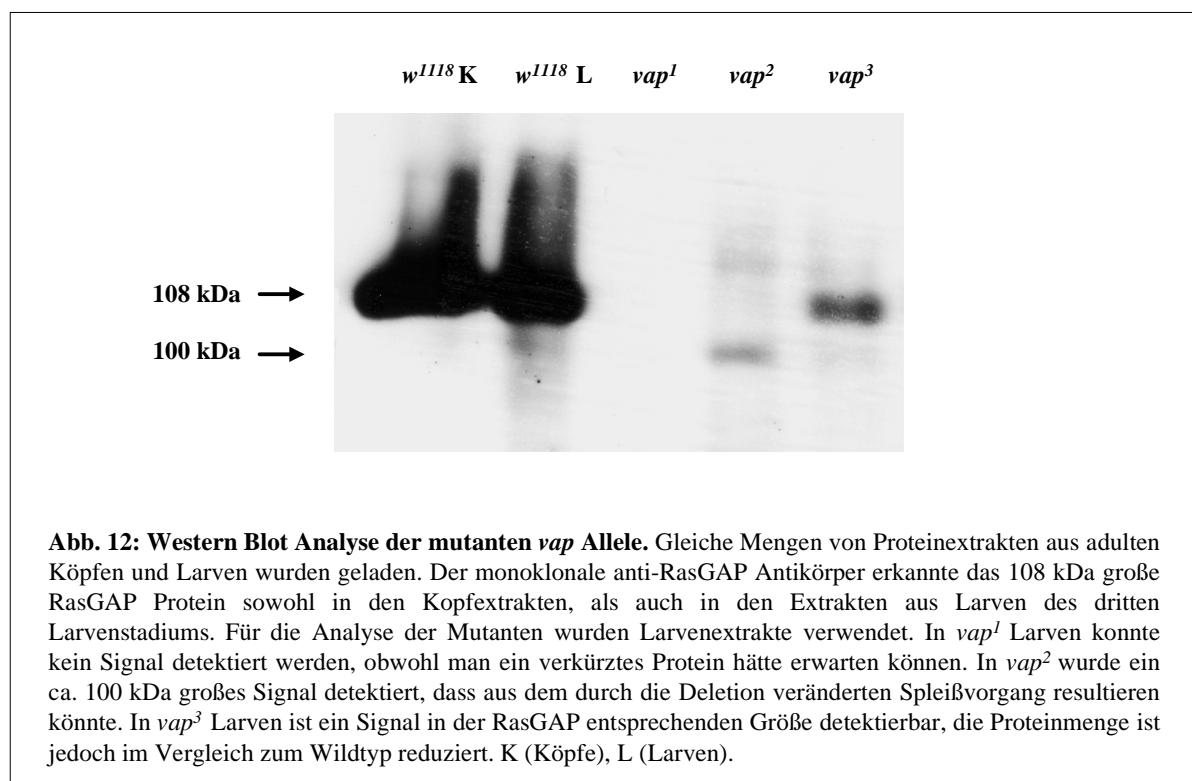
Proteinextrakte hergestellt. Gleiche Mengen der Extrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und anschließend kapillar geblottet. Die Membran wurde mit dem monoklonalen α -RasGAP Antikörper inkubiert, der gegen die N-terminale SH2 Domäne des RasGAP Proteins gerichtet ist (Feldmann *et al*, 1999). In Abb. 11 ist zu sehen, dass bereits in 0-3 Stunden alten Embryonen das ca. 108 kDa große RasGAP detektiert werden konnte, was zeigt, dass RasGAP maternal zur Verfügung gestellt wird. Nach dem Beginn der zygotischen Transkription, ist in 3-18 Stunden alten Embryonen eine erhöhte Proteinmenge vorhanden. Vom ersten bis zum dritten Larvenstadium ist kein RasGAP detektierbar. Die Expression beginnt wieder während des dritten Larvenstadiums, wenn die Larve aufhört zu fressen (L3, ‘Post-feeding’), und ist dann kontinuierlich in den Puppenstadien P2 (‘Brown puparium’) und P7 (‘Pharate Adult’), sowie in Köpfen und Körpern nachzuweisen. Wenn auch in geringerer Menge als in den Embryonen. In der *vap¹* Mutante wurde ebenfalls kein Protein detektiert. Die Einteilung der Stadien L3-P7 erfolgte wie von Bainbridge und Bownes (1981) beschrieben.



4.2.2. Analyse der RasGAP Expression in den *vap* Mutanten

Die bisher erarbeiteten genetischen und molekularen Daten der verschiedenen *vap* Allele sollten anschließend auf der Ebene der Translation bestätigt werden. Dafür wurden Proteinextrakte aus adulten Köpfen und aus Larven des *w¹¹¹⁸* Stammes und aus *vap¹*, *vap²* und *vap³* Larven isoliert, und damit Western Blots angefertigt. Zur Detektion des RasGAP Proteins wurde wiederum der monoklonale α -RasGAP Antikörper verwendet. Ein für das

RasGAP Protein zu erwartendes Signal von ca. 108 kDa, wurde sowohl in den adulten Köpfen wie auch in den Larven des w^{1118} Stammes nachgewiesen (Abb. 12). In Proteinextrakten von vap^1 Larven war kein RasGAP Protein detektierbar. Es wurde aufgrund des Stopkodons, das durch die Mutation in vap^1 entstanden war, ein ca. 50 kDa großes Protein erwartet (Abb. 10). Ein entsprechendes Signal konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dies ist möglicherweise auf die Instabilität des verkürzten Proteins zurückzuführen. Das wildtypische Protein war auch in der vap^2 Mutante nicht nachzuweisen, jedoch ein ca. 100 kDa großes Signal, das dem ca. 101 kDa großen Protein entsprechen könnte, das aus der Deletion in der vap^2 Mutante resultiert (Abb. 12 und 10). Die geringe Intensität dieses Signals weist jedoch auf eine niedrige Effizienz des alternativen Spleissens hin, oder auf eine verringerte Proteinstabilität. In Larven, die das vap^3 Allel tragen lässt sich eine im Vergleich zum Wildtyp stark verminderte RasGAP Expression nachweisen (Abb. 12). Die P-Element Insertion in diesem Allel (Abb. 10) verringert vermutlich die Effektivität der Transkription bzw. Translation. Die detektierten Proteinmengen, korrelieren mit der Ausprägung des Neurodegenerationsphänotyps in den unterschiedlichen Allelen: Der Phänotyp ist in vap^1 Fliegen, in denen keine Expression nachgewiesen werden konnte, stärker als in vap^2 und vap^3 Fliegen, in denen RasGAP Expression auf einem detektierbaren Niveau stattfindet.

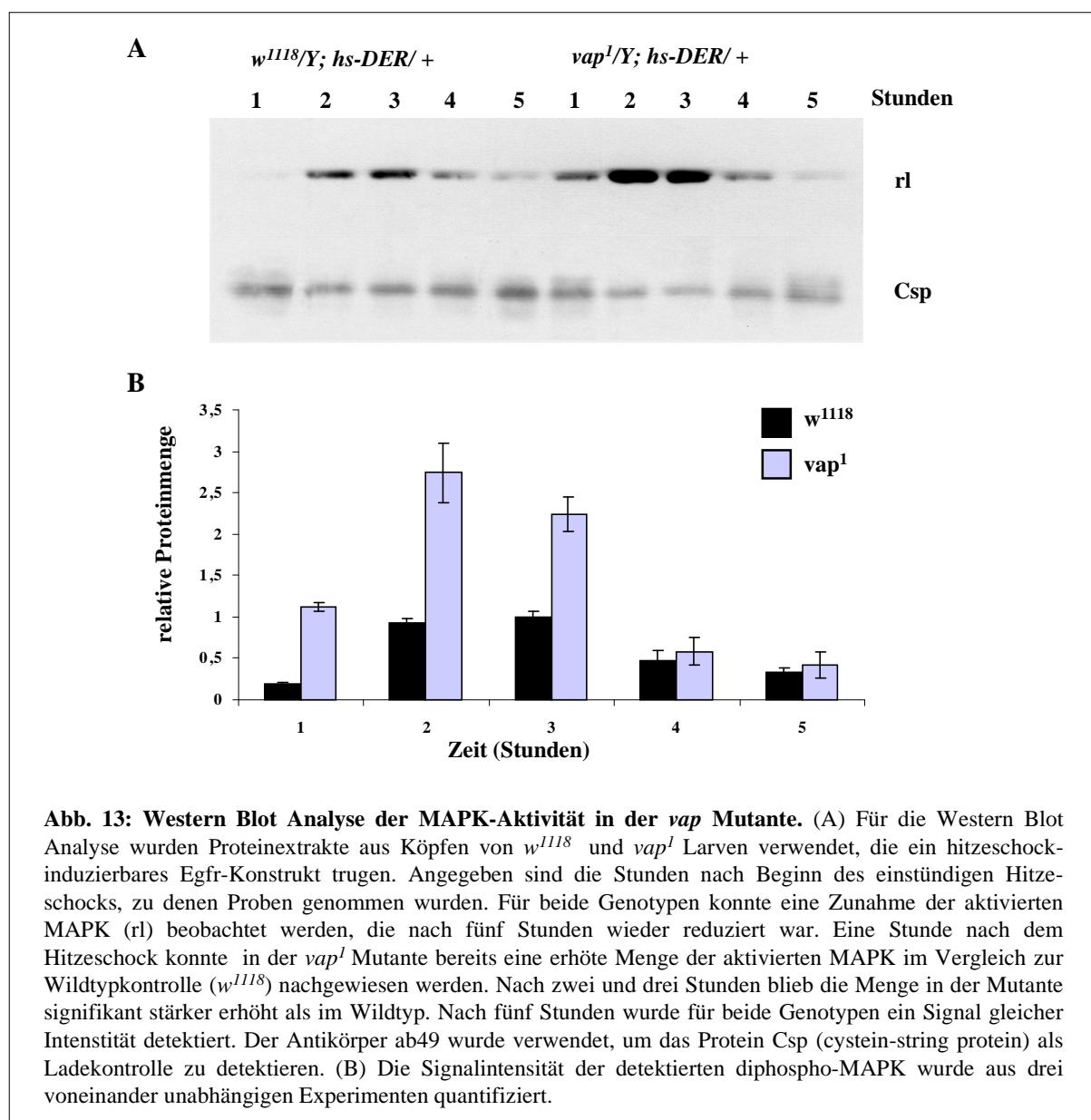


4.2.3. Analyse der MAPK-Aktivität zwischen Wildtyp-Fliegen und *vap*

Feldmann *et al.* (1999) konnten *in vitro* zeigen, dass *Drosophila* RasGAP die GTPase-Aktivität von H-Ras aus Säugetieren stimulieren kann, wofür die GAP-Domäne verantwortlich ist. RasGAP stimmt folglich in dieser Eigenschaft mit GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) von Säugetieren überein. Nachdem in den *vap* Mutanten RasGAP nicht bzw. nur gering exprimiert wird, sollte man erwarten, dass in diesen Fliegen die durch RasGAP vermittelte GAP-katalytische Aktivität fehlt. Zahlreiche Studien zeigen, dass Ras eine Kaskade von Proteinkinasen aktiviert, bestehend aus Raf, MEK und ERK, auch als MAP-Kinase (MAPK) bekannt (Review: Seger und Krebs, 1995). Die Aktivität der *Drosophila* MAPK Rollt kann mit Hilfe des monoklonalen diphospho-ERK (dpERK) Antikörpers, visualisiert werden. Dieser Antikörper erkennt spezifisch die aktive zweifach-phosphorylierte Form der MAPK (dpMAPK), nicht aber die inaktive einfach- oder nicht-phosphorylierte Form (Yung *et al.*, 1997). Die Detektion der dpMAPK wurde in *Drosophila* für verschiedenen Studien als eine direkte Methode benutzt, um festzustellen, wie bestimmte Mutanten den RAS/MAPK Signalweg beeinflussen (Gabay *et al.*, 1997).

In einem ersten Experiment wurden Proteinextrakte aus Köpfen von *vap*¹ und *vap*² Fliegen hergestellt, geblottet und mit dem dpERK Antikörper inkubiert. Im Gegensatz zur Erwartung, konnte jedoch keine veränderte Aktivierung der MAPK im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch sollte die MAPK-Aktivierung in der *vap*¹ Mutanten getestet werden, nachdem der RAS/MAPK Signalweg, durch die Überexpression des *Drosophila* EGF Rezeptors (DER), dem Orthologen zum menschlichen EGFR (Livneh *et al.*, 1985), stimuliert worden war. Die Überexpression des EGFR wurde durch ein hitzeschockinduzierbares DER-Konstrukt (*hs-DER*) erreicht. Dafür wurden Wildtyp und *vap*¹ Larven, die jeweils eine Kopie des *hs-DER* Konstruktes trugen, eine Stunde lang einem Hitzeschock bei 37°C unterzogen. Für den anschließenden Western Blot wurden Larvenextrakte verwendet, die stündlich, nach Beendigung des Hitzeschocks gesammelt worden waren. Die Aktivierung der MAPK wurde erneut mit dem dpERK Antikörper untersucht. Das Cystein-string protein (Csp), detektiert mit dem monoklonalen anti-Csp Antikörper ab49 (Zinsmaier *et al.*, 1990), wurde als Ladekontrolle verwendet. Wie aus der Abb. 13 hervorgeht, führte die Überexpression des EGFR mit dem hs-Konstrukt zu einer erhöhten Aktivierung der MAPK im Wildtyp. Zwei Stunden nach Beendigung des Hitzeschocks war eine erhöhte Menge an dpMAPK sichtbar, wobei die relative Proteinmenge

einen maximalen Wert von 0,9 erreicht hatte. Nach fünf Stunden war die Signalintensität ungefähr wieder auf das Ausgangsniveau reduziert. Interessanterweise zeigte die *vap*¹ Mutante bereits nach einer Stunde eine stärkere Aktivierung der MAPK als der Wildtyp, mit einer relativen Proteinmenge von 1,1, die nach zwei Stunden bei einem maximalen Wert von 2.8 lag. Die stärkere Aktivierung hielt bis zu drei Stunden nach dem Hitzeschock an. Nach vier und fünf Stunden wurden in Wildtyp und Mutante wieder gleiche Mengen an dpMAPK detektiert. Dies könnte bedeuten, dass RasGAP die Menge an aktiverter MAPK beeinflusst, nicht aber die Signaldauer. Die gleichen Ergebnisse konnten auch mit Kopfextrakten und mit dem *vap*² Allel erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



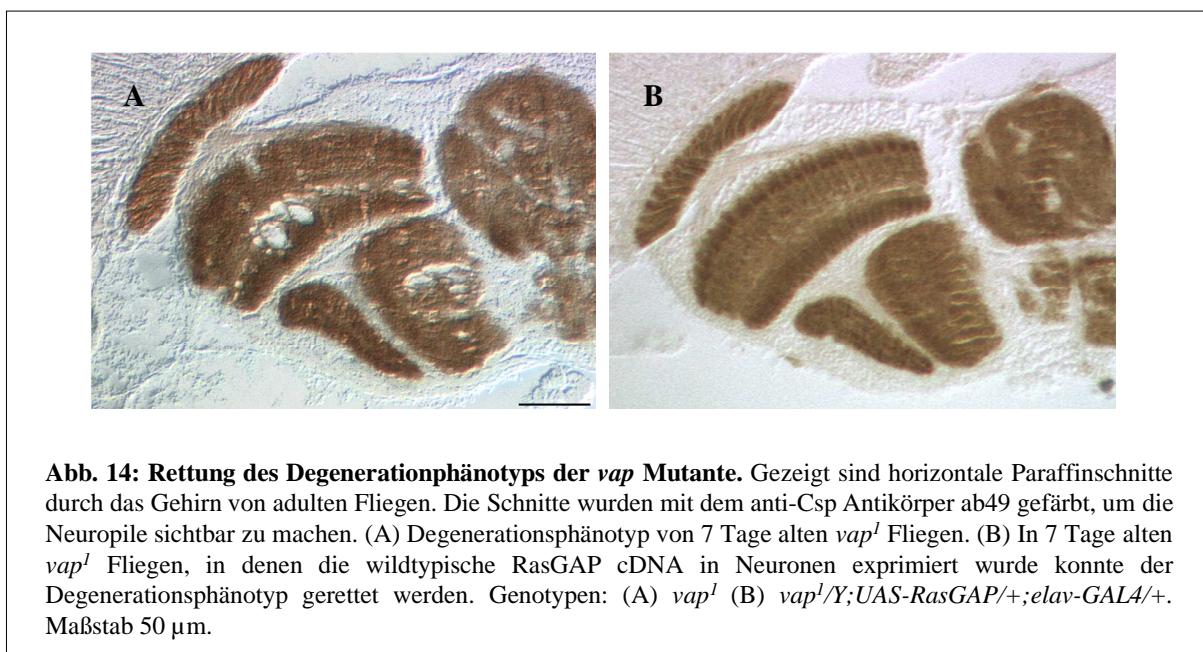
Der Western Blot zeigt, also dass die MAPK aktiviert werden kann. Für deren Aktivierung wird folglich die Funktion von RasGAP erwartungsgemäß nicht benötigt. Nach der Stimulation des EGFR liegt in der *vap* Mutante jedoch eine verstärkte Aktivierung der MAPK vor, was auf eine gestörte Regulierung von Ras, durch die fehlende Funktion von RasGAP, hinweist. Wie erwartet, scheint RasGAP Ras zu inhibieren.

4.3. Genetische Funktionsanalyse von RasGAP

4.3.1. Rettungsversuch mit der wildtypischen RasGAP cDNA

Um die spezifische Rolle von RasGAP in Neuronen zu bestätigen, sollte versucht werden, den *vap* Neurodegenerationsphänotyp, durch die Expression der wildtypische *RasGAP* cDNA *UAS-RasGAP* (Feldmann *et al.*, 1999) in diesem Zelltyp, zu komplementieren, d.h. die Entstehung des Phänotyps sollte durch die Wiederherstellung der Funktion des *RasGAP* Gens in der *vap* Mutante unterdrückt werden.

Zu diesem Zweck wurde das UAS/GAL4-Systems aus Hefe von Brand und Perrimon (1993) verwendet, welches die zell- und gewebespezifische Expression eines beliebigen klonierten Gens ermöglicht. Ein Promoter und Enhancer verursacht die Expression des aus der Hefe stammenden Transkriptionsaktivatorproteins GAL4 in einem bestimmten Muster, und GAL4 wiederum aktiviert die Transkription eines Zielgens, das sich unter der Kontrolle der GAL4 bindenden *UAS* (upstream activating sequence) Sequenz befindet. Dabei sind das *GAL4*-Gen und das *UAS*-Zielgen ursprünglich in zwei verschiedenen transgenen Fliegenstämmen getrennt. Kreuzt man die *GAL4*-Linie mit der *UAS*-Linie, wird das Zielgen in den Nachkommen aktiviert. Die pan-neurale Expression von *UAS-RasGAP* wurde durch das Verwenden der *appl GAL4*- (Torroja *et al.*, 1999) und *elav GAL4*-Linie (Robinow and White, 1988) sichergestellt. Tatsächlich könnte in *vap*¹ hemizygoten Fliegen, die *UAS-RasGAP* in Neuronen exprimierten, keine Vakuolisierung beobachtet werden Abb. 14A zeigt die für 7 Tage alte *vap*¹ Fliegen typische Ausprägung des Degenenerationsphänotyp, der im Falle der RasGAP Überexpression (Abb. 14B) nicht mehr beobachtet werden kann. Die gleichen Ergebnisse könnten für 20 Tage alte *vap*² Fliegen, mit beiden GAL4-Linien erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



Die neuronenspezifische Expression von RasGAP konnte folglich den Neurodegenerationsphänotyp retten, die Genfunktion von *vap* wurde wieder hergestellt, und somit der mutante Phänotyp zum wildtypischen revertiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutation im *RasGAP* Gen ursächlich für die Entstehung der Degeneration in der *vap* Mutante ist. Ferner lässt dies erkennen, dass das Überleben der Neuronen im adulten Gehirn von *Drosophila* die Funktion von RasGAP erfordert. Die Expression der RasGAP cDNA mit dem Actin-GAL4 Element, das eine ubiquitäre Expression zur Folge hat, war sowohl im *vap*² als auch im wildtypischen Hintergrund letal (Giesecke, 2002).

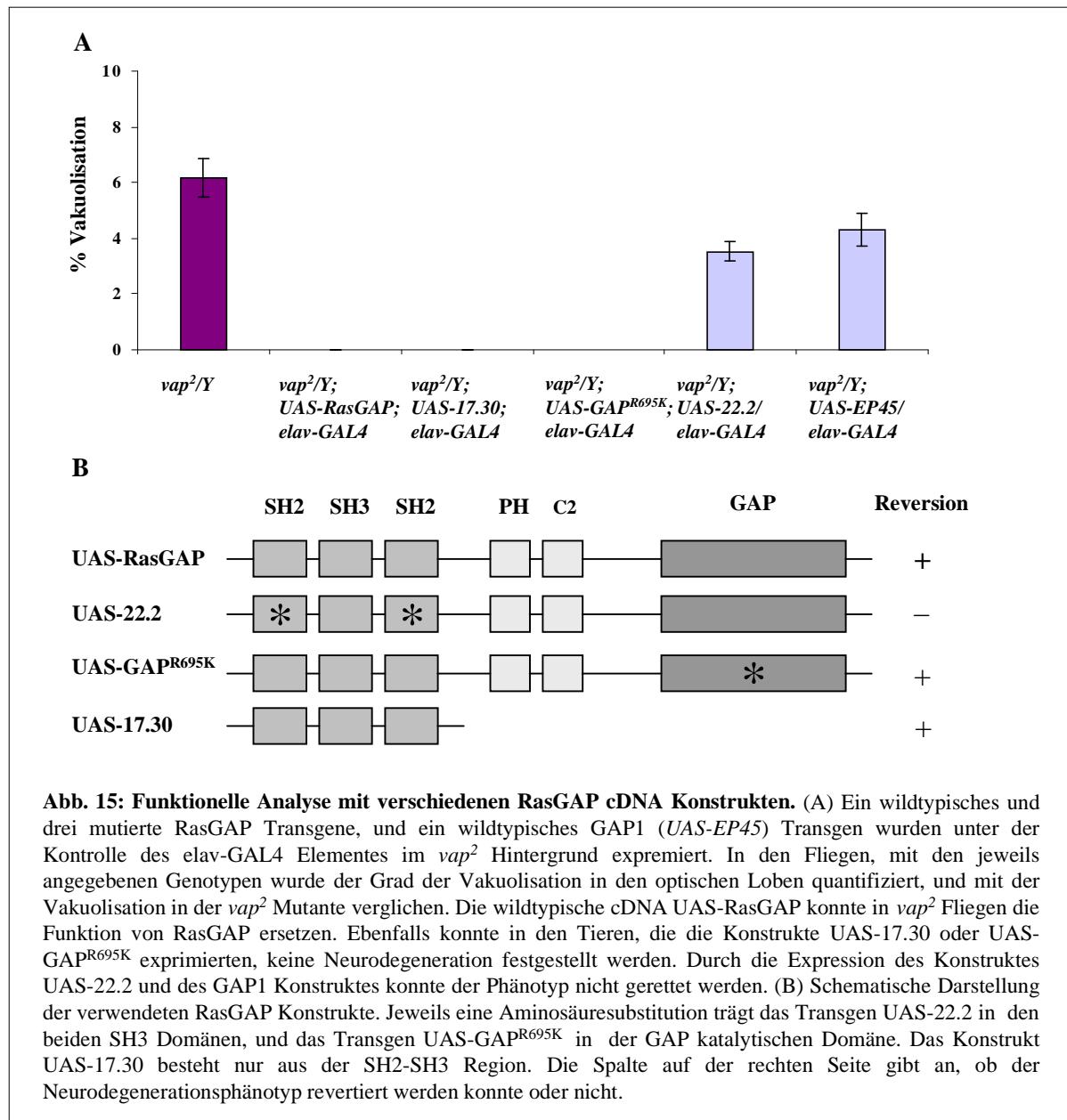
4.3. 2. Rettungsversuche mit mutierten *RasGAP* cDNA Konstrukten

Das *Drosophila* RasGAP Protein beinhaltet, wie bereits im Punkt 2.3.1. beschrieben, am N-terminalen Ende eine Tandemanordnung aus SH2-SH3-SH2 Domänen (SH2-Region), und am C-terminalen Ende die GAP katalytische Domäne. Es stellt sich die Frage, welchen Beitrag diese beiden Regionen zur Funktion von RasGAP in den Neuronen leisten. Werden beide Regionen für das Überleben der Neuronen benötigt, oder nehmen sie voneinander unabhängige Aufgaben ein?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung, wurden verschiedene mutante *RasGAP* Transgene verwendet, die von D. Hughes zur Verfügung gestellt wurden (Feldmann *et al.*, 1999; Cleghon *et al.*, 1998). Das Konstrukt *UAS-17.30* umfasst lediglich die SH2- Region (aa 83-343). Eine Punktmutation innerhalb der GAP-katalytischen Domäne, führt in dem Konstrukt *UAS-RasGAP^{R695K}* zu einer Aminosäuresubstitution von Arginin nach Lysin an der Position 695, die SH2-Region ist jedoch nicht verändert. Schließlich weisen in dem Konstrukt *UAS-22.2* beide SH2 Domänen jeweils eine Aminosäuresubstitution von Arginin nach Leucin (aa 110 und 278) in der hoch konservierten ‘FLVRES’ Sequenz auf, während die GAP Domäne wildtypisch ist (Abb. 15B). Diese Transgene wurden mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems in *vap*² Fliegen exprimiert, und auf ihre Fähigkeit hin getestet, den *vap* Neurodegenerationsphänotyp, wie unter Punkt 4.3.1. beschrieben, zu retten (Abb. 15A). Wurde das Konstrukt *UAS-RasGAP^{R695K}* mit dem neuronalen Treiber *elav-GAL4* im mutanten *vap*² Hintergrund exprimiert, konnte der Neurodegenerationsphänotyp revertiert werden. Wird dieses Transgen jedoch mit *actin-GAL4* in *vap*² Fliegen exprimiert, führt dies nicht zur Letalität der Nachkommen, wie dies unter Verwendung der wildtypischen *RasGAP* cDNA der Fall ist (Giesecke, 2002). Daraus kann man schließen, dass die Punktmutation in der GAP Domäne tatsächlich zu einem Funktionsverlust führt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden dass dieser unvollständig ist, nachdem es sich bei der Mutation um einen konservativen Aminosäureaustausch handelt, die noch eine verringerte katalytische Aktivität zulassen könnte. Als nächstes wurde untersucht, welche Konsequenz die Mutation in der SH2-Region, für die Rettung des Phänotyps hat, dafür wurde das Transgen *UAS-22.2* verwendet. Der *vap*² Phänotyp blieb in Fliegen mit dem Genotyp *vap*²/Y; *elav-GAL4/UAS-22.2* jedoch unverändert, d.h. dieses Konstrukt konnte den Degenerationsphänotyp nicht retten. Die beiden beschriebenen Experimente legen die Vermutung nahe, dass nicht die GAP katalytische Region, die in dem Plasmid *UAS-22.2* intakt vorhanden ist, das Überleben der Neuronen vermittelt, sondern das diese Aufgabe der N-terminalen Region inklusive der SH2-SH3-SH2 Domäne zukommt. Diese Annahme wurde durch das folgende Experiment unterstützt: In *vap*² Fliegen in deren Neuronen, durch das Einkreuzen von *UAS-17.30*, nur die SH2-SH3 Region exprimiert wurde, konnte die Vakuolisierung ebenfalls verhindert werden. Gap1, neben RasGAP und NF1 eines der drei bisher in *Drosophila* identifizierten Ras GTPase aktivierenden Proteine (Gaul *et al.*, 1996), besitzt neben der GAP katalytischen Domäne keine funktionelle Gemeinsamkeit mit RasGAP, d.h. es verfügt über keine SH2-Region. Es sollte getestet werden, ob dieses GAP Protein die Funktion von RasGAP in den Neuronen ersetzen kann. Dafür wurde die funktionelle *Gap1* cDNA *UAS-Gap1^{EP45}* wieder

mit *elav-GAL4* in *vap²* Fliegen exprimiert. Auch in diesem Experiment konnte keine Revertierung des Phänotyps erreicht werden.

Diese Untersuchungen weisen der SH2-SH3 Region von RasGAP eine essentielle Rolle für die Unversehrtheit der Neuronen im ZNS von *Drosophila* zu. Die Rolle der GAP-Domäne konnte mit diesen Experimenten nicht geklärt werden, und bedarf weiterer Untersuchungen.



4.3.3. Analyse genetischer Interaktionen mit dem EGFR/Ras Signalweg

Die gesteigerte Aktivierbarkeit der MAPK in der *vap* Mutante (Punkt 4.3.2.) weist daraufhin, dass RasGAP an der Regulation von Signalen, die über den EGFR/Ras Signaltransduktionsweg vermittelt werden beteiligt ist. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Neurodegenerationsphänotyp über diesen Signalweg moduliert werden kann. Dafür wurde auf eine mögliche Interaktion mit bekannten Komponenten dieses Signalwegs getestet.

Das *vap*² Allel erwies sich in diesen Experimenten als geeigneter als das *vap*¹ oder *vap*³ Allel. Wurde das *vap*¹ Allel verwendet, war die Lebensfähigkeit der Nachkommen der entsprechenden Kreuzungen insbesondere bei den Hitzeschockexperimenten stark reduziert, während der Phänotyp im *vap*³ Allel erst nach 30 Tagen in Erscheinung tritt, und damit die Untersuchungen unnötig lange dauern würden. Im Gegensatz dazu ist im *vap*² Allel die Vakuolisierung bereits nach 15 Tagen sichtbar. In den *vap*² Hintergrund wurden die zu testenden Allele heterozygot eingekreuzt, und nachdem sie 18 Tage lang gealtert worden waren, wurden Paraffinschnitte dieser Fliegen angefertigt. Der Neurodegenerationsphänotyp konnte auf diese Weise je nach verwendetem Allel sowohl vermindert als auch verstärkt werden. Um eine verlässliche Beurteilung der einzelnen Interaktoren sicherzustellen, wurde in den Paraffinschnitten der Grad der Vakuolisierung quantifiziert. Dabei wurde festgestellt, wieviel Gewebe (in %) in der Medulla und der Lamina durch die Vakuolisierung betroffen war. Für jeden Genotyp wurden drei aufeinanderfolgende Hemisphären in fünf Gehirnen ausgewertet.

Der Phänotyp der *vap*² Fliegen konnte mit einem Nullallel des EGFR, *flb*^{IP02}, supprimiert werden (Abb. 16H und 17B). Diese Interaktion konnte durch die Überexpression des EGFR mit Hilfe des *hs-DER* Konstruktes bestätigt werden, da dies wie bei einer Interaktion zu erwarten zu dem gegenteiligen Ergebnis, d.h. zu einer Verstärkung des Phänotyps führte (Abb. 16E). Das *hs-DER* Konstrukt verursachte eine Verstärkung speziell im Zentralgehirn (Pfeil in Abb. 16E), während die optischen Loben keine Vakuolisierung zeigten. Dieser Effekt lässt sich zum einen durch eine uneinheitliche Verteilung, der durch *hs-DER* verursachten Expression erklären, oder durch eine unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Gehirnregionen. Die Überexpression von *rhomboid* (*rho*), einem spezifischen Aktivator des EGFR (Bier *et al.* 1990), durch ein *hs-rho* Konstrukt, erhöhte jedoch die Intensität der Vakuolisierung in allen untersuchten Gehirnregionen (Abb. 16D und 17A). Das P-Element

Allel *drk*^{ko2401} führte im *vap*² Hintergrund zu einer Verminderung der Degeneration (Abb. 16G und 17B). *Drk* (*downstream of receptor kinase*) vermittelt Signale zwischen Rezeptortyrosinkinasen und Ras1 (Olivier *et al.*, 1993). Die Reduktion der Gendosis von *Sprouty*, einem intrazellulären Inhibitor des EGFR/Ras Signalweges (Casci *et al.*, 1999) durch Einkreuzen des Allels *sty*^{S73} in die *vap*² Mutante, verursachte wiederum eine Verstärkung des *vap*² Phänotyps (Abb. 16C und 17A). Die bisher beschriebenen Ergebnisse verweisen auf einen engen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des EGFR und der Aktivität von RasGAP, dessen Rolle als negativer Regulator damit bestätigt wird.

Eine direkte Interaktion mit dem *Drosophila* Ras1 Homologen *Ras85D* konnte mit den *vap*² Fliegen die heterozygot für das Ras1 Nullallel *Ras*^{deltaC40B} waren, gezeigt werden. In diesen Fliegen war der Neurodegenerationsphänotyp signifikant abgeschwächt (Abb. 16I und 17B). Wurde andererseits mit Hilfe des *elav-GAL4* Treibers, die wildtypische cDNA *UAS-Ras1* in den Neuronen der *vap*² Mutante exprimiert, zeigte sich bereits in 6 Tage alten Fliegen eine starke Zunahme des Phänotyps (Abb. 16F und 17A). Das gleiche Experiment führte in wildtypischen *w*¹¹¹⁸ Fliegen und in den Kontrollfliegen, die nur das *elav-GAL4* Konstrukt trugen zu keiner Vakuolisierung (Daten nicht gezeigt). Keine Interaktion konnte mit *Sos*^{34Ea-6} einem EMS induzierten Allel von *Son of sevenless*, einem RasGEF (guanyl nucleotide exchange factor) Protein, das ebenfalls eine bekannte Komponente des EGFR/Ras Signalweges darstellt (Simon *et al.*, 1991, Rebay *et al.*, 2000), und mit dem ‘loss-of-function’ Allel der MAPK *rl*^{10A} nachgewiesen werden. Mit beiden Allelen wurde zwar der Phänotyp abgeschwächt, was mit der Vorstellung, dass RasGAP als ein negativer Regulator dieses Pathways agiert, übereinstimmen würde. Aber in den Kontrollfliegen, d.h. die *vap*² Fliegen aus der jeweiligen Kreuzung mit dem entsprechenden Balancerchromosom, zeigten ebenfalls eine verminderte Ausprägung des Phänotyps (Daten nicht gezeigt). Es konnte also nicht ausgeschlossen werden, dass die Suppression durch den genetischen Hintergrund verursacht wurde. Schließlich sollte noch Raf, eine Kinase, die ebenfalls genetisch mit Ras1 interagiert (Karim und Rubin, 1998), getestet werden. *vap*² Fliegen, die eine Kopie des ‘loss of function’ Alleles *Raf*¹¹⁻²⁹ trugen, zeigten jedoch keinen veränderten Phänotyp.

Folglich konnte in diesen Experimenten durch die Aktivierung bzw. Inhibierung des EGFR Signals der *vap*² Neurodegenerationsphänotyp modifiziert werden. Und es wurde eine direkte Interaktion von *vap*² mit Ras1 nachgewiesen. Mit den Ras1 Effektoren Raf und der MAPK wurde keine genetische Interaktion erzielt. Durch die Überexpression des EGFR (Abb. 16E)

und von Ras1 (Abb. 16F) wurde ein verfrühtes Einsetzen der Vakuolenbildung induziert, was auf eine zeitliche Komponente hinweisen könnte. Möglicherweise ist dieser Effekt jedoch auf eine unspezifische Expression des *elav-GAL4* Treibers und dem Hitzeschokkonstrukt zurückzuführen.



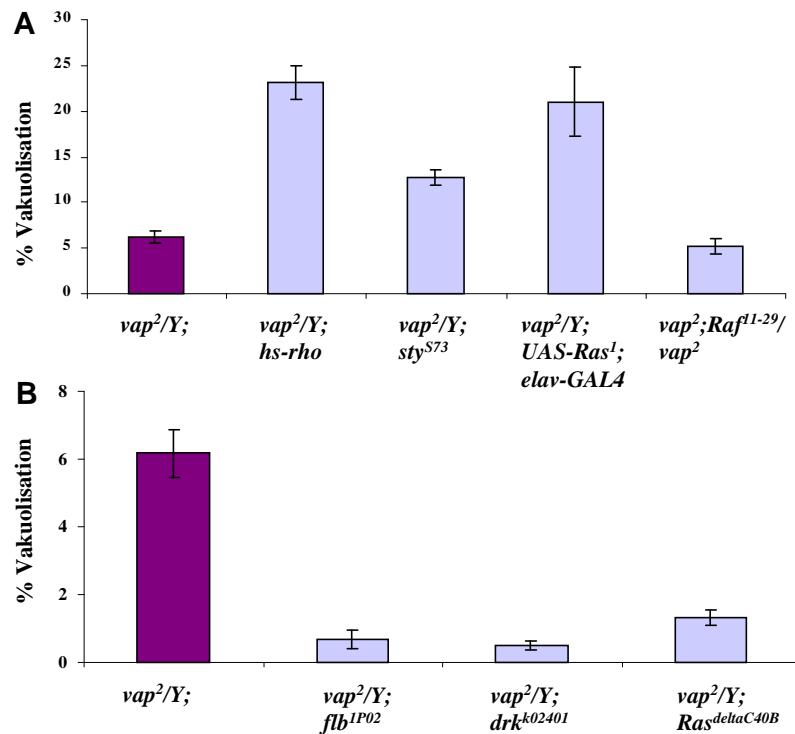


Abb. 17: Quantifizierung der genetischen Interaktionen von *vap²* mit Komponenten des EGFR-Ras Signaltransduktionsweges. An Paraffinschnitten von 18 Tage alten Fliegen des jeweils angegebenen Genotyps wurde ermittelt, welcher prozentuale Anteil des Gesamtgewebes der Medulla und der Lobulla von der Vakuolisierung betroffen war. (A) Die Vakuolisierung in der *vap²* Mutante konnte durch das Einkreuzen von *hs-rho*, *sty^{S73}*, und die Überexpression von *RasI* signifikant verstärkt werden. Die Reduktion der Gendosis von *Raf* führte zu keiner Modifikation des Phänotyps. (B) Das Einkreuzen der Allele *flb^{IP02}*, *drk^{k02401}* und *Ras^{deltaC40B}* führte zu einer signifikanten Verminderung der Vakuolisierung.

4.4. Analyse des veränderten phototaktischen Verhaltens der *vap* Mutante

4.4.1. Die Phototaxisreaktion in der *vap* Mutante

Das Verhaltensrepertoire eines Organismus beruht auf der Leistungsfähigkeit seines Nervensystems. Dass die Funktion der Nervenzellen in der *vap* Mutante stark beeinträchtigt sein muss, lässt sich unschwer aus ihrer Morphologie in den EM Aufnahmen, und aus dem Erscheinungsbild des ZNS in den Paraffinschnitten entnehmen. So lag es nahe auch das Verhalten der *vap* Fliegen zu testen. Es wurde dafür ein Standard Verhaltenstest für schnelle Phototaxis gewählt, der in der von Benzer (1967) beschriebenen Apparatur, nach der Methode der ‘countercurrent distribution’ (Singh, 1993) durchgeführt wurde. In diesen Experimenten wurde eine Population von jeweils 60-70 Fliegen in das erste von sechs durchsichtigen Röhrchen platziert und auf eine horizontale Unterlage gelegt. Indem sie sich zu einer Lichtquelle, die sich distal zur Startposition befand, hinbewegten, wurden die Fliegen durch die Röhrchen in einem Intervall von 1 min befördert (zum Licht Experiment). Die Versuche wurden mit dem *vap*² Allel durchgeführt, und die getesteten Fliegen waren jeweils 5 Tage alt. Als Wildtypkontrolle wurde die CantonS Linie verwendet, da *w¹¹¹⁸*, die parentale Linie von *vap*², weiße Augen besitzt und bekannt ist, dass die Pigmentierung der Augen einen wesentlichen Einfluss auf die Phototaxisreaktion der Fliegen hat (Parsons, 1973).

Von der Gesamtpopulation blieben im Durchschnitt 14 % der Wildtyp-Fliegen im Startröhrchen, während sich 19 % der Fliegen nach jedem Transfer zum Licht bewegten, um nach 5 Zyklen im letzten Röhrchen zu enden (Abb.18 A). Im Vergleich dazu verblieben 35 % der *vap*² Fliegen im Startröhrchen, während nur 7 % das letzte Röhrchen erreichten (Abb.18 C). Diese Tendenz verstärkte sich noch, wenn die Mutante 15 Tage lang gealtert wurde. In diesem Fall waren am Ende des Experiments noch 66 % der Individuen im Startröhrchen und nur 1 % erreichte das Zielröhrchen (Abb.18D). Dass dieses Verhalten nicht das Ergebnis von negativer Phototaxis war, zeigte sich durch ein Experiment, bei dem die Orientierung des Apparates relativ zum Licht umgekehrt wurde (vom Licht Experiment). Das Licht befand sich folglich hinter den Fliegen an der Startposition, und der Weg vom Licht weg in den abgedunkelten Bereich stand frei. 24 % der CantonS Fliegen blieben in der Startposition, 5 %

bewegten sich bis zum letzten Röhrchen (Abb.18A). Von den *vap²* Fliegen waren am Ende der 5 Zyklen noch 57 % in der Startposition und nur 1% im letzten Röhrchen (Abb.18C).

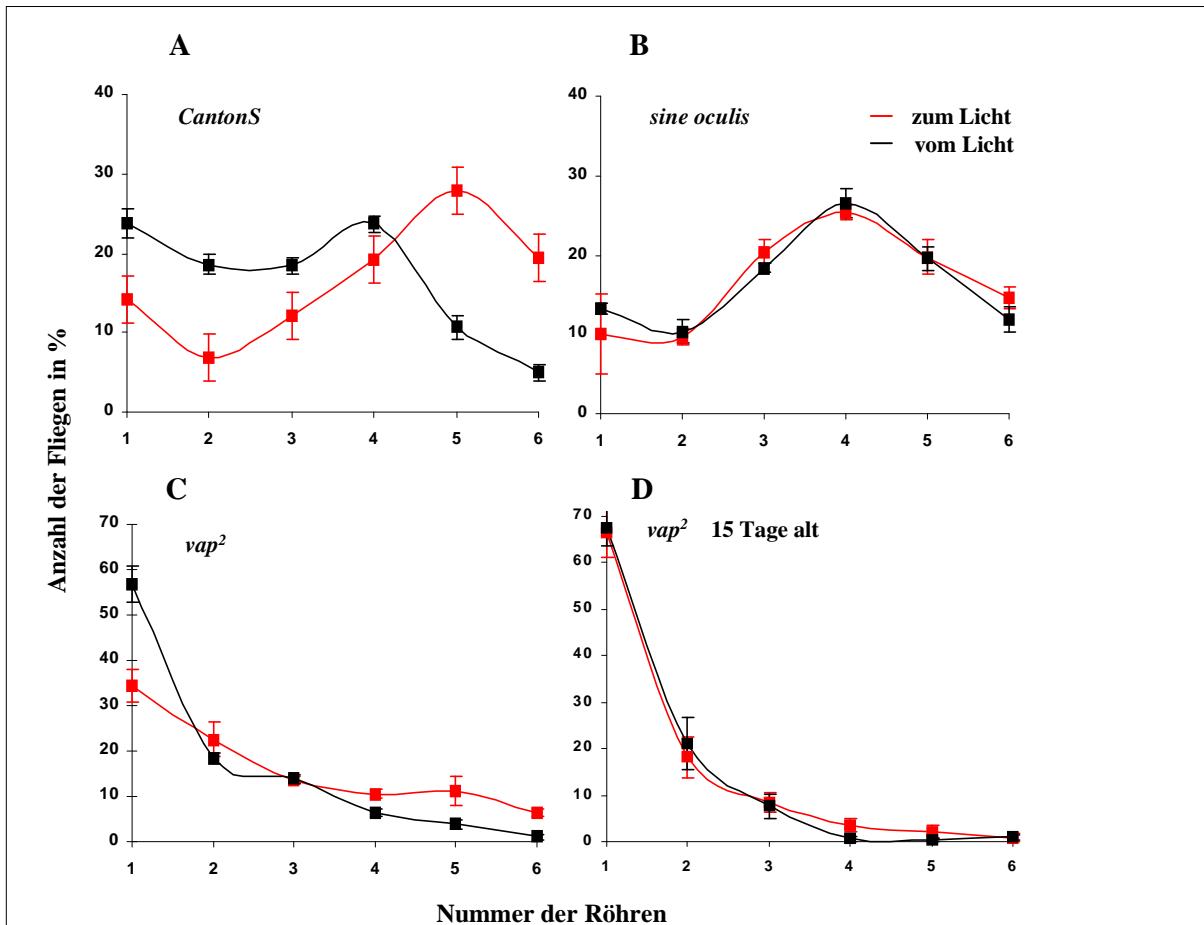


Abb. 18: Verteilungskurven von *vap²* Fliegen im Vergleich zu *CantonS* und *sine oculis* Fliegen ermittelt im Phototaxisapparat. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Fliegen in jedem Röhrchen nach 5 Zyklen. Die rote Kurve gibt das Ergebnis des ‘zum Licht’ Experiments wieder, die schwarze Kurve repräsentiert das ‘vom Licht’ Experiment. Alle Fliegen waren, wenn nicht anders angegeben, 5 Tage alt. (A) Wildtypkontrolle: *CantonS* Fliegen verhalten sich phototaktisch positiv, im ‘zum Licht’ Experiment ist ihre Tendenz sich vom Licht wegzubewegen gering. (B) Verteilungskurve von *sine oculis* Fliegen als Beispiel für nicht-phototaktisches Verhalten, aufgrund von fehlender Reizverarbeitung. Beide Kurven zeigen das gleiche Verteilungsmuster, dies demonstriert, dass *sine oculis* Fliegen sich zufällig in der Apparatur bewegen. (C) und (D) Verhaltensphänotyp der *vap²* Mutante. *vap²* Fliegen zeigen eine geringe Tendenz sich auf den Lichttreiz hin zu bewegen. Der Großteil der Fliegen bleibt sowohl beim ‘zum Licht’ als auch beim ‘vom Licht’ Experiment im Startröhrchen. *vap²* Fliegen zeigen jedoch keine negative Phototaxis. Bei 15 Tage alten *vap²* Fliegen hat sich die Phototaxisreaktion noch stark verschlechtert. Die Anzahl der Fliegen, die im ersten Röhrchen geblieben sind, hat sich verdoppelt. Die Kurven, die sich aus dem ‘zum Licht’ und ‘vom Licht’ Experimenten ergeben, sind nahezu identisch.

D.h. die Mutante ist nicht negativ phototaktisch, da sie das Licht nicht meidet, außerdem ergibt sich im Vergleich zum ‘zum Licht’ Experiment für die Startposition ein Differenz von 22 %, dabei handelt es sich um Fliegen, die noch positiv phototaktisch reagiert haben. Diese

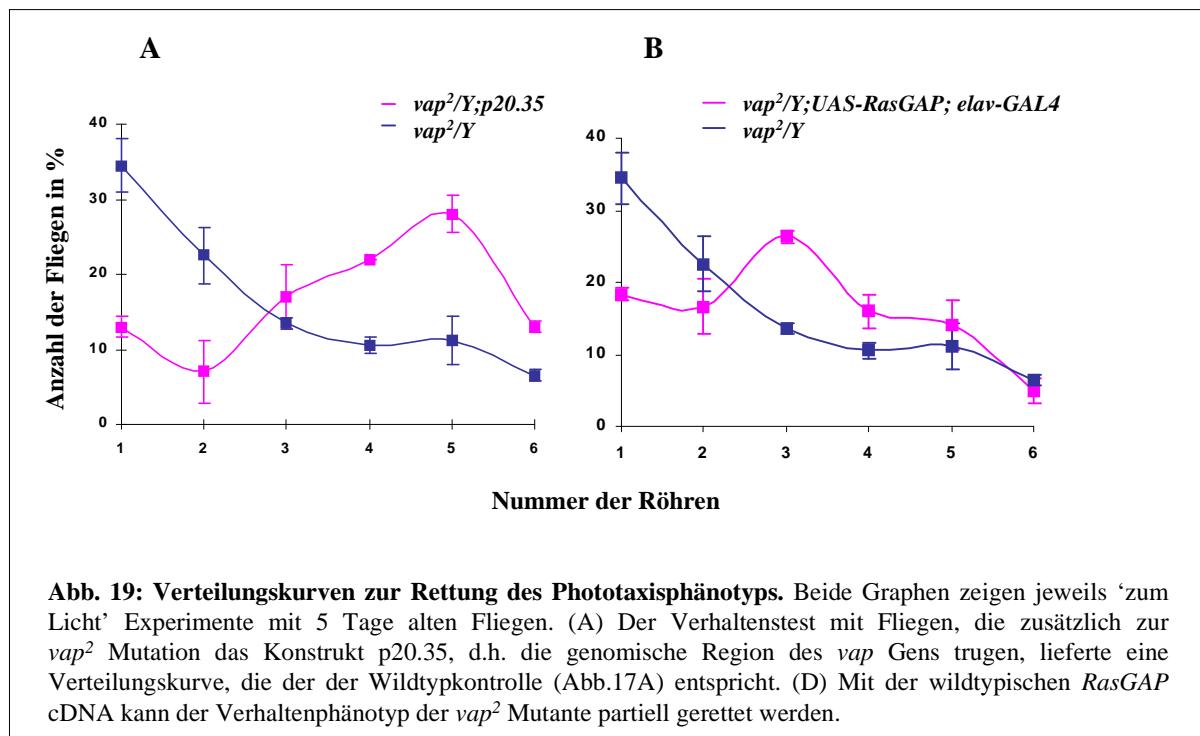
Differenz ist bei 15 Tage alten *vap*² Fliegen nicht mehr zu beobachten, was die progressive Verschlechterung der Phototaxisreaktion zeigt. Es kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die *vap* Mutante blind ist. Wie durch den Versuch mit *sine oculis* Fliegen gezeigt wurde, bewegen sich Fliegen, die den Lichtreiz nicht wahrnehmen, zufällig in den Röhrchen (Abb.16 E). Die Mehrzahl der Individuen sammelt sich dabei im vierten Röhrchen, wobei die Verteilungskurven für das ‘zum Licht’ Experiment und für das ‘vom Licht’ Experiment identisch sind. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in der *vap*² Mutante möglicherweise die Lokomotion bzw. Koordinationsfähigkeit beeinträchtigt ist.

4.4.2. Rettung des Verhaltensphänotyps

Als nächstes sollte getestet werden, ob das Wiederherstellen der RasGAP Aktivität in der *vap*² Mutante die Phototaxisreaktion auf das wildtypische Niveau revertieren würde. Damit wäre bewiesen, dass die Ursache für den beobachteten Phänotyp der Funktionsverlust des RasGAP Proteins ist. Für diesen Versuch wurde zunächst das genomische Konstrukt p20.35 verwendet, das von D. Hughes zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Plasmid besteht aus der wildtypischen *RasGAP* cDNA, an deren 5’Ende ca. 2.5 kb genomische Sequenz stromaufwärts ab dem Startcodon des *RasGAP* Gens fusioniert wurde. Das Konstrukt beginnt in dem stromaufwärts von *RasGAP* gelegenen Gen CG12695 mit dem Nukleotid 298369 (EMBL Sequenz: AE003500), während die cDNA mit dem Nukleotid 295871 beginnt (persönliche Mitteilung D.Hughes).

Die Fliegen mit dem Genotyp *vap*²/Y; *p20.35*/*+* waren im Verhaltenstest positiv phototaktisch; die ermittelte Verteilungskurve gleicht der des Wildtyps (Abb.19A). In der Mutante konnte folglich das wildtypische Verhalten wiederhergestellt werden. Außerdem wurde wieder das UAS/GAL-4 System verwendet, um die wildtypische RasGAP cDNA *UASRasGAP* in *vap*² Fliegen zu exprimieren. Eine neuronale Expression wurde mit Hilfe der *elav-GAL4* Linie erreicht. Wie in Abb. 19B zu erkennen ist, bleiben 18 % der Fliegen mit dem Genotyp *vap*²/Y; *UAS-RasGAP/elav-GAL4* in der Startposition, im Vergleich zur *vap*² Mutante haben damit im Durchschnitt 17 % mehr Fliegen die Startposition verlassen, und im Vergleich zum Wildtyp bleiben nur 4 % mehr in dem ersten Röhrchen. In diesem Versuch konnte das Verhalten zwar nicht auf das wildtypische Niveau gebracht werden, aber die Phototaxisreaktion wurde deutlich verbessert. Aus den beiden Experimenten geht hervor,

dass die Expression von RasGAP notwendig und ausreichend für die Rettung des Phototaxisphänotyps ist. Der Funktionsverlust des RasGAP Proteins ist eindeutig als Ursache für die Verhaltensänderung anzusehen.

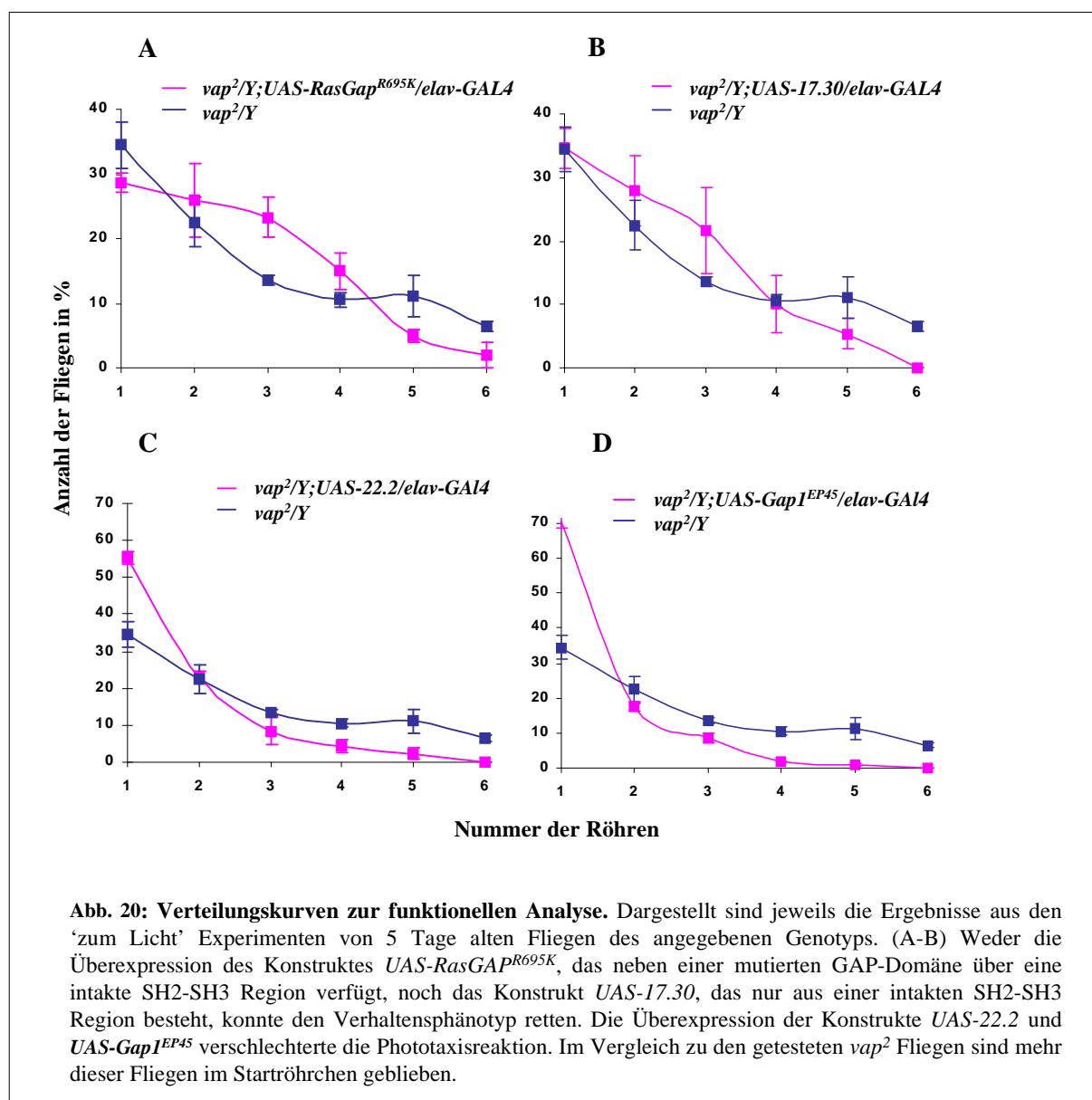


4.4.3. Funktionelle Analyse mit verschiedenen cDNA Konstrukten

Dass durch die ektopische Expression der RasGAP cDNA *UAS-RasGAP* eine Verbesserung des positiven phototaktischen Verhaltens erreicht werden konnte, wurde, wie in Kapitel 4.2.3. als Grundlage für eine funktionelle Analyse genutzt. Ziel war es wieder zu versuchen, den Beitrag den die SH2 bzw. die GAP-katalytische Region in der Vermittlung des Verhaltensphänotyps leisten, zu ermitteln. Es wurden auch in diesen Experimenten die drei bereits beschriebenen Konstrukte, *UAS-RasGAP^{R695K}*, *UAS-22.2*, *UAS-17.30* und *UAS-Gap1^{EP45}* in der *vap²* Mutante mit dem neuronalen Treiber *elav-GAL4* überexprimiert.

Wurden Fliegen getestet, in denen das Plasmid *RasGAP^{R695K}* exprimiert wurde, so dass eine intakte SH2 aber eine mutierte GAP-katalytische Region vorhanden war, entsprach die Verteilungskurve der der *vap²* Mutante (Abb. 20A). Das gleiche Ergebnis wurde mit dem

Konstrukt *UAS-17.30*, das nur die SH2-SH3-SH2 Domäne umfasst, erzielt (Abb. 20B). Die Überexpression des *UAS-22.2* Transgens, in dem beide SH2 Domänen in ihrer Funktion eingeschränkt sind, führte zu einer Verschlechterung der Phototaxisreaktion (Abb. 20C). Und auch die Expression des *UAS-Gap1^{EP54}* Transgens im *vap²* Hintergrund hatte eine Verschlechterung des Verhaltens zur Folge. Mit keinem der drei Konstrukte konnte folglich eine Verbesserung des Verhaltensphänotyps erreicht werden, was darauf hinweist, dass beide untersuchten Domänen funktionell vorliegen müssen, um den Verhaltensphänotyp zu retten. Die Expression von Gap1, das ebenfalls über eine GAP-katalytische Domäne verfügt, konnte die Funktion von RasGAP nicht ersetzen.



4.4.4. Analyse genetischer Interaktion mit dem EGFR/Ras/MAPK Signaltransduktionsweg

Ein weiteres Ziel war es zu testen, ob der Einfluss von RasGAP auf die Phototaxis, über den EGFR/Ras/MAPK Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Um Interaktionen zwischen RasGAP und einzelnen Komponenten dieses Signalwegs zu untersuchen, wurden Mutationen in den entsprechenden Genen auf ihre Fähigkeit hin getestet, die Phototaxisreaktion der *vap*² Mutante zu modifizieren. Dafür wurden die jeweiligen mutanten Allele heterozygot in für das *vap*² Allel hemizygote Männchen eingekreuzt. Die Fliegen wurden 5 Tage lang gealtert, und im Phototaxisapparat getestet.

Wurde eine Kopie von *Drosophila* Ras1, durch das Einkreuzen des Nullalleles *Ras*^{DeltaC40B} entfernt, konnte keine signifikante Modifikation der Phototaxisreaktion beobachtet werden (Abb. 21D). Von den getesteten ‘upstream’ Elementen konnte mit dem Nullallel des EGFR, *flb*^{IPO2}, die positive Phototaxisreaktion deutlich verbessert werden. 16 % der Fliegen blieben nach 5 Zyklen im Startröhrchen zurück, während im Fall der *vap*² Mutante 34 % im Startröhrchen übrig waren (Abb. 21). Mit dem *flb*^{IPO2} Allel wurde die Gendosis eines Aktivators des Ras Signalwegs reduziert. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, wenn man davon ausgeht, dass die Mutation in *RasGAP* zu einer stärkeren Aktivierung von Ras1 führt. Es wurden ‘loss of function’ Mutationen in zwei weiteren ‘upstream’ Elementen getestet, die ebenfalls zur Aktivierung von Ras unterhalb des EGFR Signalweges beitragen: *Sos*^{34Ea-6} und *drk*^{ko2401}. Mit beiden konnte keine relevante Modifikation des Verhaltensphänotyps erreicht werden (Abb. 21B und C). Ebenfalls wurde keine Interaktion mit Sprouty, einem negativen Regulator des EGFR, durch Einkreuzen des *sty*^{S73} Alleles erzielt (Abb. 21E). Die Serin/Threonin Kinase Raf ist ein essentieller Effektor ‘downstream’ von Ras (Review: Avruch *et al.*, 1994). Fliegen, die eine Kopie des ‘loss of function’ Alleles *Raf*^{I1-29} trugen, zeigten eine starke Verbesserung des Verhaltens. Der Verteilungskurve in Abb. 20C kann entnommen werden, dass nur 7 % im Startröhrchen geblieben waren, während von den Kontrollfliegen 33 % die Startposition nicht verlassen haben. Die Kontrollfliegen sind in diesem Fall *vap*² Weibchen, da Raf auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, und auf das *vap*² Chromosom rekombiniert werden musste. Dass das Entfernen eines Aktivators, den Phänotyp supprimiert, stimmt wieder mit der Hypothese eines überaktivierten Ras Signalweges überein. Das gleiche Ergebnis konnte mit einem weiteren Aktivator, der MAPK erzielt werden. Wurde durch Einkreuzen des Nullalles *rl*^{10a} in *vap*² Männchen eine Kopie der

MAPK entfernt, konnte ein verbessertes phototaktisches Verhalten beobachtet werden. Von der Gesamtzahl der Männchen mit dem Genotyp *vap*²/Y; *rl*^{10a}+/+, haben im Vergleich zur *vap* Mutante 20 % mehr die Startposition verlassen (Abb. 22B). Die ‘gain of function’ Mutation *rl*^{sem} der MAPK führte im *vap*² Hintergrund zu keiner Suppression des Phänotyps (Abb. 22A). In beiden Fällen stimmt die Richtung der Modifikation damit überein, dass die MAPK als ein positiv wirkendes Element des EGFR/Ras Signalweges angesehen wird. Die beiden ETS-Domänen Transkriptionsfaktoren *pointed* (*pnt*) und *yan* (*aop*, *anterior open*) sind Zielgene der aktivierten MAPK (O’Neill *et al.* 1994). Mit beiden konnte eine Suppression des Verhaltensphänotyps erreicht werden. Nur 4 % der Fliegen, die eine Kopie des Nullallels *aop*¹ trugen, und 16 % der Fliegen, die das Nullallel *pnt*⁴⁸⁸ trugen waren am Ende des Experiments im ersten Röhrchen geblieben (Abb. 22D und E). Dem stehen 14 % im Falle der Wildtypkontrolle gegenüber, und 34 % im Fall der *vap*² Mutante.

Tabelle 7: Quantifizierung der genetischen Interaktionen mit *vap*² im Verhaltenstest

Getestetes Gen (Allel)	Anzahl der Fliegen im Startröhrchen (% \pm SEM)	signifikante Suppression des Verhaltensphänotyps
<i>vap</i> ²	34.5 \pm 3.5	
<i>Egfr</i> (<i>flb</i> ^{1P02})	16.0 \pm 6.0	Ja
<i>sprouty</i> (<i>sty</i> ^{S73})	28.0 \pm 1.5	Nein
<i>drk</i> (<i>drk</i> ^{k02401})	49.3 \pm 4.5	Nein
<i>Sos</i> (<i>Sos</i> ^{34Ea-6})	33.0 \pm 4.4	Nein
<i>Ras1</i> (<i>Ras</i> ^{DC40B})	26.0 \pm 2.1	Nein
<i>Raf</i> (<i>Raf</i> ^{J1-29})	7.3 \pm 2.7	Ja
<i>rolled</i> (<i>rl</i> ^{sem})	41.3 \pm 1.8	Nein
<i>rolled</i> (<i>rl</i> ^{10A})	14.3 \pm 3.4	Ja
<i>pnt</i> (<i>pnt</i> ⁸⁸)	16.0 \pm 4.7	Ja
<i>yan</i> (<i>aop</i> ¹)	4.0 \pm 0.0	Ja

Mutierte Allele von bekannten Komponenten des EGFR/Ras/MAPK Signalweges wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, den *vap*² Verhaltensphänotyp zu modifizieren.

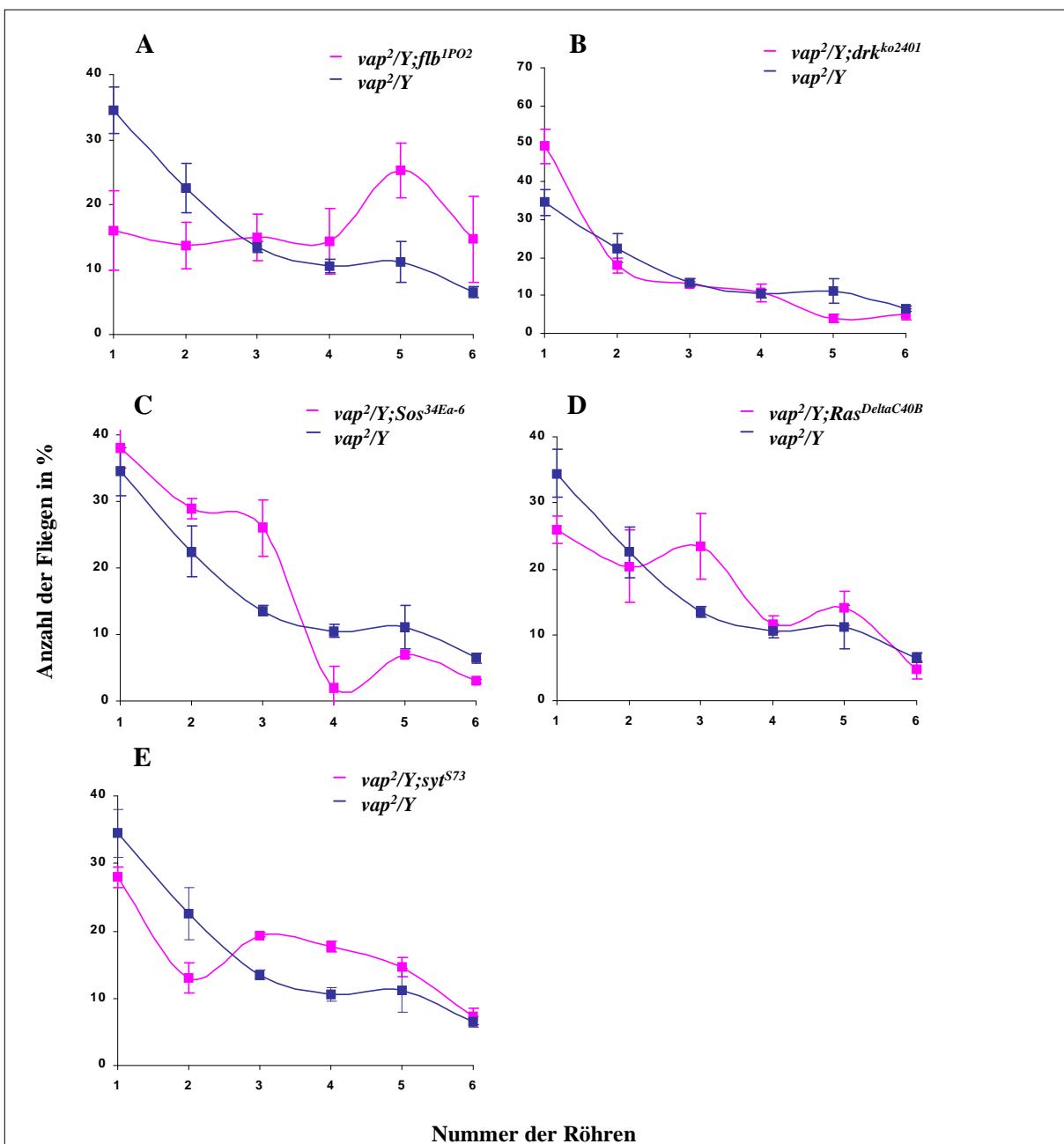


Abb. 21: Verteilungskurven zu den Interaktionen mit ‘upstream’ Elementen des EGFR/Ras/MAPK Signalweges. Gezeigt sind die Verteilungskurven aus ‘zum Licht’ Experimenten mit 5 Tage alten Fliegen vom jeweils angegebenen Genotyp. (A) Das Einkreuzen des EGFR Nullallels *flb^{IPO2}* in den *vap²* Hintergrund, führte zu einer deutlich verbesserten Phototaxisreaktion. (B-E) Durch das Einkreuzen von mutierten Allelen der Gene *drk*, *Sos*, *sty* und *Ras1* konnte der Verhaltensphänotyp der *vap²* Mutante nicht signifikant modifiziert werden.

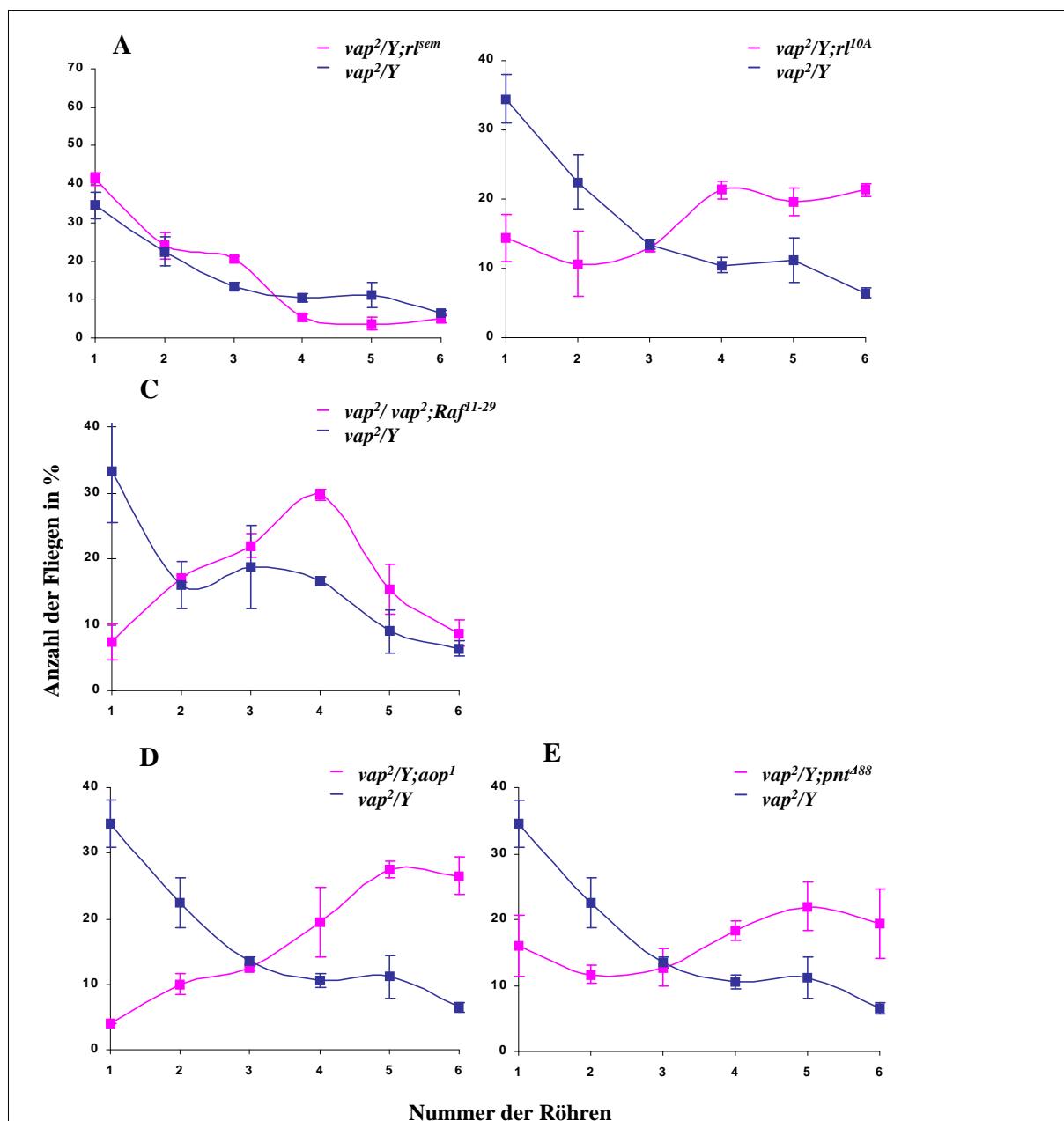


Abb. 22: Verteilungskurven zu den Interaktionen mit ‘downstream’ Elementen des EGFR/Ras/MAPK Signalweges. Dargestellt sind wieder die Ergebnisse aus ‘zum Licht’ Experimenten mit 5 Tage alten Fliegen des jeweils angegebenen Genotyps. (A) Das ‘gain-of-function’ Allel der MAPK *rl^{sem}* führte im *vap²* Hintergrund zu keiner Modifikation des Phänotyps. (B) Das ‘loss-of-function’ Allel der MAPK *rl^{10A}* führte zu einer Suppression des Verhaltensphänotyps. (C) Durch eine Reduktion der Gendosis von *Raf* in *vap²* Fliegen konnte die Phototaxisreaktion ebenfalls verbessert werden. (D-E) Durch Mutationen in *pnt* und *aop* konnte der Verhaltensphänotyp ebenfalls supprimiert werden.

4.5. Microarrayanalyse

4.5.1. Analyse der veränderten Genexpression in Köpfen der *vap* Mutante

Die Analyse von Transkripten in ganzen Genomen wird durch DNA Microarrays möglich gemacht (Review: Lipshutz *et al.*, 1999, Maughan *et al.*, 2001). Sie erlauben es, die Expression Tausender von Genen unter bestimmten experimentellen Bedingungen gleichzeitig zu untersuchen (Review: Lockhart *et al.*, 1996). Diese relativ neue Methode wurde hier angewandt, um einen qualitativen Überblick darüber zu erhalten, welchen Einfluss die Mutation in RasGAP auf die Genexpression im gesamten Genom von *Drosophila* hat. Und um mögliche Mechanismen aufzudecken, die der Neurodegeneration in der *vap* Mutante zu Grunde liegen. Die Veränderung der Genexpression kann möglicherweise helfen, Zielgene von RasGAP zu identifizieren, die dazu beitragen die Neurodegeneration zu erklären.

Für dieses Experiment wurde 30-40 µg gesamt RNA aus den Köpfen von 5 Tage alten *w¹¹¹⁸*, *vap¹* und *vap²* Fliegen isoliert. Um ein gewisses Maß an Reproduzierbarkeit sicher zu stellen, wurden von der Mutante Proben für drei Experimente hergestellt: einmal wurde gesamtRNA aus *vap¹* Fliegen isoliert, und zweimal gesamtRNA aus *vap²* Fliegen, aus unterschiedlichem Material. Die verwendeten Fliegen wurden jeweils zum gleichen Zeitpunkt abgesammelt, um auszuschließen, dass Unterschiede in der Genexpression aufgrund der circadianen Rhythmik zustande kommen. Die Qualität der gesamtRNA wurde auf einem Formaldehydgel getestet. Die Synthese der cRNA Sonde, die Hybridisierung und Auswertung der verwendeten GeneChip® Arrays der Firma Affimetrix, sowie die Analyse der Rohdaten wurde von der Firma ‘Transferzentrum Proteom-Analyse, Rostock’ durchgeführt (Kapitel 3.2.7.). Für die Datenanalyse wurden die Ergebnisse von jeweils zwei Arrays (‘experiment versus baseline array’) miteinander verglichen, um Veränderungen in der Genexpression zu detektieren und zu quantifizieren (Affimetrix, 2002). Das Expressionsprofil, das aus dem *w¹¹¹⁸* Array resultierte, wurde jeweils mit dem aus den *vap²* bzw. *vap¹* Arrays resultierenden Expressionsprofil verglichen. Außerdem wurden in einem weiteren Experiment die Expressionsprofile der Arrays, die mit den beiden *vap²* Sonden hybridisiert wurden, miteinander verglichen, um die Gene zu detektieren die in ihrer Expression verändert sind, ohne dass dies auf die Mutation in RasGAP zurückzuführen wäre. Damit sollten bei der Analyse der deregulierten Genen die falsch Positiven aussortiert werden können.

4.5.2. Einteilung der deregulierten Gene in funktionelle Gruppen

Nach der Datenanalyse wurde für jedes Experiment eine sortierte Tabelle zur Verfügung gestellt, die die Analyseparameter der Affimetrixsoftware beinhaltet. Dabei wird für jedes Gen unter anderem ein ‘detection call’ angegeben, der anzeigt, ob auf dem Array für das jeweilige Gen ein Signal detektiert werden konnte (present call), oder ob kein Signal detektiert wurde (absent call). Der ‘difference call’ definiert die Änderung des Expressionslevels als ‘erhöht’ (increase), ‘erniedrigt’ (decrease), ‘marginal erhöht’ oder ‘erniedrigt’ (marginal increase or decrease) oder als ‘nicht verändert’ (no change). Schließlich wird das absolute Expressionslevel als ‘fold change’ angegeben (Affimetrix, 2002). Von der Analyse wurden alle Gene ausgeschlossen, deren Expressionslevel als nur marginal erhöht oder erniedrigt bzw. nicht verändert klassifiziert wurden. Von den ca. 13.500 Genen, die auf den Affimetrix Chips repräsentiert sind, und damit nahezu das gesamte Drosophila Genom abdecken, waren in den drei Experimenten jeweils ca. 500 als reprimiert (decreased) und ca. 600 als überexprimiert (increased) klassifiziert. Aus diesen wurden die Gene mit einem ‘present call’ ausgewählt, die in mindestens zwei der drei Experimente als überexprimiert bzw. reprimiert definiert wurden, und deren Expressions mindestens 2-fach erhöht bzw. erniedrigt war. Dabei wurden in einem ersten Schritt alle bekannten Gene berücksichtigt, um dann die Daten nach spezifischen funktionellen Gruppen zu durchsuchen.

Die Hybridisierung der Arrays erwies sich als gut reproduzierbar. Für die absolute Expressions wurde für jedes der differentiell exprimierten Gene der ‘Standard error of the mean’ (SEM) aus den jeweils zwei bzw. drei Experimenten ermittelt. Von den insgesamt 141 identifizierten Genen lag der SEM bei 105 Genen unter 0.5, und bei 27 zwischen 0.5 und 1.0. Nur bei 9 Genen war der SEM größer als 1.0. Damit wurde auch die Vorgehensweise, für die Analyse Daten von zwei verschiedenen Allelen (*vap*¹ und *vap*²) zu verwenden, legitimiert. Die 141 Gene, die in der RasGAP Mutante im Vergleich zur Wildtypkontrolle als differentiell reguliert identifiziert wurden, wurden aufgrund der bekannten bzw. vorhergesagten Funktion (Flybase, 2003) ihrer Genprodukte in verschiedene Kategorien eingeteilt (Tab. 8). Obwohl Gene vielfältige Funktionen übernehmen können, wurde diese vereinfachte Einteilung gewählt, um einen generellen Überblick zu schaffen, und mögliche funktionelle Zusammenhänge darzustellen. Darunter fanden sich unter anderem Gene, die für

Komponenten der Transkription und Translation, der Zelladhäsion, des Zytoskeletts, der Phototransduktion, für Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Proteasen kodieren.

Tabelle 8: Differentiell exprimierte Gene in adulten Köpfen der *vap* Mutante

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor (mean \pm SEM)
<u>Synapsen:</u>		
Gad1	Glutamic acid decarboxylase 1 / transmitter metabolism, differentiation	7.9 \pm 1.9
Syn	Synapsin / synaptic vesicle	7.6 \pm 1.9
Appl	β amyloid protein precursor-like / synapse differentiation	6.2 \pm 0.9
Syt	Synaptotagmin / synaptic vesicle	4.5 \pm 1.1
Fas3	Fasciclin 3 / synaptic architecture	3.7 \pm 0.0
Fas1	Fasciclin 1 / synaptic architecture	3.1 \pm 0.4
Con	Connectin / synaptic architecture	3.0 \pm 0.1
SytIV	Synaptotagmin IV / synaptic vesicle	2.1 \pm 0.1
<u>Zytoskelett:</u>		
CG11099	actin binding	4.8 \pm 0.1
Kap	Kinesin II accessory protein / non-motor subunit	3.9 \pm 1.0
Arp14D	actin-related protein 14D / cytoskeletal structural protein	3.6 \pm 0.5
unc-104	kinesin-like / kinesin motor	2.9 \pm 0.3
CG1776	myosin light chain kinase / protein kinase	-2.8 \pm 0.6
d	dachs / myosin ATPase	-2.6 \pm 0.2
CG8800	dynein light chain-like / actin binding	-2.4 \pm 0.3
CG7716	gamma-tubulin ring protein-like / cytoskeletal structural protein	-2.5 \pm 0.1
<u>Zelladhäsion:</u>		
CG14762	cell adhesion	4.5 \pm 0.8
CG7166	cell adhesion	4.3 \pm 0.0
CG1282	titin/twitchin-like / cell adhesion	3.1 \pm 0.3
CG5742	cell adhesion	3.0 \pm 0.3
CG10148	cell adhesion	2.6 \pm 0.4
<u>Detoxifikation:</u>		
Cyp6a23	Cytochrom P450-6a23	4.9 \pm 0.3
Cyp4p1	Cytochrom P450-4p1	4.1 \pm 0.6
Gst3-1	glutathione transferase	2.8 \pm 0.2
Gst3-2	glutathione transferase	
Cyp6v1	Cytochrom P450-6v1	2.8 \pm 0.0
Cyp6a20	Cytochrom P450-6a20	-7.7 \pm 1.4
Cyp6a17	Cytochrom P450-6a17	-5.3 \pm 2.7
CG17527	glutathione transferase	-3.6 \pm 0.8
CG17531	glutathione transferase	-3.0 \pm 0.0
<u>Ubiquitinsystem:</u>		
Uch	Ubiquitine carboxy-terminal hydrolase	4.5 \pm 0.1
<u>Calciumhomöostase:</u>		
CG1950	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-like	2.8 \pm 0.2
CG1090	potassium-dependent sodium/calcium exchanger	5.4 \pm 1.7
Cbp53E	Calbindin 53E / calcium binding	2.5 \pm 0.1
CG12295	voltage-gated calcium channel	4.3 \pm 0.4
TpnC47D	Troponin C at 47D	2.1 \pm 0.1
TpnC41C	Troponin C at 41D	-2.3 \pm 0.8

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 8: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor (mean \pm SEM)
CG11408	calcium -binding (B)-subunit-like	-2.9 \pm 0.3
<u>Glucosemetabolismus:</u>		
Amy-d	Amylase distal / α -amylase	9.7 \pm 1.9
CG3626	Pyruvate dehydrogenase phosphatase	4.7 \pm 0.1
CG10924	Phosphoenolpyruvate carboxylase	-4.9 \pm 0.0
Pepck	Phosphoenol-pyruvate-carboxykinase	-2.2 \pm 0.4
<u>Transkription:</u>		
TfIIIEbeta	Transcription factor II E beta	3.0 \pm 0.3
eg	eagle / transcription factor	2.9 \pm 0.1
CG17393	transcription factor	2.8 \pm 0.2
Trfp	Trf-proximal	2.8 \pm 0.1
ear	ENI/AF9-related / transcription factor	2.7 \pm 0.2
Brf	RNA polymerase II transcription factor	2.7 \pm 0.3
stwl	stonewall / RNA polymerase II transcription factor	2.3 \pm 0.1
nau	nautilus / transcription factor	2.2 \pm 0.6
CG8813	transcription factor	2.0 \pm 0.0
unpg	unplugged / RNA polymerase II transcription factor	-2.9 \pm 0.2
fd96Cb	forkhead domain 96Cb / transcription factor	-2.8 \pm 0.2
zen2	zerknult related 2 / RNA polymerase II transcription factor	-2.6 \pm 0.2
<u>Translation:</u>		
smg	smaug / RNA-binding , translation repressor	2.0 \pm 0.0
HBS1	translation release factor / translational termination	-3.4 \pm 0.2
waw	waclaw / translation factor, elongation	-3.2 \pm 0.1
<u>Ribosomen:</u>		
dbe	dribble / involved in rRNA processing	-3.2 \pm 0.5
mRpL44	mitochondrial ribosomal protein L44	-2.7 \pm 0.7
mRpL19	mitochondrial ribosomal protein L19	-2.3 \pm 0.3
<u>Proteinphosphatasen:</u>		
CG9449	acid phosphatase-like	2.9 \pm 0.1
CG11516	protein phosphatase-like	2.4 \pm 0.0
CG7180	protein tyrosine phosphatase-like	2.4 \pm 0.3
PPP4R2r	protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 related	2.1 \pm 0.0
CG5656	alkaline phosphatase-like	-2.4 \pm 0.3
<u>Proteinkinasen:</u>		
CG11533	casein kinase / protein serine/threonine kinase	5.7 \pm 0.5
trc	tricornered / protein serine/threonine kinase	5.8 \pm 0.7
Eip63F-1	Ecdyson induced protein 63F / protein serine/threonine kinase	3.4 \pm 0.0
Dgk	Diacyl glycerol kinase / phosphatidylinositol synthesis	2.6 \pm 0.1
CG2258	protein kinase	2.3 \pm 0.1
Eip63E	Ecdysone-induced protein 63E / protein serine/threonine like	2.1 \pm 0.1
CaMKII	Calcium / calmodulin dependent protein kinase II	2.1 \pm 0.1
CG2049	protein kinase C-like	2.1 \pm 0.1
CG9961	phosphoglycerate kinase-like	-3.9 \pm 0.3
Drl-2	Derailed 2 / protein tyrosine kinase	-2.2 \pm 0.6
CG7097	protein kinase-like	-2.6 \pm 0.6
CG1776	myosine-light chain kinase	-3.3 \pm 0.4

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 8: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor (mean \pm SEM)
<u>Proteasen:</u>		
CG9377	endopeptidase	-7.8 \pm 0.2
CG13318	endopeptidase	-5.0 \pm 0.2
CG14528	zinc-metalloendopeptidase	-4.6 \pm 0.3
CG8215	serine protease / endopeptidase	-3.3 \pm 0.1
CG8172	trypsin-like endopeptidase	-3.0 \pm 0.2
CG10882	trypsin alpha-like endopeptidase	-2.4 \pm 0.1
CG8555	endopeptidase	3.0 \pm 0.0
CG1950	ubiquitin thiolesterase-like / endopeptidase	2.8 \pm 0.2
CG6865	endopeptidase	2.6 \pm 0.3
CG14721	endopeptidase	2.6 \pm 0.2
ndl	nudel / serin-type endopeptidase, involved in Tl signaling pathway	2.2 \pm 0.1
<u>Kanäle:</u>		
CG9637	potassium channel-like	2.4 \pm 0.1
CG8533	glutamate gated ion-channel-like	-2.9 \pm 0.2
CG7577	amiloride-sensitive sodium channel-like / ion channel	-2.6 \pm 0.6
CG4712	ion channel	-2.5 \pm 0.0
Ork1	Openrectifier K channel 1/ potassium channel	-2.1 \pm 0.1
<u>Rezeptoren:</u>		
GABA-B-R1	metabotropic GABA-B receptor subtype 1	4.3 \pm 0.3
Wnt5	Wnt oncogene analog 5 / frizzled-2 ligand receptor	3.4 \pm 0.4
CG15614	receptor	3.3 \pm 0.0
CG7000	transmembrane receptor / scavenger receptor	3.2 \pm 0.7
5-HT2	Serotonin receptor 2	3.0 \pm 0.8
CG11155	glutamate receptor-like	2.6 \pm 0.5
Grd	Glycine receptor subunit / GABA-glycine receptor-like	2.5 \pm 0.4
Dscam	Down syndrome celladhesion molecule / axon guidance receptor	2.2 \pm 0.4
<u>Lipasen:</u>		
CG6675	lipase-like	3.8 \pm 0.2
CG17093	lipase-like	2.2 \pm 0.2
CG11124	phospholipase A2	-4.4 \pm 0.3
<u>Mitglieder der takeout-Genfamilie:</u>		
to	takeout / circadian rhythm, starvation response	-19.1 \pm 1.3
CG11854		-4.9 \pm 0.4
<u>Chaperone:</u>		
jdp	chaperon	2.4 \pm 0.1
CG3511	chaperon	-4.3 \pm 0.3
CG12879	chaperon	-2.7 \pm 0.2
<u>Chromatinstruktur</u>		
Rpd3	histon deacetylase / gene silencing, transcriptional corepressor	3.5 \pm 0.3
Pc	Polycomb / gene silencing, transcriptional repressor	3.2 \pm 0.4
<u>Phototransduktion:</u>		
Acf1	ATP-dependent chromatin assembly factor large subunit	-2.7 \pm 0.0
Gycbeta100B	Guanyl cyclase beta-subunit at 100B / synthesis of cGMP	4.5 \pm 0.5
cno	canoe / development of ommatidial architecture	4.1 \pm 0.3
nonA	non on or off transient A	2.8 \pm 0.2
Rh6	Rhodopsin 6 / light-sensitive visual pigment	2.1 \pm 0.1

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 8: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor (mean \pm SEM)
<u>Komponenten des Egfr-Signalwegs:</u>		
S	Star / Egfr ligand processing	3.1 \pm 0.3
drk	downstream of receptor kinase	2.2 \pm 0.0
<u>nicht gruppierbare Gene:</u>		
charybde		4.1 \pm 0.7
CG3216	receptor guanylate cyclase	3.5 \pm 0.2
Trn	Transportin / ligand binding or carrier	3.2 \pm 0.5
rnh1	ribonuclease H1 / exoribonuclease, degradation of RNA	3.0 \pm 0.3
fj	four-jointed / signal transduction	2.9 \pm 0.4
aret	arrest / RNA-binding	2.9 \pm 0.1
CG1283	Rho guanyl-nucleotide exchange factor	2.4 \pm 0.4
baz	bazooka / enzym	2.2 \pm 0.2
alpha-Est2	alpha-Esterase-2 / esterase unknown substrate	-6.3 \pm 0.1
Kr-h2	Krüppel homolog 2	-6.1 \pm 0.1
Rbf	Retinoblastoma-family protein / control of cell proliferation	-3.6 \pm 0.2
spn-E	spindle E / ATP dependent RNA helicase	-3.4 \pm 0.8
fd96Cb	forkhead domain 96Cb / transcription factor	-2.8 \pm 0.2
neur	neuralized / DNA binding	-2.5 \pm 0.1
l(2)gl	lethal (2) giant larvae / tumor suppressor	-2.4 \pm 0.5
Errc1	DNA repair protein	-2.4 \pm 0.3
Aprt	Adenine phosphoribosyltransferase	-2.3 \pm 0.2
Ac13E	Adenylyl cyclase 35C / synthesis of cAMP	-2.0 \pm 0.5
qkr54B	quaking related 54B / RNA binding	

Die Gene wurden entsprechend der bekannten bzw. vorhergesagten Funktion (Flybase, 2003) ihrer Genprodukte in verschiedene funktionelle Kategorien eingeteilt. Der Faktor gibt die Änderung des Expressionslevels des jeweiligen Genes in der *vap* Mutante im Vergleich zum Wildtyp wieder. Ein positiver Faktor zeigt an, dass die Expressions eines Gens erhöht war, während ein negativer Faktor für ein erniedrigtes Expressionslevel steht. Die Werte wurden aus zwei bzw. drei Arrays, wie im Text beschrieben, ermittelt.

Einige dieser Kategorien sind vom Standpunkt der Neurodegeneration von besonderem Interesse, da sie auf Vorgänge verweisen, die mit neuronalem Zelltod bzw. mit Regeneration in Verbindung gebracht werden können.

- Gene, die für Komponenten von Synapsen kodieren:

Unter den am stärksten überexprimierten Genen fanden sich verschiedene Gene, die für die Funktion von Synapsen benötigt werden. *Synapsin* war 7.8-fach und *Synaptotagmin* war 4.5-fach überexprimiert, denen beiden Funktionen an synaptischen Vesikeln zugeordnet werden können (Klagges *et al.*, 1996; Littleton, 2000). Am stärksten hochreguliert war in dieser Gruppe *Gad1* (7.9-fach), das für eine Glutamatdecarboxylase kodiert, ein Enzym das unter anderem den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Synthese von γ -Aminobuttersäure (GABA) katalysiert (Kulkarni *et al.*, 1994). Gene, wie z.B. *Fas1*, *Fas3* oder *Con*, die an der synaptischen Struktur beteiligt sind, waren ebenfalls hochreguliert. Außerdem ist

bemerkenswert, das *Appl*, das *Drosophila* Homolog zum menschlichen *APP* in der *vap* Mutante ebenfalls stark überexprimiert (6.2-fach) wird. *Appl* spielt unter anderem eine Rolle in der Differenzierung von Synapsen (Toroja *et al.*, 1999). Alle Gene, die der Gruppe der synaptischen Gene zugeordnet wurden, waren in der *vap* Mutante überexprimiert. Auch in anderen funktionellen Gruppen können Gene gefunden werden, die an der Signalübertragung zwischen Neuronen beteiligt sind. In der Gruppe der Rezeptoren ist das Gen *5-HT2* 3-fach hochreguliert, welches für einen Serotoninrezeptor kodiert, *GABA-B-R1* ist 4.3-fach hochreguliert und kodiert für den GABA-B Rezeptor.

- Gene, die für Komponenten der Kalziumhomöostase kodieren:

Auch der Haushalt des intrazellulären Messengers Ca^{2+} könnte in den Zellen der *vap* Mutante verändert sein. Fünf Gene wurden identifiziert, die der Kategorie der Kalziumhomöostase zugeordnet werden konnten. Darunter *Cbp53E*, das 2.5-fach hochreguliert war, *TpnC47D* das 2.1-fach hochreguliert war, und *TpnC41C*, dessen Expression -2.3-fach reprimiert war. Diese drei Gene kodieren für Proteine, die EF-Hände, hoch konservierte kalziumbindende Strukturmotive, besitzen. (Reifegerste *et al.*, 1993; Fyrberg *et al.*, 1994). Am stärksten hochreguliert war in dieser Gruppe das Gen CG1090 (5.4-fach), das für einen möglichen Natrium-Kalzium-Austauscher kodiert, gefolgt von dem Gen CG12295 (4.3-fach), das für einen möglichen spannungskontrollierten Kalzium-Kanal kodiert.

- Gene, die für Komponenten des Glucosemetabolismus kodieren:

Das Gen, welches in der *vap* Mutante im Vergleich zur Wildtypkontrolle am stärksten überexprimiert war, ist *Amy-d* (9.7-fach). *Amy-d* kodiert für eine α -Amylase, deren Expression von Glucose reprimiert wird (Hickey und Benkel, 1982). α -Amylasen werden von den Speicheldrüsen sezerniert, und hydrolysieren die α -(1-4)glukosidischen Bindungen der Stärke. CG3625, ein Gen das für eine Pyruvatdehydrogenasephosphatase kodiert, ist 4.7-fach überexprimiert. Pyruvatdehydrogenasephosphatasen sind aktivierende Komponenten des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes, der den Eintritt von Acetyl-CoA-Einheiten in den Zitratzyklus reguliert. *Pepck* zeigt eine -2.2-fach erniedrigte Expression, es kodiert für eine Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, welche den limitierenden Schritt der Gluconeogenese, die Umwandlung von Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat katalysiert. Von Säugetieren ist bekannt, dass die Umwandlung von Glucose zu Pyruvat und die Gluconeogenese so

koordiniert werden, das nur einer der beiden Wege eine hohe Aktivität aufweist. Somit könnte die hier beobachtete Richtung der Regulation dieser drei Gene Sinn machen (Stryer, 1995). Das circadian regulierte Gen *takeout*, dessen Expression -19.1-fach reprimiert ist, scheint eine Verbindung zwischen der circadianen Uhr und der Reaktion des Organismus auf Hunger darzustellen (Sarov-Blat *et al.*, 2000). Auch dieses Gen könnte möglicherweise der Kategorie Metabolismus zugeordnet werden.

- Gene, die für Komponenten des Ubiquitinsystems kodieren:

Das Gen *Uch*, das für eine Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase kodiert, war in *vap* Köpfen ebenfalls signifikant überexprimiert (4.5-fach). Es handelt sich dabei um ein deubiquitinierendes Enzym, das die Ubiquitinmarkierung von Proteinen auf dem Weg zum Proteasom entfernt bzw. editiert, um ihre schnelle Hydrolyse zu ermöglichen, oder sie vor dem Abbau zu schützen. (Review: Chung und Baek, 1999). CG1950, das 2.8-fach überexprimiert war, kodiert ebenfalls für eine mögliche Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase.

- Gene, die für Chaperone kodieren:

Zwei Gene, die für mögliche Chaperone kodieren waren in der *vap* Mutante reprimiert, CG3511 (-4.3-fach) und CG12879 (-2.7-fach). *jdp* war dagegen 2.4-fach hochreguliert. Es kodiert für ein Protein, das eine sogenannte J-Domäne aufweist. Man geht davon aus, dass J-Domänen generell die Interaktion der entsprechenden Proteine mit der Hsp70 Chaperon-Maschinerie ermöglichen (Lee *et al.*, 2000). Chaperone sind in allen Zellen und Organellen vorhanden. Sie sind nötig für die korrekte Faltung von Proteinen und gewährleisten, dass diese ihre native Konformation unter normalen Bedingungen und unter Stress beibehalten (Review: Hartl und Hayer-Hartl, 2002).

- Gene, die für Komponenten der Detoxifikation kodieren.

Man nimmt an, das P450 Enzyme in Insekten an der Biosynthese von Ecdysteroiden und Juvenilhormonen beteiligt sind, und so eine Rolle beim Wachstum, in der Entwicklung und Reproduktion von Insekten spielen. Sie übernehmen auch eine wichtige Funktion in der Entgiftung fremder Substanzen. Der Prozess der Detoxifikation verläuft in zwei Phasen: In der ersten Phase wird die xenobiotische Substanz durch Redoxreaktionen, die von Cytochrom P450 Enzymen katalysiert werden, in eine reaktivere Spezies umgewandelt, und werden in der zweiten Phase mit polaren Gruppen wie z.B. Glutathion versehen. Glutathion S-

Transferasen (GST) sind unter anderem an dieser zweiten Phase beteiligt. (Review: Feyereisen, 1999). Man geht außerdem davon aus, das GSTs auch an der Entfernung von reaktiven Sauerstoffspezies, die eine Konsequenz von oxidativem Stress sind, mitwirken (Review: Sheehan *et al.*, 2001). Unter den in der *vap* Mutante überexprimierten Genen fanden sich drei Gene, die für Cytochrom P450 Enzyme kodieren, *Cyp6a23* (4.3-fach), *Cyp4p1* (4.1-fach) und *Cyp6v1* (2.8-fach), während zwei dieser Gene, *Cyp6a20* (-7.7-fach) und *Cyp6a17* (-5.3-fach) reprimiert waren. Außerdem sind vier GSTs dereguliert. *Gst3-1* und *Gst3-2* waren 2.8-fach überexprimiert, und zwei weitere mögliche GSTs, *CG17527* (-3.6-fach) und *CG17531* (-3.0-fach) waren reprimiert

- Gene, die für Komponenten des EGFR/Signalweges kodieren:

Unter den differentiell regulierten Genen konnten auch zwei Gene gefunden werden, die mit dem EGFR/Signaltransduktionsweg interagieren. *Star*, das für ein membranständiges Protein kodiert, war 3.1-fach überexprimiert. *Star* wird neben Rhomboid für die Prozessierung des membrangebundenen Spitz Proteins benötigt. Spitz wiederum ist ein aktivierender Ligand des EGF-Rezeptors in *Drosophila* (Bang und Kintner, 2000). Außerdem war *drk* 2.2-fach überexprimiert; es kodiert wie bereits erwähnt für ein Adapterprotein, das die Verbindung zwischen dem aktivierte EGF-Rezeptor und Sos schafft. Eine genetische Interaktion zwischen *drk* und *vap* wurde bereits in Abschnitt 4.3.3. beschrieben.

4.5.3. Analyse der veränderten Genexpression in *vap* Larven

Die Microarray Technologie wurde auch benutzt, um die veränderte Genexpression im dritten Larvenstadium der *vap*² Mutante zu untersuchen. Dabei war die Vorgehensweise die gleiche wie unter Punkt 5.4.1. und 5.4.2. für die adulten Köpfe beschrieben. Es wurde zum einen gesamtRNA aus *vap*² und *w¹¹¹⁸* Larven isoliert, und zum anderen gesamtRNA aus Larven in denen die wildtypische cDNA *UAS-RasGAP* mit dem neuronalen Treiber *elav-GAL4* überexprimiert wurde. In diesem Versuch wurde, im Gegensatz zu den Experimenten mit adulten Köpfen, nur jeweils ein DNA-Chip für den jeweiligen Genotyp hybridisiert. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Experimente mit adulten Köpfen, sollte dennoch eine qualitative Aussage möglich sein. Die Expressionsprofile, die der *vap*² bzw. der *UAS-RasGAP/elav-GAL4* Array ergeben hatte, wurde wieder mit dem Expressionsprofil des *w¹¹¹⁸*

Arrays verglichen, um die Gene zu identifizieren, die im Wildtyp im Vergleich zur Mutante reprimiert bzw. überexprimierten sind (Anhang, Tab. 10 und 11).

4.5.3.1 Differentiell regulierte Gene in *vap²* Larven

Von der Gesamtheit der Gene, die auf den Affimetrixarrays repräsentiert sind, waren in den *vap²* Larven im Vergleich zur Wildtypkontrolle ca. 200 Gene überexprimiert und ca. 800 Gene reprimiert. Aus diesen Genen, wurden wieder die herausgesucht, die aufgrund ihrer bekannten bzw. vorhergesagten Funktion in bestimmte Kategorien eingeteilt werden konnten (Anhang, Tab. 10).

Dabei fanden sich z.B. wieder Gene, die für Komponenten des Zytoskeletts und der Zelladhäsion kodieren. Es fällt auf, dass alle Gene, die für Komponenten der Zelladhäsion bzw. für mögliche Zelladhäsionsproteine kodieren, in den Larven reprimiert waren, während in den adulten Köpfen alle Gene der Kategorie Zelladhäsion überexprimiert waren. Außerdem fällt auf, dass die Gene, die in den Adulten der Kategorie synaptische Gene zugeordnet werden konnten, in den Larven keine veränderte Expression aufwiesen. Es waren jedoch zwei Rezeptoren reprimiert, die an der Signalübertragung im Nervensystem beteiligt sind, *GABA-B-R2* (-5.0-fach) und *DopR* (-3.8-fach). Auch das Gen nAcRa-96Aa war -2.8-fach reprimiert, das für die α- Untereinheit eines möglichen Acetylcholinrezeptors kodiert. Ebenfalls konnten in den Larven im Gegensatz zu den Adulten keine Gene der Gruppe Kalziumhomöostase zugeordnet werden. Vier ecdysoninduzierte Gene waren in den *vap²* Larven überexprimiert, *Eig71Ed* (3.7-fach), *Eig71Eg* (3.3-fach), *Eig71Ec* (3.2-fach) und *Eig71Eb* (2.1-fach). Die Funktion dieser Gene wurde noch nicht molekular untersucht, aber es ist bekannt, dass sie zu einer Gruppe von 10 Genen (Eig71a-j) gehören, die während der Metamorphose koordiniert reguliert werden (Wright *et al.*, 1996). Außerdem waren zwei Gene, die genetische mit Ras1 interagieren in den Larven differentiell exprimiert. *pnt* war -4.6-fach reprimiert, und *csw* 2.0-fach hochreguliert. (O'Neil *et al.*, 1994 und Allard *et al.*, 1996).

Außerdem wurde überprüft, welche der Gene, die in den Köpfen eine veränderte Expression zeigten, bereits im dritten Larvenstadium dereguliert sind (Anhang, Tab. 12). Stark hochreguliert war in *vap²* wieder das Gen *Amy-d* (9.7-fach), welches bereits in den adulten Köpfen

signifikant überexprimiert war. Das Gen CG3626, das für eine Pyruvatdehydrogenasephosphatase kodiert, war -3.3-fach reprimiert, während es in den Adulten 4.7-fach überexprimiert war. Zusätzlich waren in den Larven zwei weitere Gene des Glucosemetabolismus reprimiert: *LvpL*, das für eine alpha-glucosidase kodiert, -7.4-fach, und *ImpL3*, das für eine L-Lactatdehydrogenase kodiert, die eine Funktion in der Glykolyse übernimmt, -2.3-fach. Überexprimiert in Larven und in Köpfen war CG7000, das für einen möglichen Transmembranrezeptor kodiert. *zen2*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, war in den Larven 2.2-fach hochreguliert, in den adulten Köpfen -2.6-fach reprimiert. Jeweils in den Larven und in den Köpfen reprimiert waren die Gene *alpha-Est2*, das für eine Esterase kodiert, CG11124, das für eine mögliche Phospholipase A2 kodiert, und CG17527 und CG17531, die beide für mögliche Glutathiontransferasen kodieren. In den Larven reprimiert und in den Adulten überexprimiert waren die Gene *jdp*, das für ein Chaperon kodiert, und *Gycbeta100B*, das für eine Guanylatcyclase kodiert.

4.5.3.2 Differentiell regulierte Gene in Larven die RasGAP überexprimieren

In den Larven, in denen die wildtypische RasGAP cDNA in Neuronen überexprimiert wurde, waren im Vergleich zum Wildtyp ca. 360 Gene überexprimiert, und ca. 1100 Gene reprimiert, die wieder in funktionelle Gruppen eingeteilt wurden (Anhang, Tab. 11). Dabei befanden sich unter den hochregulierten Genen, sowohl *RasGAP* (5.5-fach) und auch *white* (69.9-fach) als interne Kontrolle das die Überexpression tatsächlich stattgefunden hat. Es wurden wieder Gene identifiziert, deren Genprodukte unter anderem den Kategorien Detoxifikation, Ubiquitinsystem, Kalziumhomöostase und Chaperone zugeordnet werden konnten. In den adulten Köpfen waren wie bereits beschrieben einige Gene überexprimiert, die unter anderem an der synaptischen Architektur bzw. deren Differenzierung beteiligt sind. Im Falle der Überexpression waren drei Gene hochreguliert, deren Genprodukte an der Sekretion von Neurotransmittern beteiligt sind, *Frq* (2.9-fach), *Ace* (2.6-fach) und *lap* (2.4-fach), während *mAcR-60C*, das für einen Acetylcholinrezeptor kodiert, -2.2-fach reprimiert war. Auffällig ist außerdem, dass eine Großzahl von Genen differentiell reguliert war, deren Genprodukte Komponenten bzw. mögliche Komponenten des Zytoskeletts sind. Dabei waren alle Gene reprimiert, bis auf zwei mögliche aktinbindende Proteine, CG9322 (3.0-fach) und *jbug* (2.2-fach). Unter diesen Genen finden sich einige, die signifikant reprimiert waren, wie z.B. *betaTub85D* (-18.6-fach) oder *Arp53D* (-10.5-fach), die beide für strukturelle Komponenten

des Zytoskeletts kodieren. Einige Gene waren reprimiert, die für Motorproteine kodieren, die am Transport entlang von Mikrotubuli beteiligt sind, z.B. *Dhc98D* (-5.2-fach) oder *Dhc64C* (-3.2-fach). Auch waren wieder Gene des Glucosemetabolismus dereguliert, darunter wieder *Amy-d* (5.5-fach) und *LvpL* (-7.7-fach). Außerdem waren vier Gene dereguliert, die im Zusammenhang mit der axonalen Wegfindung diskutiert werden. *Sema-1b*, das 2.6-fach und *not* das 2.2-fach überexprimiert ist, und *beat-1a* und *beat-1b*, die jeweils -2.3 fach reprimiert waren. Überexprimierte Gene, für die genetische Interaktionen mit Ras1 beschrieben sind, waren die bereits erwähnten Gene *drk* (2.0-fach) bzw. *rho* (3.1-fach), und *stumps* (2.3-fach), das am FGF-Rezeptor Signalweg beteiligt ist (Imam *et al.*, 1999).

4.5.3.3 Reziprok regulierte Gene

Gene die, wenn die Funktion von RasGAP fehlt, wie im Falle der *vap²* Larven, in eine andere Richtung reguliert werden, als wenn RasGAP überexprimiert wird, könnten möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der Funktion von RasGAP bzw. Ras1 stehen. Deshalb wurde überprüft, welche Gene in den *vap²* Larven im Vergleich zu den Larven, in denen RasGAP überexprimiert wurde, reziprok reguliert wurden (Anhang, Tab 13). Bei der Auswahl der Gene, wurden wieder nur die berücksichtigt, deren Expressionslevel mindestens 2.0-fach dereguliert war. Unter anderem war das Gen *MESR1* (*Misexpression suppressor of Ras1*), das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, reziprok reguliert. In *vap²* Larven war dieses Gen -6.0-fach reprimiert, und in den *elav-GAL4/UAS-RasGAP* Larven 2.2-fach überexprimiert. *MESR1* wurde bereits in einem ‘gain-of-function’ Screen identifiziert, in dem nach Genen gesucht wurde, die mit dem Ras1 Signalweg interagieren. Dabei supprimierte die Überexpression dieses Gens den rauen Augenphänotyp der Fliegen, in denen Ras1 überexprimiert wurde (Huang und Rubin, 2000). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die so ausgewählten Gene tatsächlich Kandidaten für mögliche Interaktionspartner sind.

4.5.4. Verifizierung der Microarray Daten ausgewählter Gene

Aus den in den adulten Köpfen differentiell exprimierten Genen wurden verschiedene Gene ausgewählt, und die Expressionslevel die die Microarray Analyse ergeben hatte, mit Northern Blots überprüft. Diese Gene wurden aufgrund ihrer möglichen Bedeutung für

neurodegenerative Prozesse, die in späteren Kapiteln noch diskutiert werden, ausgewählt. Darunter war das am stärksten überexprimierte Gen *Amy-d*, und das am stärksten reprimierte Gen *takeout*. Von besonderem Interesse waren auch die Gene, deren Genprodukte in die Kategorie synaptische Gene eingeteilt wurden. Von diesen wurde *Appl*, *Gad1*, *Syn*, *Fas1*, *Fas3*, *Syt* und *SytIV* überprüft. Die Expressionslevel der beiden am stärksten überexprimierten Proteinphosphatasen CG11533 und *trc* wurde überprüft, und das des Gens *cno*, für das eine genetische Interaktion mit Ras1 beschrieben ist (Matsuo *et al.*, 1997). Außerdem wurden die Gene *Uch*, *Rpd3*, *Cbp53E* und *l(2)gl* gewählt. Die Expressionslevel von *Appl*, *syn* und *Rpd3* in Larven waren in den Microarraydaten zwar nicht als dereguliert klassifiziert, wurden aber aufgrund ihrer Bedeutung dennoch überprüft.

Zur Verifizierung der Chipdaten wurden Northern Blots angefertigt. Dafür wurde mRNA aus Köpfen von *w¹¹¹⁸*, *vap¹* und *vap²* Fliegen isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, kapillar geblottet und mit den entsprechenden ³²P-markierten Sonden hybridisiert. Für die Detektion der jeweiligen Transkripte wurden cDNA Sonden mittels RT-PCR amplifiziert. Dabei wurden die PCR-Primer so gewählt, dass sie alle bekannten Transkripte eines Genes detektieren. Das Transkript des *rp49* Gens (O' Connell und Rosbash, 1984) wurde als Ladekontrolle verwendet, nachdem in den Microarray Daten überprüft wurde, dass dessen Expression in der *vap* Mutante im Vergleich zur Wildtypkontrolle nicht verändert ist. Für die Auswertung wurde die Signalintensität ermittelt (Material und Methoden, 3.2.1.) und anschließend mit Hilfe der *rp49* Ladekontrolle normalisiert, um mögliche Ladungsunterschiede auszugleichen. Abb.23 zeigt stellvertretend für alle getesteten Gene (Tab. 9), die Northern Blots der Transkripte von *cbp53E* und *Syn*.

Für alle getesteten Gene, konnten die Daten die die Microarrayanalyse liefert hatte, bestätigt werden. Es zeigte sich dabei, dass mit den Northern Blots nicht nur die Gene deren Transkripte stark hochreguliert bzw. reprimiert waren, verifiziert werden konnten, sondern es konnten auch geringere Unterschiede der Expressionslevel bestätigt werden. So war das Gen *Fas1* auf dem Microarray nur 2.1-fach hochreguliert, die Auswertung des Northern Blots ergab jedoch eine 3.4-fache Überexpression. Damit wurde auch bestätigt, dass es Sinn macht in die Auswertung der Chipdaten auch solche Gene einzuschließen, die nur als 2.0-fach dereguliert eingeteilt waren.

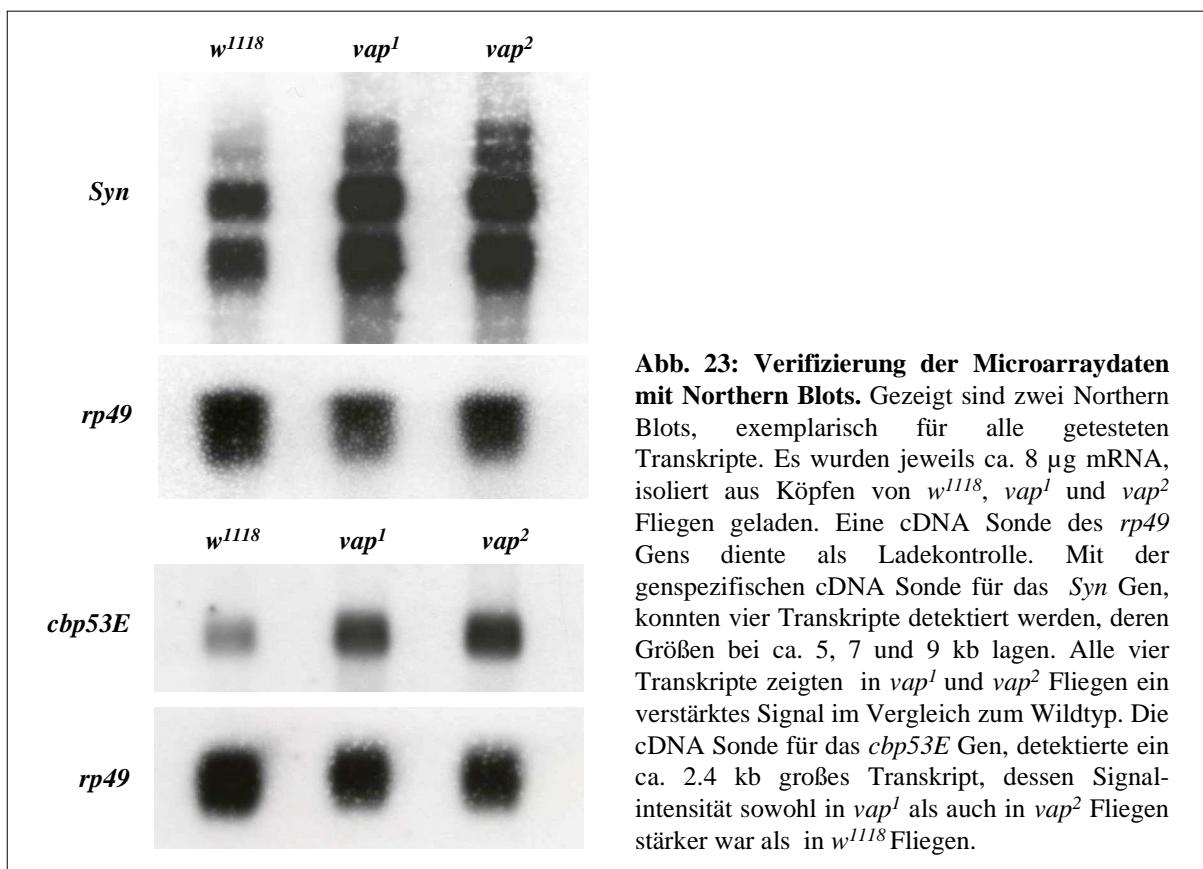


Abb. 23: Verifizierung der Microarraydaten mit Northern Blots. Gezeigt sind zwei Northern Blots, exemplarisch für alle getesteten Transkripte. Es wurden jeweils ca. 8 µg mRNA, isoliert aus Köpfen von *w¹¹¹⁸*, *vap¹* und *vap²* Fliegen geladen. Eine cDNA Sonde des *rp49* Gens diente als Ladekontrolle. Mit der genspezifischen cDNA Sonde für das *Syn* Gen, konnten vier Transkripte detektiert werden, deren Größen bei ca. 5, 7 und 9 kb lagen. Alle vier Transkripte zeigten in *vap¹* und *vap²* Fliegen ein verstärktes Signal im Vergleich zum Wildtyp. Die cDNA Sonde für das *cbp53E* Gen, detektierte ein ca. 2.4 kb großes Transkript, dessen Signalintensität sowohl in *vap¹* als auch in *vap²* Fliegen stärker war als in *w¹¹¹⁸* Fliegen.

Tabelle 9: Verifizierung der Microarraydaten. Die durch Northern Blot Analyse ermittelte veränderte Genexpression für die jeweiligen Transkripten verglichen mit den Ergebnissen aus der Microarrayanalyse

Gen	Northern Blot (mean ± SEM)		Microarray (mean ± SEM)
<u>A. Adulte Köpfe:</u>			
Amy-d		7.9 ± 1.4	9.7 ± 1.9
Gad1		4.8 ± 0.3	7.9 ± 1.9
Syn	1.	7.4 ± 0.7	7.6 ± 1.6
	2.	6.3 ± 1.8	-
	3.	6.1 ± 0.4	-
	4.	4.8 ± 0.4	-
Appl		7.7 ± 2.0	6.2 ± 0.9
trc		4.3 ± 2.6	5.8 ± 0.7
CG11533	1.	6.2 ± 0.0	5.1 ± 0.7
	2.	7.8 ± 0.9	-
syt	1.	3.3 ± 0.1	4.5 ± 1.1
	2.	5.2 ± 0.0	-
Uch ⁺		4.0 ± 0.2	4.5 ± 0.1
cno ⁺		7.2 ± 3.9	4.1 ± 0.3
Rpd3		2.0 ± 0.0	3.5 ± 1.1
Fas3 [*]		3.2 ± 0.9	3.7 ± 0.0
SytIV [*]		2.3 ± 0.9	3.2 ± 0.1
Cbp53E		5.1 ± 0.0	2.5 ± 0.1

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 9: Fortsetzung

Gen	Northern Blot (mean \pm SEM)	Microarray (mean \pm SEM)
Fas1*	2.1 ± 0.6	2.1 ± 0.1
to	-4.4 ± 0.7	-19.1 ± 1.3
l(2)gl ⁺	-2.1 ± 0.9	-2.4 ± 0.5
B. Drittes Larvenstadium:		
Amy-d	6.9 ± 2.4	5.7
Appl	-1.5 ± 0.1	-
Syn	-1.3 ± 0.0	-
Rpd3	-0.1 ± 1.1	-

Für jedes Gen wurde mittels Northern Blot die veränderte Expression des jeweiligen Transkripts ermittelt, wobei der Mittelwert (Mean) und der ‘Standard error of the mean’ (SEM) aus den Ergebnissen für die beiden Allele errechnet wurde. Diese Werte werden den Ergebnissen aus der Microarrayanalyse gegenübergestellt. Positive Werte stehen für eine erhöhte Expression, negative Werte für eine verminderte Expression. Für das Gen *Syn* wurden vier Transkripte (1.-4.), für die Gene CG11533 und *syt* wurden jeweils 2 Transkripte detektiert und ausgewertet. * erarbeitet in der Diplomarbeit von M. Mügchel; 2003, + erarbeitet in der Diplomarbeit von A. Giesecke; 2002.

4.5.5. Identifizierung neuer genetischer Interaktionen

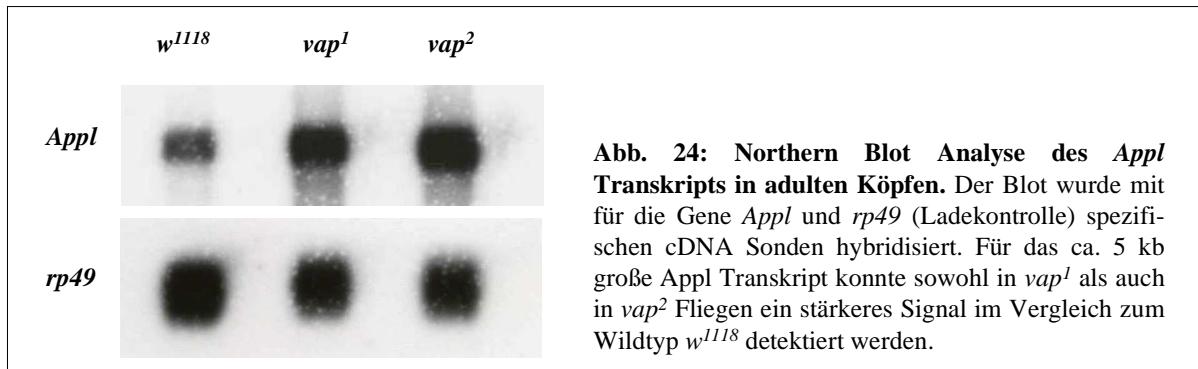
Ein weiteres Ziel der Microarray Analyse war es, neue genetische Interaktionen von *RasGAP* zu finden. Wie im Kapitel 4.3.3. beschrieben, konnten Interaktionen mit Komponenten des EGFR/Ras Signaltransduktionsweges, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, nachgewiesen werden. Das Interesse bestand nun darin, neue Gene zu identifizieren, die genetisch mit *RasGAP* interagieren, und die am Prozess der Neurodegeneration beteiligt sind. Microarrays ermöglichen es hierbei Gene zu untersuchen, deren Bedeutung man in diesem Zusammenhang nicht vorausgeahnt hätte.

4.5.5.1. Analyse der Interaktion von *vap* mit dem *β-amyloid precursor protein-like* Gen

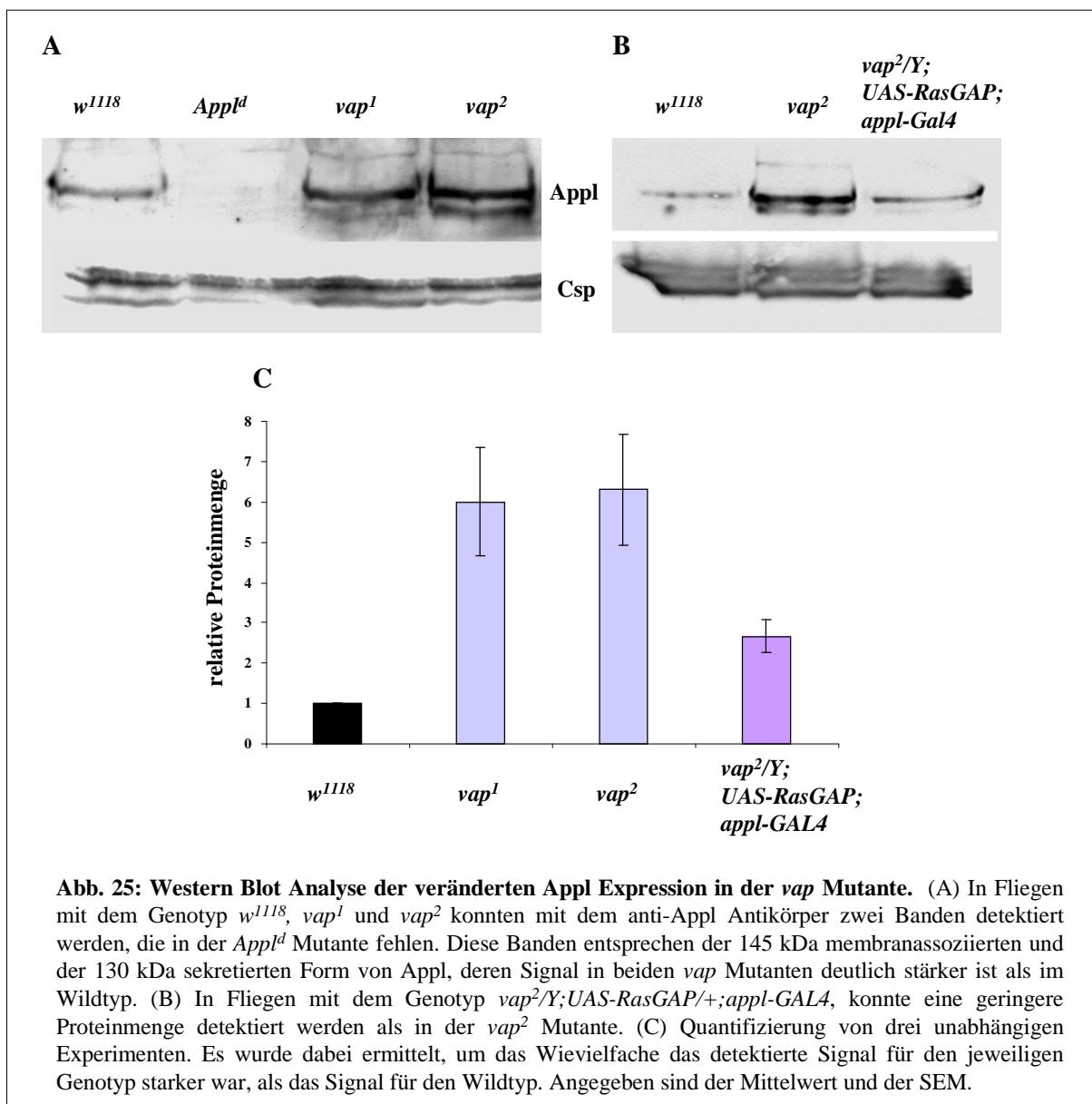
4.5.5.1.1. Analyse der veränderten Expression von *Appl* in der *vap* Mutante

Von besonderem Interesse für weitere Analysen war das *Drosophila* β-Amyloid Precursor Protein (APP) Homolog *Appl* (Rosen *et al.*, 1989). Aufgrund seiner Bedeutung für die Alzheimer Erkrankung, wurde der Einfluss von APP auf die Entwicklung und Funktion von Neuronen intensiv untersucht (Review: Mattson, 1997; Small, 1998). Die Microarray-

Analyse hat gezeigt, das *Appl* in den adulten Köpfen der *vap* Mutante im Vergleich zum Wildtyp überexprimiert wird, jedoch nicht im dritten Larvenstadium. Diese Daten konnten auch durch das Anfertigen von Northern Blots bestätigt werden (Tabelle 9 und Abb. 24).



Nachdem gezeigt wurde, dass das *Appl* Transkript tatsächlich vermehrt in den adulten Köpfen vorhanden ist, sollte überprüft werden, ob dieser Effekt auch auf der Ebene der Translation zu beobachten ist. Dafür wurden Proteinextrakte aus Köpfen von *w¹¹¹⁸*, *vap¹* und *vap²* Fliegen, und aus der *Appl^d* Mutante, die eine Deletion im *Appl* Gen aufweist (Torroja *et al.*, 1996) isoliert. Gleiche Mengen der Kopfextrakte wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen, elektrophoretisch getrennt, und kapillar geblottet. Zur Detektion des *Appl* Proteins wurde der polyklonale anti-APPL Antikörper Ab925 (Torroja *et al.*, 1996) verwendet. Als Ladekontrolle wurde das Csp (cystein string protein) Protein mit dem Antikörper ab49 detektiert. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt, um dessen Reproduzierbarkeit sicherzustellen. In *w¹¹¹⁸* Fliegen konnten zwei Banden detektiert werden, die in der *Appl^d* Mutante fehlen (Abb. 25 A). Diese zwei Banden entsprechen der 145 kDa großen membranassoziierten und der 130 kDa großen sezernierten Form von *Appl* (Luo *et al.*, 1990). In dem *vap¹* und *vap²* Allel konnte von beiden Formen jeweils eine erhöhte Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden.

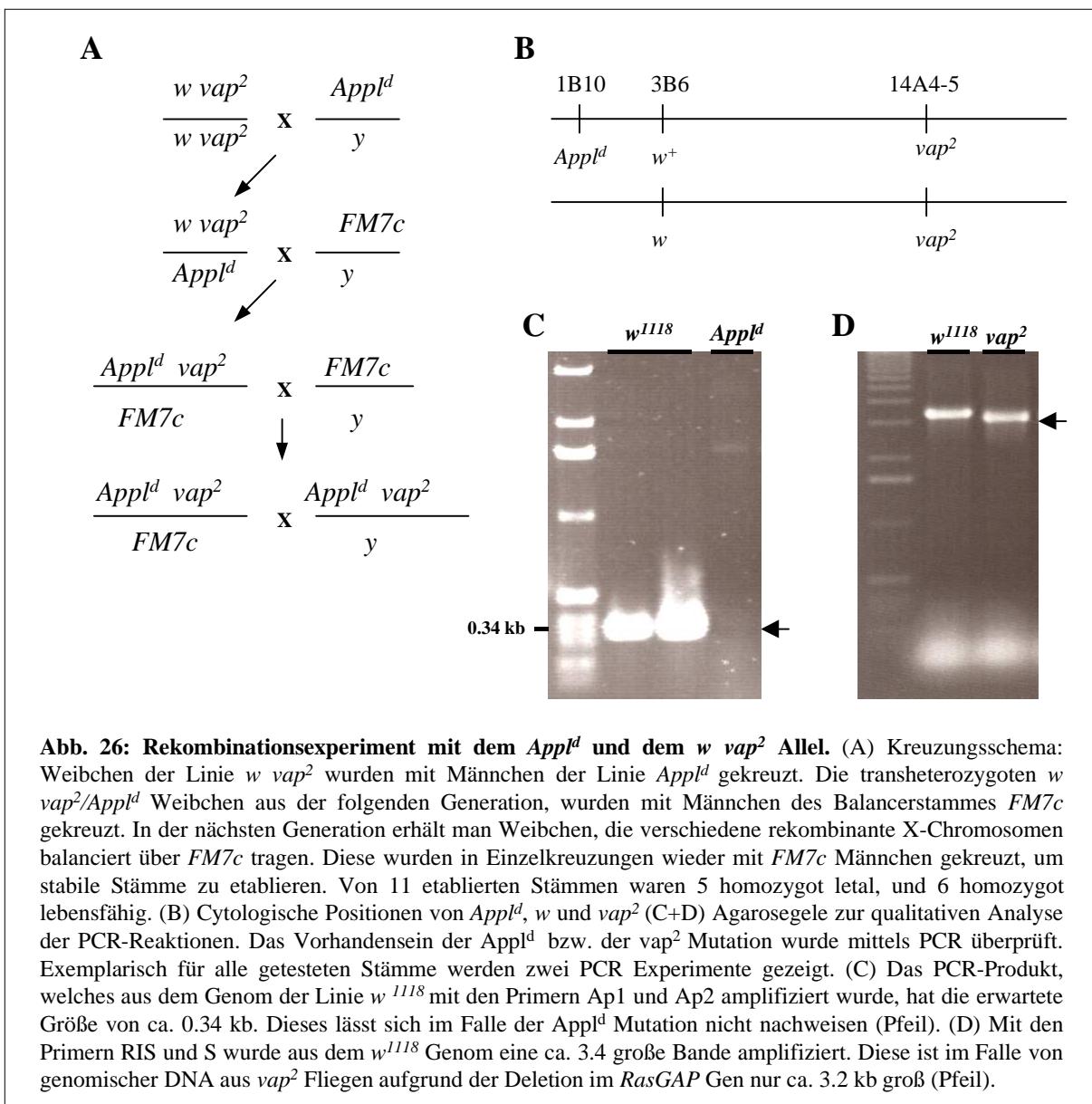


Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die Überexpression von Appl, tatsächlich auf den Funktionsverlust von RasGAP zurückzuführen ist. Dafür wurde die wildtypische cDNA *UAS-RasGAP* in *vap²* Fliegen mit dem neuronalen Treiber *appl-GAL4* überexprimiert. Mit Kopfextrakten dieser Fliegen wurden wieder Western Blots in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Tatsächlich war in den *vap²* Fliegen, in denen die Funktion von RasGAP in Neuronen wiederhergestellt wurde, die Proteinmenge im Vergleich zu *vap²* Fliegen deutlich vermindert, wenn auch die Proteinmenge nicht ganz auf das wildtypische Niveau reduziert werden konnte (Abb. 25B). Es wurde damit ein ursächlicher

Zusammenhang zwischen der Mutation in RasGAP und der gesteigerten Proteinmengen von *Appl* in *vap²* Fliegen hergestellt.

4.5.5.1.2. Analyse der genetischen Interaktion zwischen *vap* und *Appl*

Ob auch ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von *Appl* und dem neuronalen Zelltod in der *vap* Mutante besteht, wurde im Folgenden untersucht. Dazu sollte getestet werden, ob über die Reduktion der Gendosis von *Appl* in *vap²* Fliegen, der Neurodegenerationsphänotyp modifiziert werden kann. Nachdem *Appl* ebenso wie *vap* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, musste erst eine Rekombination durchgeführt werden, um die *Appl^d* Nullmutation und die *RasGAP* Mutation auf einem X-Chromosom zu kombinieren (Abb. 26A). Es wurden Weibchen erzeugt, die heterozygot für das *w vap²* Chromosom, und das die *Appl^d* Mutation tragende Chromosom waren. Die weißäugige Linie *w vap²* wurde deshalb in diesem Experiment verwendet, da die fehlende Pigmentierung bei der Selektion der rekombinanten Chromosomen hilft, nachdem sich auch das *white* Gen (cytologische Position: 3B6) auf dem X-Chromosom zwischen *Appl* (1B10) und *vap* (14A5-6) befindet (Abb. 26B). Alle rotäugigen Tiere sollten nach der Rekombination mit großer Wahrscheinlichkeit mindestens die *Appl^d* Mutation besitzen. Die transheterozygoten Weibchen, in denen während der Meiose die Rekombination stattfindet, wurden mit Männchen des Balancerstammes *FM7c* gekreuzt. Mit den rotäugigen Weibchen aus der folgenden Generation, die verschiedene rekombinante X-Chromosomen balanciert über *FM7c* tragen, wurden Einzelkreuzungen mit *FM7c* Männchen angesetzt, um stabile Stämme zu etablieren. Von den 11 etablierten Stämmen waren 5 homozygot letal und 6 homozygot lebensfähig. Das Vorhandensein der *Appl^d* bzw. der *vap²* Mutation in den jeweiligen Stämmen wurde mittels ‘single-fly’ PCR getestet (Abb. 26C und D). Dabei wurden Primer verwendet, die im Falle der *vap²* Mutation ein verkürztes PCR-Produkt (Primerpaar RIS und S) und im Falle der *Appl^d* Mutation kein PCR Produkt ergaben (Primerpaar Ap1 und Ap2). Bei den letalen Stämmen, wurden die beiden wildtypischen Allele von *Appl* bzw. *vap* des Balancerchromosoms, durch Einkreuzen des *Appl^d* bzw. *vap²* Chromosoms ersetzt. Die PCR wurde dann mit genomischer DNA der transheterozygoten Weibchen aus der F₁-Generation durchgeführt. Es zeigte sich, dass in allen homozygot lebensfähigen Stämmen nur die *Appl^d* Mutation, und in allen homozygot letalen Stämmen beide Mutationen vorhanden waren. Was vermuten lässt, dass die Kombination der beiden Mutationen für die Tiere letal ist.



Um nun den möglichen Einfluß von App^{ld} auf den Neurodegenerationsphänotyp zu untersuchen, wurden Weibchen mit dem Genotyp $App^{ld}\,vap^2/vap^2$ 18 Tage lang gealtert, und die Ausprägung der Vakuolisierung in Paraffinschnitten überprüft (Abb. 24D und E). In diesen Tieren konnte der Neurodegenerationsphänotyp tatsächlich supprimiert werden. Als Kontrolle dienten in diesem Fall Weibchen mit dem Genotyp $w\,vap^2/vap^2$, deren Phänotyp schwächer ausgeprägt ist als der von vap^2 Weibchen, da sich der ursprüngliche Phänotyp der Linie $w\,vap^2$ im Laufe der Zeit stark abgeschwächt hat. Dies ist möglicherweise auf die Akkumulation von Mutationen im Genom dieser Fliegen zurückzuführen, die den ursprünglichen Phänotyp modifizieren.

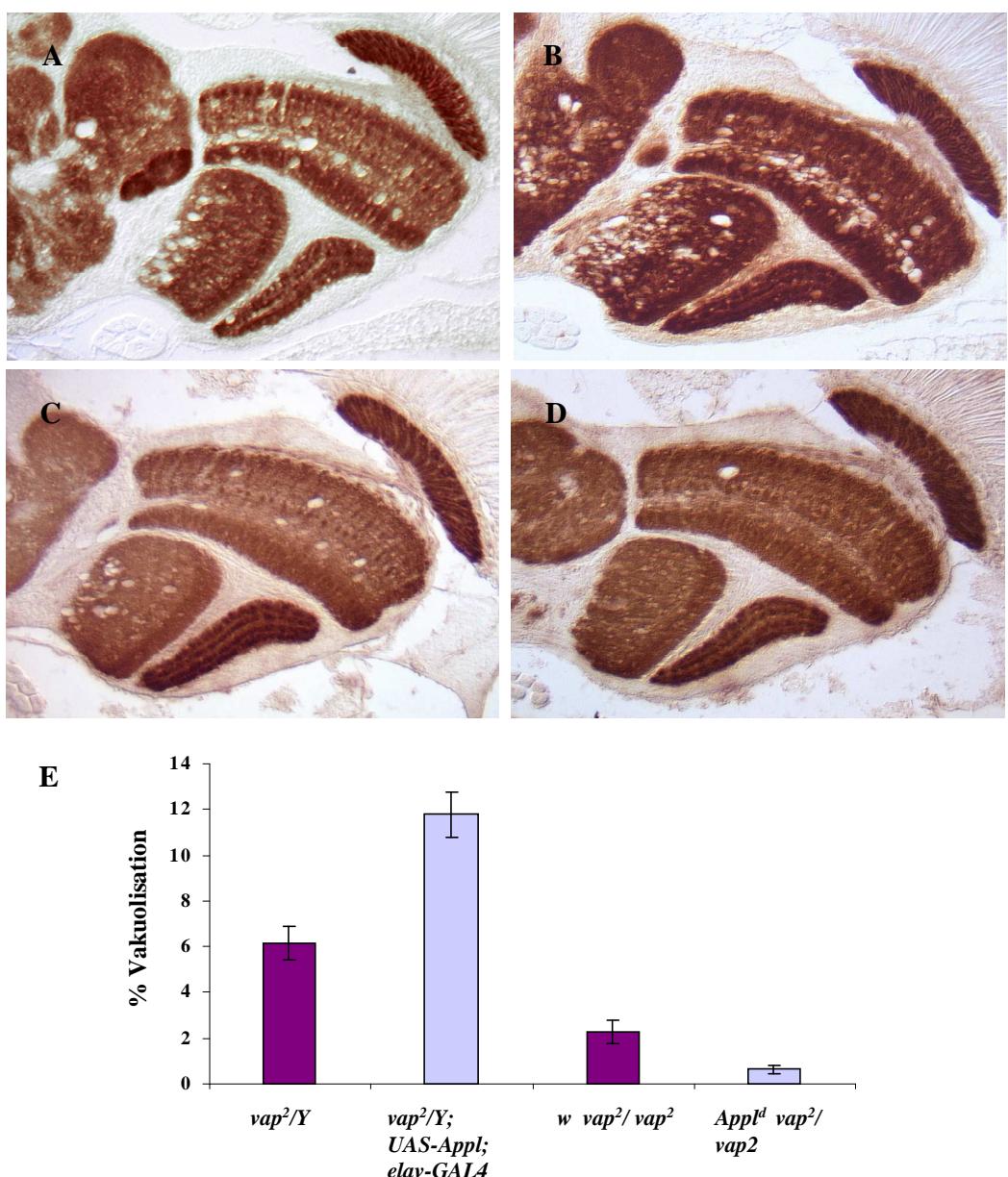


Abb. 27: Analyse der genetischen Interaktion zwischen *vap²* und *Appl*. Durch die Überexpression der wildtypischen *Appl* cDNA (B und E) konnte der *vap²* Phänotyp (A und E) verstärkt werden, durch die Reduktion der Gendosis von *Appl* im *vap²* Hintergrund konnte der Grad der Vakuolisierung vermindert werden (D und E). Genotypen: (A) *vap²/Y* (B) *vap²/Y; UAS-Appl/+; elav-GAL4/+*; (C) *w vap²/vap²* und (D) *Appl^d vap²/vap²*. (E) Quantifizierung der Vakuolisierung in den optischen Loben.

Nachdem das Entfernen einer Kopie des *Appl* Gens die Vakuolisierung in der *vap* Mutante supprimiert, könnte man erwarten, dass die Überexpression von *Appl* den Phänotyp verstärkt. Die Überexpression der wildtypischen cDNA *UAS-Appl⁺* (Luo *et al.*, 1992) mit dem neuronalen Treiber *elav-GAL4* in *vap²* Männchen, verstärkte tatsächlich den Neurodegenerationsphänotyp (Abb. 27B und E). Mit diesen Ergebnissen konnte auch eine

genetische Interaktion zwischen *RasGAP* und *Appl* nachgewiesen werden, die von Relevanz für den neuronalen Zelltod ist.

4.5.5.2 Analyse der Interaktion von *vap* mit dem *Glutamic acid decarboxylase 1 Gen*

Ein weiteres Gen, das in der *RasGAP* Mutante signifikant überexprimiert wird, ist *Gad1* (*Glutamic acid decarboxylase1*), dessen Transkript vermehrt in den adulten Köpfen vorhanden ist, wurde ebenfalls durch einen Northern Blot bestätigt (Tab. 9 und Abb. 28).

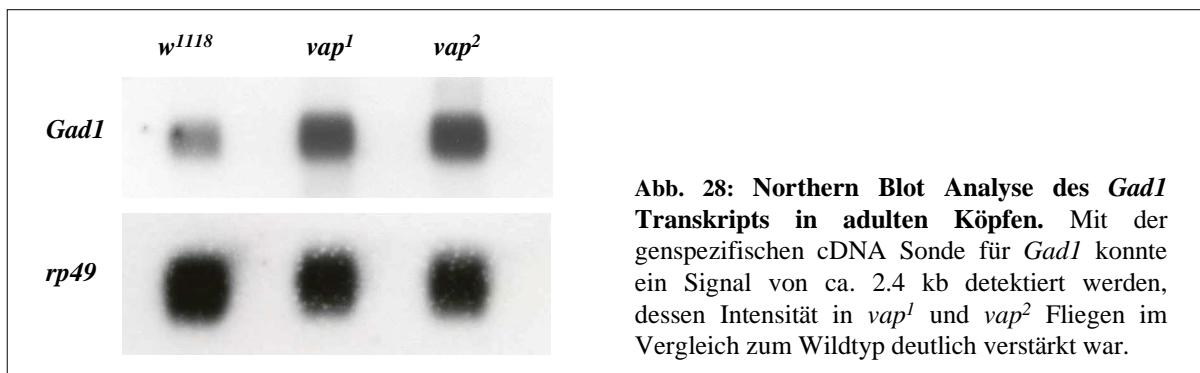
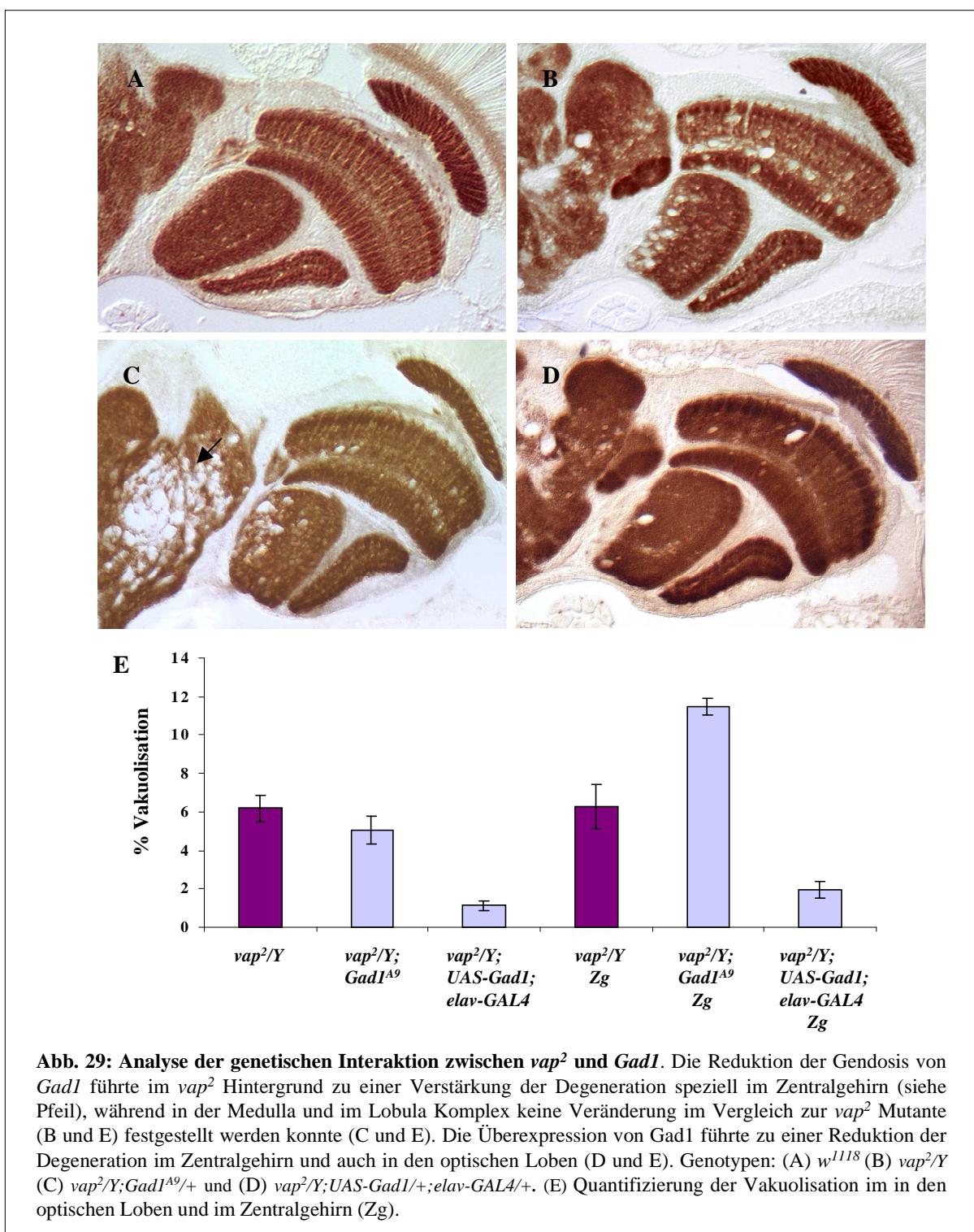


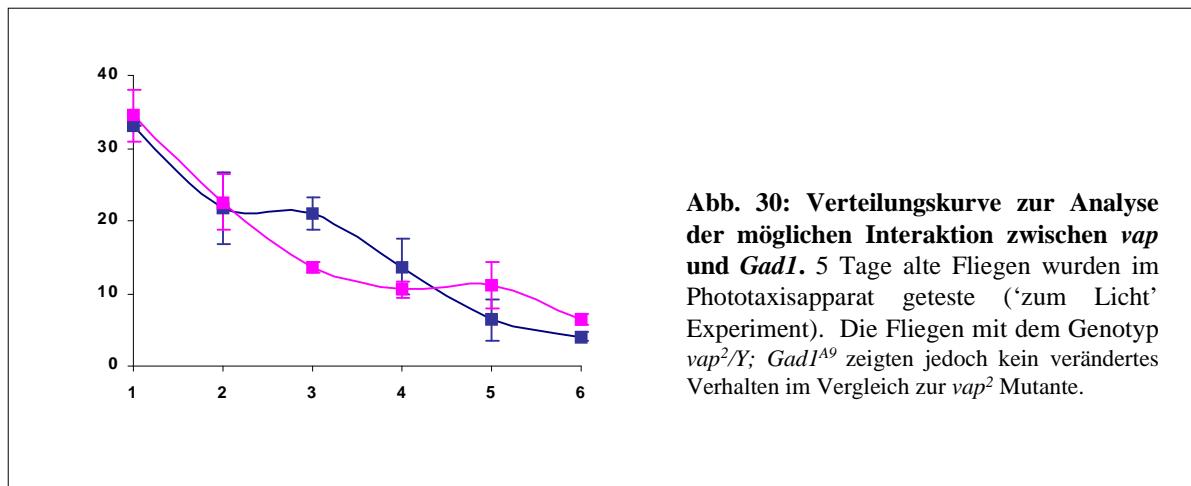
Abb. 28: Northern Blot Analyse des *Gad1* Transkripts in adulten Köpfen. Mit der genspezifischen cDNA Sonde für *Gad1* konnte ein Signal von ca. 2.4 kb detektiert werden, dessen Intensität in *vap¹* und *vap²* Fliegen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verstärkt war.

Auch hier konnte eine genetische Interaktion zwischen *RasGAP* und *Dgad1* gezeigt werden. Dafür wurde das mutante Allel *Gad1^{A9}* heterozygot in *vap²* Männchen eingekreuzt, und die Fliegen 18 Tage gealtert. In Abb. 29C ist dargestellt, dass in diesen Fliegen die Vakuolisierung speziell im Zentralgehirn verstärkt war, während sich deren Ausprägung in den optischen Loben nicht signifikant veränderte. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls in der Quantifizierung deutlich (Abb. 29E). Wurde jedoch die wildtypische cDNA *UAS-GAD1* mit dem *elav-GAL4* Element in Neuronen überexprimiert, kam es zu einer Suppression des Phänotyps sowohl im Zentralgehirn, als auch in den optischen Loben (Abb. 29D). Dass die *Gad1^{A9}* Mutation nur im Zentralgehirn zu einer Verstärkung führt, könnte auf eine unterschiedliche Expression von *Gad1* in den Neuropilen zurückzuführen sein. Dieser Effekt könnte im Falle der Überexpression maskiert worden sein, nachdem *elav-GAL4* eine pan-neuronale Expression, d.h. auch in allen Neuronen des Gehirns, verursachen sollte. Somit ist auch die veränderte Expression von *Gad1* für die Ausprägung der Neurodegeneration in der *vap* Mutante von Bedeutung.



Der mögliche Einfluss, den die Überexpression von *Gad1* in den *vap* Fliegen auf die Ausprägung des Verhaltensphänotyps haben könnte, wurde ebenfalls überprüft. 5 Tage alte Fliegen des Genotyps *vap*²/*Y*; *Gad1*^{A9}/+ wurden, wie im Kapitel 4.4.1. beschrieben, in der Phototaxisapparatur getestet. Wie der Verteilungskurve in Abb. 30 zu entnehmen ist, zeigten

diese Fliegen jedoch kein verändertes phototaktisches Verhalten im Vergleich zur *vap*² Mutante. Somit ist der Verhaltensphänotyp unabhängig von der veränderten Expression des *Gad1* Gens, und unterliegt offensichtlich einer anderen Regulation wie der Neurodegenerationsphänotyp.



4.5.5.3. Analyse der Interaktion von *vap* mit dem *Rpd3* Gen

4.5.5.3.1. Analyse der Interaktion von *vap* mit Repressoren der Transkription

Das Gen *Rpd3* ist ein *Drosophila* Homologes der Histondeacetylase (HDAC) RPD3 in Hefe (De Rubertis *et al.*, 1996). Die Acetylierung von Histonen ist ein Mechanismus, der die Genexpression aktiviert, die Deacetylierung reprimiert im Gegensatz dazu die Genexpression (Review: Waterborg, 2002). Die Microarrayanalyse hatte ergeben, dass das *Rpd3* Transkript in den adulten Köpfen überexprimiert wird, während dessen Regulation im dritten Larvern stadium nicht vom Wildtyp abweicht. Diese Ergebnisse wurden auch durch das Anfertigen von Northern Blots bestätigt (Tab. 9, und Abb. 31).

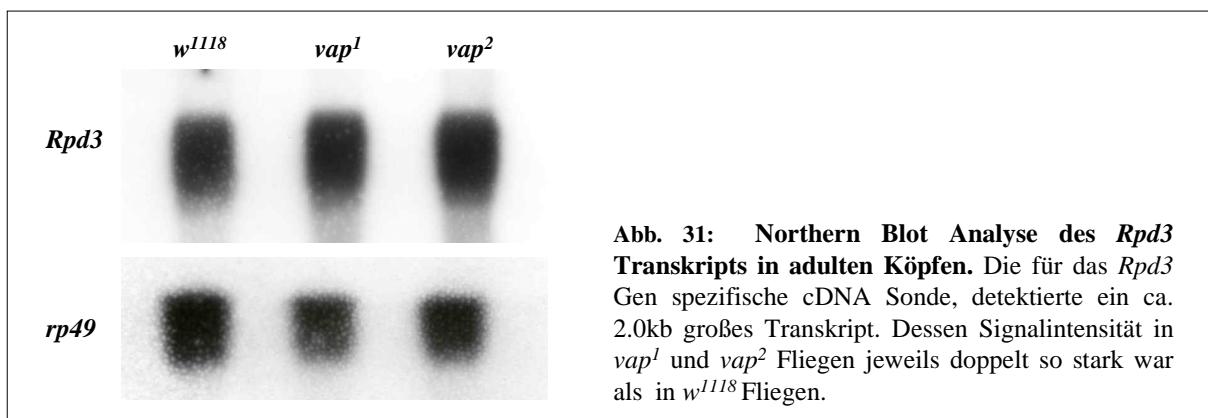
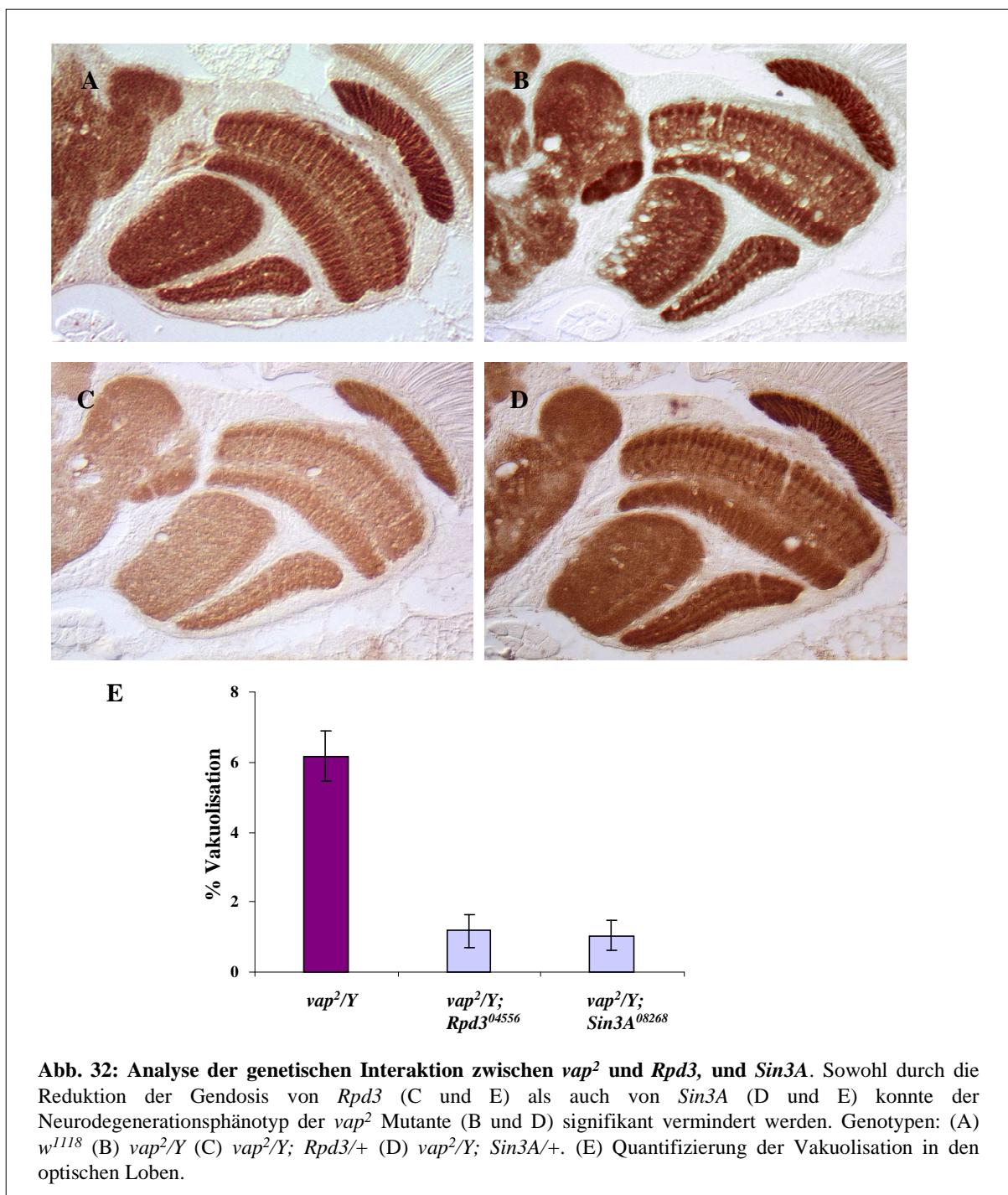


Abb. 31: Northern Blot Analyse des *Rpd3* Transkripts in adulten Köpfen. Die für das *Rpd3* Gen spezifische cDNA Sonde, detektierte ein ca. 2.0kb großes Transkript. Dessen Signalintensität in *vap¹* und *vap²* Fliegen jeweils doppelt so stark war als in *w¹¹¹⁸* Fliegen.

Anschließend wurde überprüft, ob die Überexpression von *Rpd3* von Bedeutung für den neuronalen Zelltod in der *vap* Mutante ist. Dafür wurde die P-Element induzierte ‘loss-of-function’ Mutation *Rpd3⁰⁴⁵⁵⁶* verwendet. Männchen des Genotyps *vap²/Y; Rpd3⁰⁴⁵⁵⁶/+* wurden wieder 18 Tage lang gealtert, und die Vakuolisierung im Gehirn dieser Tiere mit der von *vap²* Männchen verglichen (Abb. 32 C und E). Tatsächlich war im Gehirn dieser Tiere die Vakuolisierung im Vergleich zu *vap²* Tieren stark supprimiert.

Ein weiteres Gen, das in Hefe als ein Repressor der Transkription bekannt ist, ist SIN3. Man geht davon aus, dass SIN3 und RPD3 in einem Komplex auftreten, und durch die Modifikation der Acetylierung von Histonen, die Transkription reprimieren (Review: Kadosh und Struhl, 1998). Deshalb sollte überprüft werden, ob auch mit *Sin3A*, einem *Drosophila* Homologen von SIN3 (Pennetta und Pauli, 1998) der Degenerationsphänotyp modifiziert werden kann, obwohl dessen Expression in den Array Daten als nicht verändert angegeben war. Das partielle ‘loss-of-function’ Allel *Sin3A⁰⁸²⁶⁹*, wurde wieder in den *vap²* Hintergrund eingekreuzt, und die Vakuolisierung quantifiziert. Auch 18 Tage alte Fliegen des Genotyps *vap²/Y; Sin3A⁰⁸²⁶⁹/+* zeigten eine ebenso stark verminderte Vakuolisierung, wie sie mit dem *Rpd3⁰⁴⁵⁵⁶* Allel erreicht werden konnte (Abb. 32D und E). Beide Gene *Rpd3* und *Sin3A* vermögen folglich die Neurodegeneration der *vap* Mutante zu modifizieren, und sind somit für deren Ausprägung von wichtiger Bedeutung.

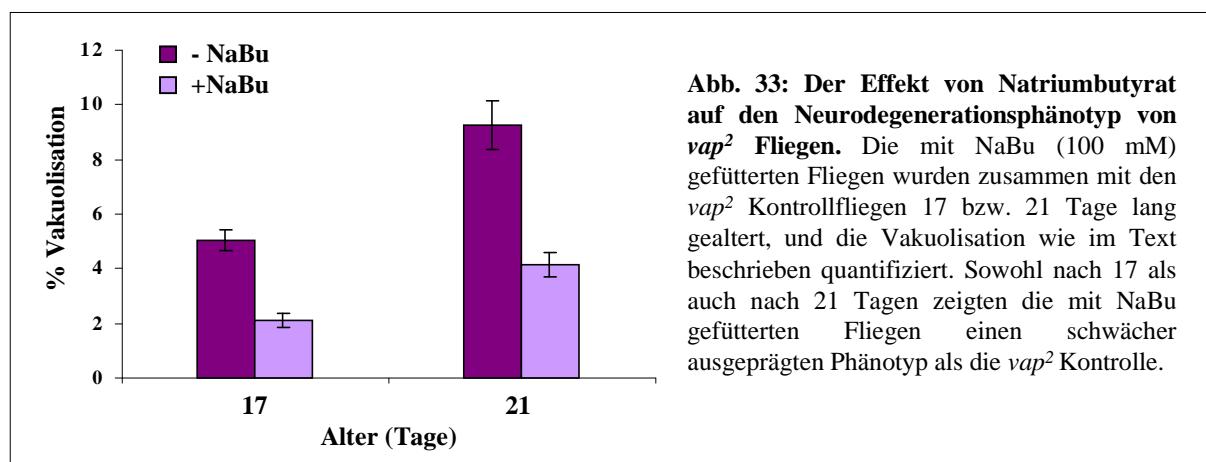


4.5.5.3.2. Die Wirkung des HDAC Inhibitors Natriumbutyrat auf den Neurodegenerationsphänotyp

Die Überexpression der Histondeacetylase (HDAC) *Rpd3* in der *vap* Mutante, und ihr Einfluss auf die Ausprägung der Degeneration, könnte darauf hinweisen, dass der Prozess der

Neurodegeneration in diesen Fliegen das Unterdrücken der Acetylierung von Histonen miteinschließt. Wenn dies zutrifft, würde man erwarten, dass eine Inhibierung der Deacetylierung dessen Ausprägung verbessert. Auf genetischer Ebene wurde die Deacetylierung durch die Reduktion der Aktivität der Gene *Sin3A* und *Rpd3* bereits inhibiert, was in der Tat zu einer Suppression der Vakuolisierung führte. Eine andere Möglichkeit die getestet wurde, ist die Verwendung des chemischen HDAC Inhibitors Natriumbutyrat (NaBu). Aufgrund seiner Eigenschaft HDACs zu inhibieren, wird angenommen, dass NaBu die Transkription von Genen beeinflussen kann, indem es die Acetylierung von Histonen und damit eine veränderte Chromatinstruktur induziert (Allonso *et al.*, 1987; Kruh, 1982).

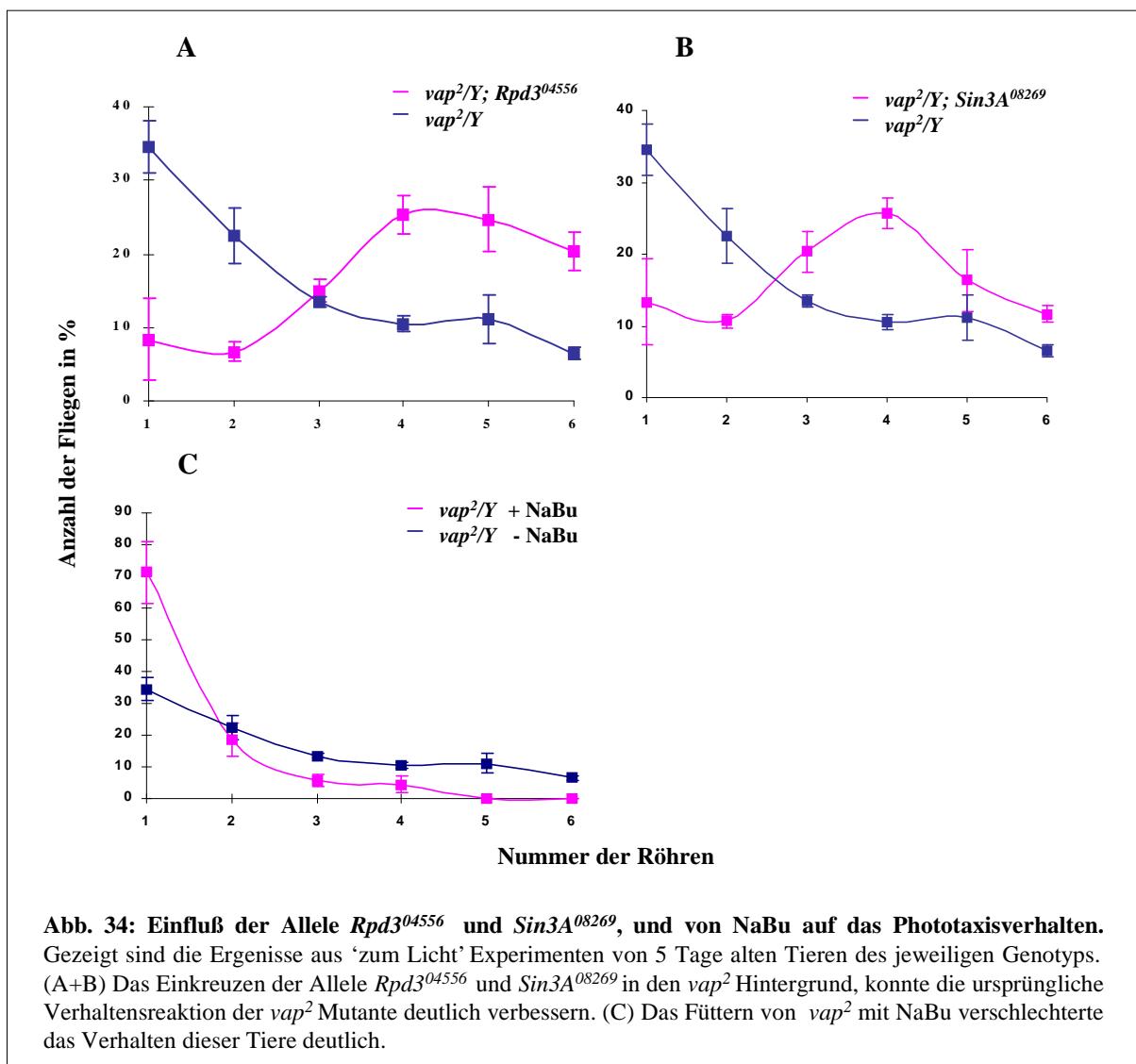
Um den möglichen Effekt von NaBu auf das Absterben der Neuronen in der *vap* Mutante zu testen, wurden frisch geschlüpfte *vap*² Fliegen mit einer Wasser-Hefe-Zucker-Lösung gefüttert, die NaBu in einer Konzentration von 100 mM enthielt. Nach 17 bzw. 21 Tagen wurden Paraffinschnitte dieser Fliegen, und der Kontrollfliegen die unter den gleichen Bedingungen gealtert wurden angefertigt. Der Grad der Vakuolisierung wurde wieder quantifiziert, wobei in diesem Experiment von jeweils 14 Fliegen die optischen Loben beider Hemisphären in zwei aufeinanderfolgenden Schnitten ausgewertet wurden. Der Abb. 31 ist zu entnehmen, dass die mit NaBu gefütterten Fliegen eine signifikant vermindernde Vakuolisierung aufwiesen. In den Fliegen, die 17 Tage lang mit NaBu gefüttert wurden, waren durchschnittlich 2 % der optischen Loben von der Vakuolisierung betroffen, während in den Kontrollfliegen im Durchschnitt 5 % des Gewebes betroffen war. Nach 21 Tagen war durchschnittlich 4 % des Gewebes in den mit NaBu gefütterten Tieren degeneriert, dem steht ein Wert von 9 % in den Kontrollfliegen gegenüber (Abb. 33).



Der Effekt war dabei jedoch nicht bei jedem Tier gleich, d.h. unter den mit NaBu gefütterten Tieren war der Phänotyp unterschiedlich stark bzw. schwach ausgeprägt. Der Grad der Vakuolisierung erreichte aber nie die hohen Werte, wie sie in den Kontrollfliegen festgestellt werden konnten. Dies Ergebnis weist darauf hin, dass NaBu die Ausprägung der *vap*² induzierten Neurodegeneration verlangsamt.

4.5.5.3.3. Einfluss der Acetylierung auf den Verhaltensphänotyp

Nachdem gezeigt wurde, dass die Wirkung von HDACs einen Einfluss auf den *vap* Neurodegenerationsphänotyp hat, wurde geprüft, ob auch die Ausprägung des Verhaltensphänotyps durch mutante Allele von *Rpd3* und *Sin3A* modifiziert werden kann. Das Verhalten der Tiere des Genotyps *vap*²/Y; *Rpd3*⁰⁴⁵⁵⁶/+ und *vap*²/Y; *Sin3A*⁰⁸²⁶⁹/+ wurde, wie im Kapitel 4.5.1. beschrieben, getestet. Die Verteilungskurve in Abb. 31A zeigt, dass auch die Phototaxisreaktion der *vap*² Fliegen, durch das Einkreuzen des *Rpd3*⁰⁴⁵⁵⁶ Allels, deutlich verbessert werden konnte. Weniger als 10% der Tiere sind durchschnittlich bis zum Ende des Versuches im ersten Röhrchen geblieben, dem stehen 34% im Falle der *vap* Mutante gegenüber. Die übrigen Tiere haben sich in einer Weise in der Apparatur verteilt, die der des Wildtyps (Abb. 18A) ähnlich ist. Ebenso wurde durch das Einkreuzen des *Sin3A*⁰⁸²⁶⁹ Allels in den *vap*² Hintergrund eine verbesserte Phototaxisreaktion erreicht (Abb. 34B). In diesem Fall blieben durchschnittlich nur 13 % der Tiere in der Startposition. Im Gegensatz zu dem im vorherigen Kapitel besprochenen Gen *Gad1*, konnten beide für die *vap* Mutante beschriebenen Phänotypen durch eine Verringerung der Gendosis von *Rpd3* und *SinA* supprimiert werden. Zusätzlich wurde die Wirkung von NaBu auf die Phototaxisreaktion der *vap*² Fliegen kontrolliert. Dafür wurden frisch geschlüpfte *vap*² Tiere 5 Tage lang mit 100 mM NaBu gefüttert, und anschließend das Verhalten getestet. Der Abb. 34C kann entnommen werden, dass diese Tiere jedoch eine stark verschlechterte Verhaltensreaktion zeigten. Durchschnittlich 71 % der Individuen haben dabei die Startposition nicht verlassen, und keines der Tiere hat eines der letzten beiden Röhrchen erreicht. Die Wirkung von NaBu führt vermutlich zur unspezifischen Aktivierung eines breiten Spektrums an Genen, die eine negative Wirkung auf die Ausprägung des Verhaltensphänotyps haben können.



5.Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen in dem *RasGAP* Gen progressive Neurodegeneration in *Drosophila* verursachen. Dieser Degenerationsprozess findet altersabhängig statt und umfasst neben den optischen Loben auch das Zentralgehirn. Die Degeneration innerhalb der optischen Loben ist möglicherweise auch ursächlich für das veränderte phototaktische Verhalten, welches die *RasGAP* Mutante zeigt. Im Zuge des degenerativen Prozesses reduziert sich auch die Lebenserwartung in den mutanten Fliegen drastisch.

Im ersten Teil der Diskussion sollen die möglichen Ursachen und Mechanismen diskutiert werden, die dem Prozess der Neurodegeneration in der *vap* Mutante zu Grunde liegen. Im zweiten Teil sollen mögliche, aus der Microarray-Analyse hervorgegangene neue Kandidaten, die am Prozess der Neurodegeneration beteiligt sein könnten, vorgestellt und hinsichtlich ihrer möglichen Funktionen diskutiert werden.

5.1. Mechanismen der Entstehung der Neurodegeneration in der *RasGAP* Mutante *vap*

5.1.1. Mutationen in *RasGAP* als Auslöser für den Neurodegenerationsphänotyp

Wie in Kapitel 4.2. beschrieben zeigen die Western Blot Analysen der verschiedenen *vap* Mutanten eine starke Reduktion der *RasGAP* Proteinmenge. Diese Reduktion des Proteins korreliert mit den Stärken der auftretenden Neurodegenerationsphänotypen. Während in *vap*³, welches den schwächsten Degenerationsphänotyp aufweist, wildtypisches Protein ca. auf die Hälfte reduziert wird, ist in *vap*¹, das Allel mit dem stärksten Phänotyp, kein Protein mehr nachweisbar. Diese Beobachtung legt nahe, dass das *RasGAP* Protein an der Entstehung von Neurodegeneration massgeblich beteiligt ist. Durch die Expression von wildtypischen *RasGAP* Protein ausschliesslich in den Neuronen der *vap*¹ und *vap*² Mutante, konnte der Neurodegenerationsdefekt vollständig komplementiert werden. Dies legt nahe, dass eine fehlende *RasGAP* Funktion für die Entstehung der Neurodegeneration ursächlich ist und das *RasGAP* einen notwendigen neuronalen Überlebensfaktor darstellt.

5.1.2. Autophagischer Zelltod als Mechanismus der Neurodegeneration

Ultrastrukturelle Analysen zeigten, dass die Ursache für die Degeneration im Gehirn der *vap* Mutante das Absterben von Neuronen ist. Gliazellen scheinen in der *vap* Mutante eine intakte Morphologie aufzuweisen und sind wohl nicht von dem Degenerationsprozess betroffen, wie durch zusätzliche Analysen mit verschiedenen Gliazellmarkern gezeigt werden konnte (D. Kretzschmar, persönliche Mitteilung). Die Neuronen weisen jedoch charakteristische Merkmale einer speziellen Form des Zelltodes auf, die als Autophagie bezeichnet wird. Morphologisch ist sie, durch das Vorhandensein von autophagischen Vakuolen und sogenannten Autophagosomen gekennzeichnet. Diese Membrankompartimente schließen Bestandteile des Zytoplasmas und Organelle ein und transportieren diese zu deren Abbau zu den Lysosomen (Dunn, 1994). Offensichtlich ist die Autophagie eine wichtige Komponente bei neuronalem Zelltod (Review: Pettmann und Henderson, 1998), und wurde in neurodegenerativen Erkrankungen wie Huntington (Kegel *et al.*, 2000) und Alzheimer (Review: Nixon *et al.*, 1996) beschrieben.

Am besten molekular untersucht ist die Autophagie bis jetzt in der Hefe, in der sie als Reaktion auf Nahrungsentzug aktiviert wird (Review: Ohsumi, 2001). Es wurde bislang vermutet, dass der autophagische (oder Typ II) Zelltod einen von dem apoptotischen (Typ I) Zelltod unabhängigen Mechanismus darstellt (Review: Clarke, 1990). Neuere Studien scheinen jedoch darauf hinzuweisen, dass die Autophagie gleichzeitig und von den gleichen Signalen wie die Apoptose aktiviert werden kann (Xue *et al.*, 1999). In der *vap* Mutante konnten keine apoptotischen Zellkerne durch TUNEL-Färbung nachgewiesen werden, und die pan-neuronale Expression des antiapoptotischen Proteins p35 konnte den Zelltod nicht vermindern (J. Botella, persönliche Mitteilung).

Auch in den Microarray Experimenten konnten keine Gene identifiziert werden, die als Indikatoren des apoptotischen Zelltodes angesehen werden könnten. Es waren z.B. keine Caspasen induziert, die auf die Aktivierung der Apoptose hinweisen würden. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass die Neuronen in der *vap* Mutante nicht aufgrund von Apoptose degenerieren. Es waren aber auch keine Gene differentiell reguliert, die als ein Anzeichen für den Autophagischen Zelltod gewertet werden könnten. Ein Ausschluss dieser Zelltodvariante kann man aber aus den Ergebnissen nicht ableiten, da mit Mikroarraystudien nur die

veränderte Genexpression detektiert werden kann. Signale in der Zelle werden aber auch über andere Mechanismen, wie posttranskriptionale Modifikation oder den kontrollierten Abbau von Genprodukten reguliert.

5.1.3. Rolle des EGFR/Ras Signaltransduktionsweges bei der Entstehung der Neurodegeneration

Hinweise für die Überaktivierung von Ras als Ursache für neuronalen Zelltod

In den neuronalen Zelllinien PC12 und H19-7 induziert aktiviertes Ras einen Wachstumsstop und leitet die Differenzierung dieser Zellen ein (Bar-Sagi und Feramisco, 1985; Noda *et al.*, 1985). Dieser Effekt scheint jedoch nicht auf alle Typen von Neuronen übertragbar zu sein. Die Expression von aktiviertem H-Ras in transgenen Mäusen induzierte Differenzierung nur in bestimmten Neuronen, während andere davon unberührt blieben (Sweetser *et al.*, 1997). In K-Ras knock out Mäusen wurde eine Zunahme von Apoptose in Motoneuronen beobachtet, was bedeuten könnte, dass Ras für das Überleben von Zellen benötigt wird (Korea *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigten Studien von Chi *et al.* (1999), dass die Expression von aktiviertem H-Ras in menschlichen Gliomazellen zur Degeneration dieser Krebszellen führt. Dabei waren die sterbenden Zellen durch die typischen Merkmale des autophagischen Zelltodes gekennzeichnet, die auch charakteristisch für die *vap* Mutante sind. Der durch onkogenes Ras induzierte Zelltod trat unabhängig von der Aktivierung von Caspisen auf, die essentiell für den apoptotischen Zelltod sind. Im Gegensatz dazu wird die Inaktivierung von RasGAP mit dem Auftreten von Apoptose in Verbindung gebracht. So tritt in p120RasGAP Knock out Mäusen extensiver neuronaler Zelltod auf, dem aber Apoptose zugrunde liegt (Henkemeyer *et al.*, 1995), und in Jurkatzen, in denen Apoptose induziert wurde, wurde der proteolytische Abbau von p120RasGAP beobachtet (Wen *et al.*, 1998). Offensichtlich sind die Effekte, die überaktiviertes Ras bzw. der Funktionsverlust von RasGAP auf Neuronen ausübt, vielfältig und von dem Kontext der betroffenen Zellen abhängig, d.h. möglicherweise von dem jeweiligen Zelltyp und dem Entwicklungszustand der Zellen.

*Genetische Interaktionen von Komponenten des EGFR/Ras Signalweges mit der *vap* Mutante*
Tatsächlich konnte der *vap*² Phänotyp durch die Überexpression bzw. durch mutante Allele von Komponenten des EGFR/Ras Signalweges modifiziert werden. Zusammenfassend kann man festhalten, dass in diesen Experimenten die Aktivierung des EGFR/Ras Signalweges,

jeweils zu einer Verstärkung der Neurodegeneration führte, während die teilweise Inhibierung dieses Signalweges jeweils eine Abschwächung des Phänotyps zur Folge hatte. Es konnte auch eine direkte Interaktion von RasGAP mit Ras1 gefunden werden, wobei die Überexpression von wildtypischem Ras1 in der *vap* Mutante zu einer Verstärkung der Vakuolisierung führte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass RasGAP als negativer Regulator von Ras1 fungiert. Der Funktionsverlust von RasGAP könnte zu einer verstärkten Aktivierung von Ras1 in Neuronen führen, die deren Degeneration zur Folge hat. Offensichtlich fördert Ras nicht nur die Differenzierung von Neuronen, sondern seine Deregulation führt auch zu neuronalem Zelltod.

Allerdings konnte mit ‘downstream’ Komponenten von Ras1 keine Interaktionen nachgewiesen werden, z.B. mit der MAPK rolle, obwohl auf Western Blots eine erhöhte Aktivierung der MAPK nach der Induktion des EGFR in *vap* Larven und adulten Köpfen beobachtet worden war. Dies könnte bedeuten, dass der Ras/MAPK Signalweg, nicht im Zusammenhang mit dem beobachteten Zelltod steht. Der von Ras in Gliomazellen induzierte autophagische Zelltod wurde offenbar über die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), einen weiteren Ras Effektor vermittelt (Chi *et al.*, 1999). Andererseits könnten aber auch die verwendeten Allele für diesen Nachweis nicht geeignet gewesen sein.

5.1.4. Rolle der RasGAP Proteindomänen für die Entstehung der Neurodegeneration

Dass der Neurodegenerationsphänotyp durch die Expression einer wildtypischen RasGAP cDNA in Neuronen revertiert werden konnte, wurde als Grundlage für eine funktionelle Analyse genutzt. Dafür wurden verschiedene cDNA Konstrukte mit Hilfe des UAS/GAL4 System in Neuronen überexprimiert, und ihr Einfluss auf die Vakuolisierung überprüft. Mit dem Konstrukt *UAS-22.2*, welches jeweils in beiden SH2-Domänen eine Punktmutation, bei einer intakten GAP Domäne trägt, konnte der Grad der Vakuolisierung in der *vap* Mutante nicht modifiziert werden. Der Phänotyp konnte jedoch durch das Transgen *UAS-GAP^{R695K}*, mit einer intakten SH2-SH3 Region aber einer Punktmutation in der GAP katalytischen

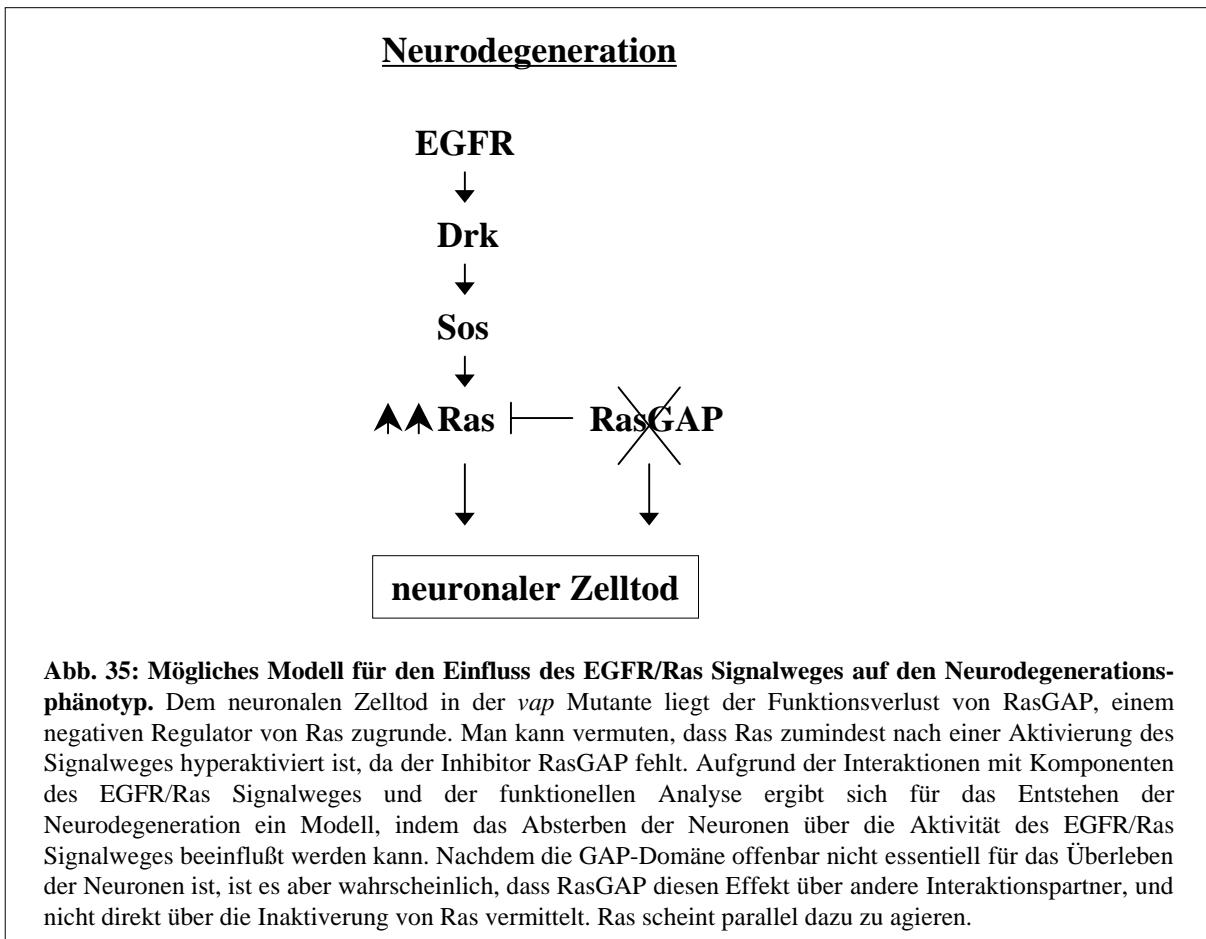
Domäne, und das nur aus der SH2-SH3 Region bestehende Transgen *UAS-17.30*, revertiert werden.

SH2-SH3-SH2 Domäne

In dem Konstrukt *UAS-22.2* wurde in der hoch konservierten FLVRES Sequenz jeder SH2 Domäne das Arginin gegen Leucin durch PCR-Mutagenese ersetzt (Cleghon *et al.*, 1998). In einem ‘GST-pull-down’ Assay wurde *in vitro* gezeigt, dass die so mutierte SH2-SH3-Region im Gegensatz zur wildtypischen, nicht an Phosphotyrosinproteine bindet (Feldmann *et al.*, 1999). Dass dieses Konstrukt den Neurodegenerationsphänotyp nicht revertieren konnte, lässt vermuten, dass eine intakte SH2-SH3 Region nötig ist, damit RasGAP seine Funktion für das Überleben der Neuronen ausüben kann. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, dass die Überexpression des Konstruktes *UAS-GAP^{R695K}* den Phänotyp revertiert. In diesem Konstrukt ist die SH2-SH3-Region wildtypisch, während in der GAP katalytischen Domäne an Position 695 ein Arginin gegen ein Lysin ausgetauscht wurde (persönliche Mitteilung D. Hughes). Schließlich zeigte das Experiment mit dem Transgen *UAS-17.30*, das eine intakte SH2-SH3 Region ausreichend war, um den Degenerationsprozess in der *vap* Mutante zu verhindern.

GAP-Domäne

Die funktionellen Analyse weist der SH2-SH3-Region eine essentielle Funktion für die Rettung des Neurodegenerationsphänotyps zu, die offensichtlich unabhängig von der GAP-katalytischen Domäne ist. Mit der wildtypische RasGAP cDNA und einem cDNA Konstrukt, dass nur aus der GAP-katalytischen Domäne besteht, konnte in *S. pombe* der ‘mating’ Phänotyp der durch die Hyperaktivierung von Ras1 aufgrund einer Mutation in *gap1* verursacht wurde, revertiert werden (Feldmann *et al.*, 1999). Das Konstrukt *UAS-GAP^{R695K}* konnte den *gap1* Phänotyp von *S. pombe* nicht retten (persönliche Mitteilung D. Hughes). Außerdem war die Expression der wildtypischen RasGAP cDNA mit dem ubiquitären actin-GAL4 Element in *Drosophila* letal, die Expression von *UAS-GAP^{R695K}* mit *actin-GAL4* verursachte keine Letalität (Giesecke, 2002). Diese Daten zeigen, dass die Mutation in diesem Transgen tatsächlich zu einem Funktionsverlust in der GAP Domäne führt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieser nicht vollständig ist.



Diese Ergebnisse führen auch zu einer erweiterten Interpretation der Interaktion von *vap* mit dem EGFR/Ras Signaltransduktionsweg. Die Funktion der GAP-katalytische Domäne ist es, die intrinsische GTPase Aktivität von Ras zu stimulieren, und damit Ras zu inaktivieren (Wittinghofer *et al.*, 1997). Wird diese für die Rettung des Phänotyps nicht benötigt, liegt der Neurodegeneration möglicherweise keine erhöhte Aktivität von Ras1 zugrunde. Das tödliche Signal für die Neuronen würde dann von RasGAP über einen anderen Weg vermittelt werden, wobei Ras1 parallel zu diesem Prozess agieren könnte.

Von SH2-SH3-SH2 Domänen ist bekannt, dass sie Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Review: Schlessinger, 1994). Der neuronale Zelltod in der *vap* Mutante wird offensichtlich durch einen hyperaktivierten EGFR/Ras Signalweg gefördert. Nachdem die Überexpression der SH2-SH3 Region bereits zu einer Suppression des Neurodegenerationsphänotyps führt, könnte man sich vorstellen, dass diese an eine Komponente des EGFR/Ras Signalweges

bindet. Deren Funktionalität könnte dadurch gestört werden, wodurch der Signalweg inhibiert und der Phänotyp abgeschwächt werden würde.

Andererseits könnte RasGAP Bestandteil eines Proteinkomplexes sein, der für das Überleben der Neuronen essentiell ist und für dessen Assoziation die SH2-SH3 Region benötigt wird. Wäre durch das Fehlen dieser Domänen in der *vap* Mutante dessen Assembly gestört, dann könnte man sich erklären, warum die Überexpression der SH2-SH3 Region ausreicht, um den neuronalen Zelltod zu verhindern. In diesem Fall wäre der Funktionsverlust der SH2-SH3 Region fataler für die Integrität der Neuronen, als eine Hyperaktivierung von Ras, die aus dem Funktionsverlust der GAP-katalytischen Domäne resultiert. Eine Beteiligung dieses Proteinkomplexes an Transportprozessen wäre vorstellbar, nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass RasGAP mit *Appl*, für das eine Funktion beim kinesinvermittelten axonalen Transport von Vesikeln diskutiert wird (Gunawardena und Goldstein, 2001), genetisch interagiert.

5.2. Phototaktisches Verhalten der *vap* Mutante

5.2.1. Ursachen des gestörten phototaktischen Verhaltens

In *vap* Fliegen wurde neben der Neurodegeneration ein Verhaltensphänotyp beobachtet. In einem Standard-Verhaltensassay für Phototaxis (Benzer, 1976) zeigten *vap*² Tiere eine stark verminderte Reaktion auf einen Lichtreiz. Durch das Wiederherstellen der wildtypischen RasGAP Funktion in diesen Fliegen, konnte dieser Defekt behoben werden, so dass auch dieser Phänotyp auf den Funktionsverlust von RasGAP zurückzuführen ist.

Gründe für diesen Defekt könnten allgemein in einer gestörten Reizverarbeitung, in einer geänderten Verhaltenspräferenz dem Licht gegenüber, oder in einer gestörten Lokomotoraktivität liegen. *Vap* Fliegen können laufen, fliegen und zeigen auf einen visuellen Reiz hin eine Fluchtreaktion. Das lässt vermuten, dass RasGAP keine essentielle Funktion im Sehvermögen bzw. bei den grundlegenden Bewegungen hat. Die circadian gesteuerte Laufrhythmus der *vap* Mutante ist normal (R. Stanewsky, persönliche Mitteilung), und sie zeigt auch kein Verhalten wie es für bang-sensitive Mutanten von Ganetzky und Wu (1982) beschrieben wurde. Es konnte ausgeschlossen werden, dass *vap*² Fliegen negativ

phototaktisch sind, da sie das Licht nicht meiden. Sie zeigten aber auch nicht das typische Verhalten von blinden Fliegen, wie durch die Gegenüberstellung mit dem Verhalten von *sine oculis* Fliegen deutlich wurde. Diese Beobachtungen legen nahe, dass dieses Defizit auf eine gestörte Reizverarbeitung zurückzuführen ist. Es bleibt allerdings zu klären, auf welcher Ebene sich dieser Defekt manifestiert. Eine mögliche Erklärung wäre, da für RasGAP in dieser Arbeit eine Rolle für das Überleben von Neuronen nachgewiesen wurde, eine Störung in der Signalübertragung zwischen Neuronen bzw. zwischen Neuronen und Muskelfasern.

5.2.2. Rolle der EGFR/Ras/MAPK Signalkaskade beim phototaktischen Verhalten

Wie unter Punkt 4.2.1. diskutiert spielt RasGAP eine essentielle Rolle bei der Übermittlung phototaktisch relevanter Signale. Im folgenden sollte untersucht werden, inwieweit andere Komponenten des EGFR/MAPK Signalweges in diesen Prozess involviert sind. Mutierte Allele von bekannten Komponenten dieses Signalweges wurden wieder heterozygot in die *vap*² Mutante eingekreuzt, und auf ihre Fähigkeit hin getestet den *vap* Verhaltensphänotyp zu modifizieren. Dabei wurde zwar keine direkte Interaktion mit Ras1 gefunden, aber sowohl mit dem *Drosophila* EGFR und verschiedenen ‘downstream’ Effektoren von Ras1 konnte das Verhalten modifiziert werden.

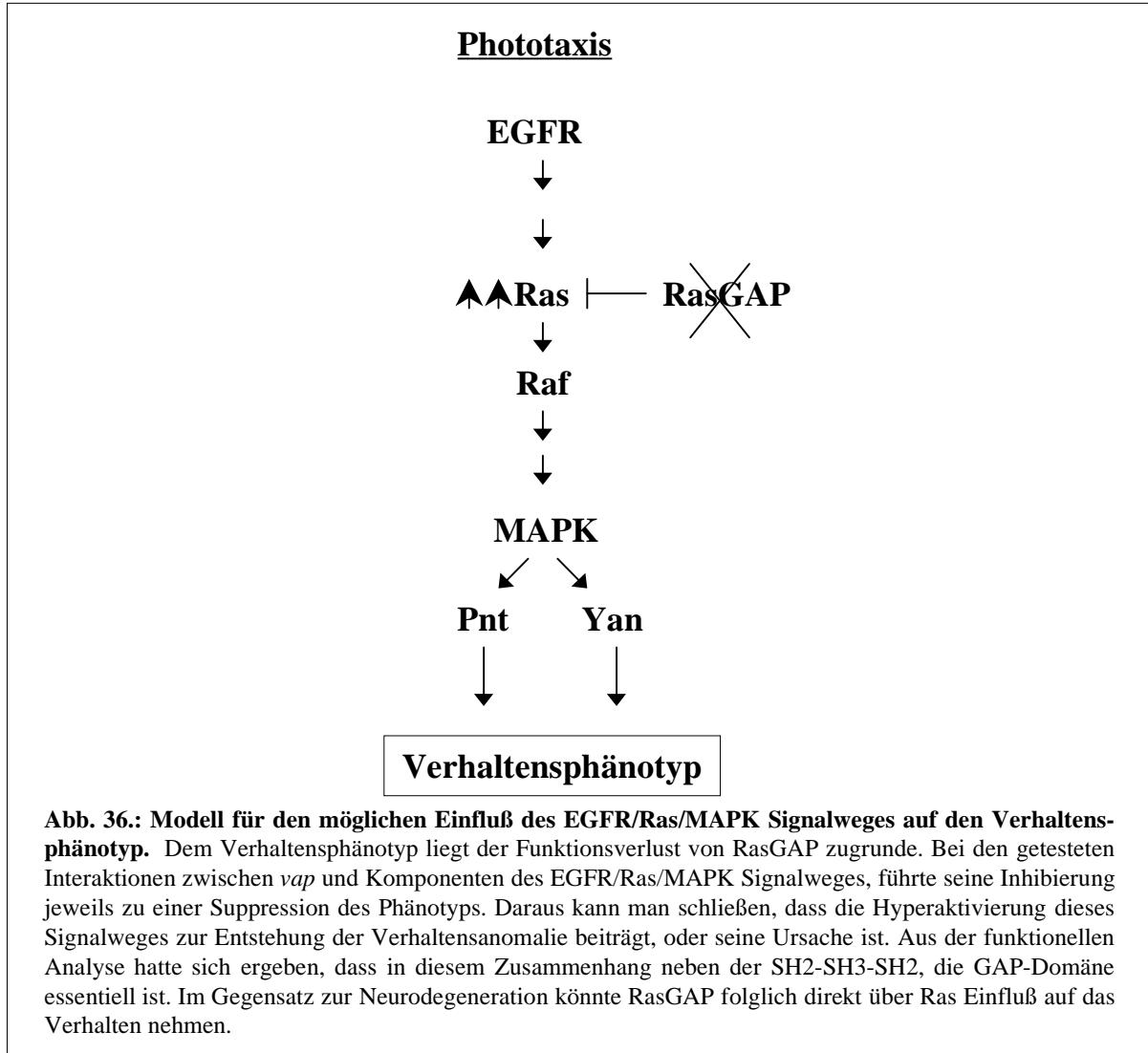
Es zeigte sich, dass die Phototaxisreaktion durch das Reduzieren der Gendosis des EGFR, durch Einkreuzen des Allels *flb*^{1P02}, signifikant verbessert werden konnte. Mit Allelen der Gene *drk*, *Sos* und *sty*, die in der Signalkaskade direkt unterhalb des EGFR liegen und für eine Weiterleitung des Signals auf Ras1 verantwortlich sind, konnte überraschenderweise keine Modifizierung des phototaktischen Verhaltens erzielt werden. Im Gegensatz dazu zeigt ein in der Signaltransduktionskette unterhalb von Ras1 liegendes ‘loss of function’ Allel des Effektors Raf (Avruch *et al.*, 1994) eine Suppression, ähnlich der Beobachtung mit der EGFR Mutante. Dies legt zum einen nahe, dass in der RasGAP Mutante ein überaktives Ras1 vorliegt. Hinweise dafür liefert auch die funktionelle Analyse der verschiedenen RasGAP Domänen, die in Kapitel 5.2.3. näher diskutiert werden sollen. Zum anderen könnte es bedeuten, dass die anderen getesteten Komponenten – *Sos*, *drk*, *sty* – die oberhalb von Ras1 liegen, für die Vermittlung des Verhaltensphänotyps keine Rolle spielen, im Gegensatz zu ihrer Funktion bei der Vermittlung der Neurodegeneration. Hinweise für eine Über-

aktivierung des Ras Signalweges liefern auch die Experimente mit verschiedenen Allelen der MAPK. Zwei Allele der MAPK wurden getestet. rl^{10A} bei dem es sich um eine ‘loss of function’ Mutation handelt, supprimierte den Phänotyp, was mit dem diskutierten Modell in Einklang gebracht werden kann, und mit der MAPK als positiver Regulator des Ras Signalweges übereinstimmt. Mit dem Allel rl^{sem} , bei dem es sich um eine ‘gain of function’ Mutation handelt, hätte man eine Verstärkung erwarten können, es war jedoch keine Veränderung des Verhaltens zu beobachten. Dies könnte bedeuten, dass dieses Allel nicht mit *vap* interagiert, oder dass eine weitere Aktivierung des Signalweges keinen sichtbaren Effekt mehr nach sich zieht. Die Transkriptionsfaktoren *pnt* und *yan* werden von der aktivierte MAPK nachdem sie in den Zellkern transportiert wurde aktiviert (O’Neil et al., 1994). Mit beiden konnte eine Verbesserung des Verhaltens erreicht werden. Aufgrund von Studien im von Drosophilaauge geht man davon aus, dass Pnt und Yan antagonistisch wirken, wobei Pnt ein Aktivator und Yan ein Suppressor der Transkription ist (Lai und Rubin, 1992; Rebay und Rubin, 1995). In der Interaktion mit *vap* zeigen jedoch beide einen Effekt in die gleiche Richtung. Das die beiden Transkriptionsfaktoren nicht immer antagonistisch wirken müssen, zeigte sich in einem Screen nach neuen Interaktionspartner von Yan. In diesem Screen wurden zahlreiche Allele von Pnt isoliert, die den durch die Expression von *Yan^{Act}* induzierten Phänotyp im Auge verstärkten (Rebay et al., 1999).

5.2.3. Einfluss der RasGAP Domänen für die Komplementation des Phototaxisphänotyps

Der Verhaltensphänotyp der *vap* Mutante konnte mit dem genomischen Konstrukt *p20.35* revertiert werden, und durch die neuronale Expression der wildtypischen cDNA *UAS-RasGAP* wurde eine partielle Revertierung erreicht. Durch die neuronale Expression der bereits diskutieren mutierten cDNA Konstrukte konnte keine Verbesserung der Phototaxisreaktion erreicht werden. Wurde das Transgen *UAS-22.2*, dessen SH2-Domänen mutiert sind, in *vap²* Fliegen exprimiert, zeigten die Tiere sogar eine noch geringere Reaktion auf den Lichtreiz als *vap²* Fliegen. Das Konstrukt *UAS-RasGAP^{R596K}*, dessen GAP-Domäne mutiert ist, und das Konstrukt *UAS-17.30*, das lediglich aus einer intakten SH2-SH3-Region besteht, hatten im *vap²* Hintergrund keinen Einfluß auf das Verhalten der Tiere. D.h beide in diesem Experiment untersuchten Domänen, die SH2-SH3-SH2 Domäne und die GAP-katalytische Domäne, müssen funktionell vorliegen, um das Verhalten auf das wildtypische

Niveau zu bringen. Für die Funktion, die RasGAP in der Vermittlung der normalen Phototaxis hat, scheinen beide Domänen essentiell zu sein. Nachdem auch die GAP-Domäne für diesen Prozess von Bedeutung ist, und auch Interaktionen mit Effektoren von Ras1 gezeigt werden konnten, kann diesem Phänotyp auch eine Hyperaktivierung von Ras1 zugrunde liegen. Damit konnte auch gezeigt werden, dass der Phototaxisdefekt einen von der Neurodegeneration unabhängigen Phänotyp der *vap* Mutante darstellt.



5.3. Identifizierung möglicher neuer Kandidaten für die Entstehung von Neurodegeneration

5.3.1. Bedeutung der Microarray-Analyse

Ziel der Microarray-Analyse war es, einen Einblick zu erhalten welche zellulären bzw. molekularen Veränderungen die RasGAP Mutation im Gehirn von *Drosophila* verursacht, und welche Mechanismen möglicherweise der Neurodegeneration in der *vap* Mutante zugrunde liegen. In den adulten Köpfen der *vap*² Mutante wurden 141 Gene identifiziert, die im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert werden. Dabei wurde ein frühes Stadium des Degenerationsprozesses gewählt, d.h. es wurden fünf Tage alte Fliegen verwendet, in denen zwar der neuronale Zelltod auf EM-Ebene bereits nachgewiesen werden kann, deren Gewebe aber noch nicht so stark geschädigt ist, dass in Paraffinschnitten eine Vakuolisierung sichtbar wurde. Zusätzlich wurden die Genexpressionsprofile für die *vap*² Mutante im dritten Larvenstadium, und von Larven in denen RasGAP überexprimiert wurde erstellt.

5.3.1. Differentiell regulierte Gene in adulten Köpfen

Die Microarray Daten zeigen, dass die in adulten Köpfen hochregulierten Gene verschiedenen Klassen zugeordnet werden können. Von diesen sollen nachfolgend die vorgestellt werden, die mit Zelltodphänomenen in Verbindung gebracht werden können.

- **Synapsen**

In den adulten Köpfen werden verschiedene Transkripte überexprimiert, deren Genprodukte an der Differenzierung von Synapsen (*Appl*, *Gad1*), an der Bildung von synaptischen Vesikeln (*Syn*, *Syt*, *SytIV*) oder an der synaptischen Architektur (*Fas1*, *Fas3*) beteiligt sind. Außerdem sind verschiedene Rezeptoren für Neurotransmitter und Ionenkanäle dereguliert, die Aufgaben in der Signalübertragung übernehmen. Das Gehirn der *vap* Fliegen ist gekennzeichnet durch das Absterben von Neuronen, welches die Degeneration von synaptischen Strukturen nach sich ziehen sollte. Die Überexpression von synaptischen Proteinen könnte somit als ein Mechanismus dienen, der diesen Verlust zu kompensieren versucht. Es wird jedoch diskutiert, dass Neurodegeneration auch in der entgegengesetzten Richtung ablaufen kann. Studien an transgenen Mäusen und Patienten weisen darauf hin,

dass beispielsweise bei der Alzheimer Erkrankung ein erster Schritt der Funktionsverlust von Synapsen ist, dem erst später das Absterben der Zellkörper folgt. Es zeigt sich hierbei, dass die Zerstörung von synaptischen Endigungen bereits signifikant ist, bevor sich senile Plaques und neurofibrilläre Bündel gebildet haben (Review: Selkoe, 2002). Möglicherweise ist in diesem Prozess die Regulation der synaptischen Plastizität gestört, die zu einem fehlerhaften Turnover der Synapsen führt (Review: Arendt, 2001).

Für die zwei im Folgenden diskutierten Gene *Appl* und *Gad1*, aus der Gruppe der Gene mit synaptischer Funktion konnte gezeigt werden, dass ihre Mutation bzw. ihre Überexpression den *vap* Neurodegenerationsphänotyp modifizieren kann. Ihre veränderte Expression steht folglich im engen Zusammenhang mit dem Degenerationprozess und dem Funktionsverlust von RasGAP in der *vap* Mutante.

Das β Amyloid protein precursor-like Protein

Von besonderem Interesse war die Feststellung, dass das *β amyloid protein precursor-like (appl)* Gen im adulten Gehirn der *vap* Mutante überexprimiert wird. *Appl* ist das *Drosophila* Homologe des menschlichen β -Amyloid precursor Proteins (APP) (Rosen *et al.*, 1989), und ist von großer Bedeutung in der Alzheimer Erkrankung. Mutationen in dem *APP* Gen wurden in familiären Fällen von Alzheimer entdeckt, welches zu der Annahme führte, dass Defekte in der Funktion oder dem Metabolismus von APP die Entstehung von Alzheimer begünstigen (Goate *et al.*, 1991). Alzheimer ist gekennzeichnet durch die Ablagerung des Amyloid β -Protein (A β) Peptids in sogenannten senilen Plaques. A β entsteht bei der proteolytischen Prozessierung von APP, welche von zwei Enzymen, der β -Sekretase und der γ -Sekretase, katalysiert wird (Review: Xia, 2001).

Durch Northern und Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass *Appl* in den adulten Köpfen der *vap* Mutante auf der Ebene der Transkription und der Translation überexprimiert wird. Im dritten Larvenstadium wird das *Appl* Transkript nicht differentiell reguliert. Die Expression von RasGAP in Neuronen mit dem UAS/GAL4-System im *vap*² Hintergrund verursachte eine Reduktion der *Appl* Proteinkonzentration. Die erhöhte mRNA- und Proteinmenge resultiert folglich aus dem Funktionsverlust von RasGAP. Die Relevanz einer veränderten *Appl* Expression für den Neurodegenerationsphänotyp, konnte durch genetische Interaktionen demonstriert werden: Die Überexpression einer wildtypischen *Appl* cDNA verstärkte den *vap*² Phänotyp, während die Reduktion der Gendosis, durch das Einkreuzen

des *Appl^d* Allels, zu einer Suppression führte. Offensichtlich fördert die erhöhte Expression von *Appl* die Degeneration von Neuronen in *vap²* Fliegen. Auch für die *Drosophila* Mutante *loe*, in der die Cholesterinbiosynthese gestört ist, wurde ein Einfluß von *Appl* auf progressive Neurodegeneration beschrieben. In diesem Fall verursachte die Reduktion der Gendosis von *Appl* eine Verstärkung des Degenerationsprozesses, wobei der Effekt den einer Überexpression von *Appl* in *loe* Fliegen haben könnte, nicht gezeigt wurde. In der *loe* Mutante scheint die Prozessierung von *Appl* verändert zu sein (Tschäpe *et al.*, 2002).

Die Deletion des *Appl* Gens führt in *Drosophila*, wie in der *APP* knock out Maus, nur zu geringen neurologischen Defiziten. *Appl^d* Fliegen sind lebensfähig und haben eine leicht reduzierte Anzahl synaptischer Boutons. Interessanterweise zeigen diese Fliegen, wie die *vap* Mutante eine gestörte Phototaxisreaktion, die durch die Expression von wildtypischen *Appl* als auch von menschlichem *APP* gerettet werden kann (Luo *et al.*, 1992; Torroja *et al.*, 1999b). *Appl* werden Funktionen in der Differenzierung von Synapsen und im axonalen Transport zugeschrieben (Torroja *et al.*, 1999a; Torroja *et al.*, 1999b). *In vitro* Studien haben zu der Überlegung geführt, dass *APP* als Rezeptor fungiert, der Kinesin-I mit Vesikeln verknüpft, und somit am anterograden axonalen Transport beteiligt ist (Kamal *et al.*, 2000). Gunawardena und Goldstein (2001) konnten diese Vermutung *in vivo* in *Drosophila* unterstützen. Dabei verursachte die Deletion von *Appl*, oder die Überexpression von *APP* oder *Appl* Konstrukten Transportphänotypen in den Axonen, wie sie in Kinesin oder Dynein Mutanten beobachtet wurden. Diese Phänotypen konnten durch die Reduktion der Gendosis von Kinesin-I verstärkt, und durch die Reduktion der Gendosis von Dynein supprimiert werden. Möglicherweise ist ein gestörter Transportmechanismus auch ein Aspekt, der der Neurodegeneration in der *vap* Mutante unterliegt, nachdem wie bereits erwähnt auch kinesinverwandte Proteine in den adulten Köpfen dereguliert zu sein scheinen. Dies wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, die den Einfluss von *vap* und *Appl* auf den neuronalen Zelltod weiter aufklären könnten.

Die Glutamic acid decarboxylase 1

Ein weiteres Gen, das in den adulten Köpfen, aber nicht im dritten Larvenstadium von *vap* überexprimiert wird, ist *glutamic acid decarboxylase 1 (Gad1)*. *Gad1* kodiert für ein Enzym, das im Nervensystem von *Drosophila* während der Entwicklung und im Adulten exprimiert wird (Jachson *et al.*, 1990). Biochemische Assays haben gezeigt, dass *Gad1*, ähnlich dem *Gad* Enzym der Säugetiere, die Bildung von GABA aus Glutamat katalysiert (Kulkarni *et al.*,

1994). Im *vap*² Hintergrund verursacht die Reduktion der Gendosis von *Gad1* eine Verstärkung der Degeneration im Zentralgehirn, seine Überexpression verminderte den Degenerationsprozess im Zentralgehirn und in den optischen Loben. Die Neuronen reagieren folglich empfindlicher auf den Funktionsverlust von RasGAP, wenn die Aktivität von Gad1 fehlt. Dies lässt vermuten, dass die Überexpression von Gad1 eine neuroprotektive Wirkung vermittelt. Übereinstimmend mit dieser Hypothese, wurde von During und Kollegen (2002) in einem Parkinson Modell in Ratten die neuroprotektive Wirkung von Gad1 demonstriert. Mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) wurde die Degeneration von dopaminergen Neuronen induziert. In der Parkinson Erkrankung verursacht der selektive Verlust dopaminproduzierender Neuronen, die ‘Disinhibition’ und Hyperaktivierung des Subthalamischen Nucleus (STN) (Review: Rodriguez *et al.*, 1998). Mit Hilfe eines viralen Vektors wurde Gad in den Neuronen des STN exprimiert, was die Degeneration der dopaminergen Neurone inhibierte, und den Verhaltensphänotyp der Ratten revertierte. Es wurde postuliert, dass durch die Expression von GAD die exzitatorischen Neurone in inhibitorische Neurone transformiert wurden, nachdem durch die Fehlexpression des Enzyms in den exzitatorischen Neuronen aus dem dort vorliegenden Glutamat durch das Gad Enzym die inhibitorische Substanz GABA hergestellt wurde.

Die Überexpression von Gad1 in der *vap* Mutante bedeutet jedoch nicht automatisch, dass auch die GABA-Synthese erhöht ist. Gad1 scheint in *Drosophila* neben der GABA-Synthese auch in der Synaptogenese eine Rolle zu spielen. An den neuromuskulären Verbindungen wird Gad1 offensichtlich in den präsynaptischen Motroneuronen benötigt, um die lokale Glutamatkonzentration zu regulieren, wodurch die Anzahl der postsynaptischen Rezeptoren reguliert wird (Feathersone *et al.*, 2000). Es bleibt noch zu untersuchen, welche Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung von Gad1 in der *vap* Mutante zugrunde liegen.

• **Zytoskelett**

Neben den synaptischen Genen, waren einige Komponenten des Zytoskeletts in adulten Köpfen differentiell reguliert, die für den antero- und retrograden Transport von Vesikeln und Zellorganellen zuständig sind. Unter anderem auch zwei Gene, die für kinesinverwandte Proteine kodieren überexprimiert. *Kap* kodiert für ein Protein, das eine Komponente des Kinesin II Komplexes ist (Sarpal und Ray, 2002). *unc-104* kodiert ebenfalls für ein Protein mit Kinesin-Motor-Aktivität (Kim and Endow, 2000). Kinesin-Motor-Proteine transportieren Organelle und Vesikel entlang von Mikrotubuli in anterograder Richtung, d.h. vom Zentrum

einer Zelle zu ihrer Peripherie (Review: Hirokawa, 1998). Ein effizienter Transport ist besonders in Neuronen von Bedeutung, in denen Vesikel und Organellen eine relativ weite Distanz vom Ort ihrer Synthese im Zellkörper zu den axonalen Endigungen, wo sie ihre Aufgabe erfüllen, zurücklegen müssen. Die Überexpression von Kinesin-Motor-Proteinen in der *vap* Mutante, legt die Vermutung nahe, dass der anterograde Transport in Axonen verstärkt ist, um möglicherweise Material für die Regeneration von axonalen Endigungen zur Verfügung zu stellen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Repression des Gen CG8800, dass für eine putative Dynein-Untereinheit kodiert (Goldstein and Gunawardena, 2000). Dyneine sind Motorproteine, die für den retrograden Transport in Zellen verantwortlich sind (Review: Hirokawa, 1998).

Es ist auch denkbar, dass die Dynamik des Aktinzytoskeletts verändert ist, nachdem das Gen *Apr14D* ebenfalls hochreguliert ist, das für ein aktinbindendes Protein kodiert, und eine Komponente des Arp2/3 Komplexes ist (Fyrberg *et al.*, 1994). Der Arp2/3 Komplex ist ein konservierter, ubiquitär vorkommender Komplex, der die Polymerisation von Aktinfilamenten stimuliert (Review: Pantaloni *et al.*, 2001). Andererseits scheint der durch Myosin vermittelte Transport vermindert zu sein, da die beiden Gene *dachs*, das für eine Myosin ATPase kodiert (Berg *et al.*, 2001), und CG1776, das aufgrund von Sequenzhomologien für eine mögliche Myosin light chain kinase kodiert (Flybase, 2003; Champagne *et al.*, 2000) reprimiert sind.

• Kalziumhomöostase

Die Array Daten ließen außerdem die abnorme Expression einiger Gene erkennen, denen Funktionen im Kalziumgleichgewicht von Zellen zugeordnet werden können. Darunter waren Gene, die für einen möglichen spannungskontrollierten Kalziumkanal, für einen möglichen Natrium/Kalzium-Austauscher, für kalziumbindende Proteine und für ein Kalzium/Kalmodulin-abhängiges Enzym kodieren. Neben der synaptischen Reizweiterleitung beeinflussen Kalziumionen eine Vielzahl von zellulären Ereignissen, unter anderem auch das Überleben von Neuronen, nachdem deren Degeneration und Zelltod oft mit einer erhöhten Kalziumkonzentration einhergehen (Review: Ghosh und Greenberg, 1995). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang das Gen *Cbp53E*, welches im Gehirn der *vap* Mutante offensichtlich hochreguliert ist. Dieses kalziumbindende Protein zeigt eine signifikante Homologie zum menschlichen Calbindin D-28K (Reifegerste *et al.*, 1993). Calbindin D-28K (CB) ist ein Mitglied der EF-Handfamilie von kalziumbindenden Proteinen, von dem man

annimmt, dass es als zytosolischer Kalziumpuffer fungiert (Review: Baimbridge *et al.*, 1992). Dieses Protein wird auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert: verschiedene Studien haben gezeigt, dass Neuronen, die CB beinhalten, vor der Degeneration, die durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration verursacht wird, geschützt sind (Guo *et al.*, 1998; McMahon *et al.*, 1998). Außerdem wurde beobachtet, dass die Expression von CB in Gehirnregionen die in der Alzheimer oder Parkinson Erkrankung besonders betroffen sind, reduziert ist (Iacopino und Christakos, 1990). Die Überexpression von Genen, die an der Regulation der Kalziumkonzentration beteiligt sind, könnte bedeuten, dass in der *vap* Mutante die durch Kalzium vermittelten intrazellulären Signale gestört sind und somit Defizite in verschiedenen neuronalen Funktionen, wie z.B. bei der synaptischen Plastizität, verursacht werden könnte. Während der synaptischen Signaltransduktion spielt intrazelluläres Ca^{2+} eine wichtige Rolle. In dieser Hinsicht sind Gene, welche das Kalziumgleichgewicht regulieren von besonderer Bedeutung für die Funktionsfähigkeit von Synapsen.

- **Glucosemetabolismus**

Einige Gene, die für Komponenten des Glucosemetabolismus kodieren, waren in den adulten Köpfen der *vap* Mutante differentiell reguliert, die auf einen erhöhten Bedarf an Glucose hinweisen könnten. Eine erhöhte Aktivität von Enzymen, die am Glucosemetabolismus beteiligt sind, wurde in den Gehirnen von Alzheimerpatienten festgestellt (Bigl *et al.*, 1999), und auch in den Gehirnen von Huntingtinpatienten wurde ein erhöhter Verbrauch von Glucose, bereits in frühen Stadien der Erkrankung beobachtet (Kuwert *et al.*, 1990). Es kann aber bis jetzt noch nicht unterschieden werden, ob der veränderte Metabolismus eine Ursache oder ein Effekt der Neurodegeneration ist. Am stärksten hochreguliert war das Gen *Amy-d*, das für eine α -Amylase, ein Enzym das am Stärkeabbau beteiligt ist, kodiert.

- **Detoxifikation**

Der Metabolismus ist eng verknüpft mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS sind normale Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung, und Störungen im Energiemetabolismus fördern die ROS Produktion. Diese toxischen Verbindungen werden normalerweise von der Zelle entgiftet. Wenn dieses Gleichgewicht jedoch gestört ist, entsteht oxidativer Stress für die Zelle (Review: Fleury *et al.*, 2002). Der Einfluß von oxidativem Stress auf Neurodegeneration wird intensiv diskutiert. Die jetzigen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Bildung von Oxidantien nicht einfach nur von einem gestörten aeroben

Metabolismus resultiert, sondern das weitere aktive Prozesse involviert sind (Review: Ischiropoulos und Beckman, 2003).

In der *vap* Mutante werden Gene differentiell reguliert, die für Cytochrom P450 Enzyme und für Gluthationtransferasen (GSTs) kodieren. Die Cytochrom P450 Genfamilie stellen ein Abwehrsystem des Körpers gegen toxische Substanzen dar (Review: Wrighton und Stevenson, 1992). Die Wirkung des P450-Systems ist aber nicht immer nützlich, da als Zwischenprodukte, der von ihnen katalysierten Redoxreaktionen, ROS gebildet werden, die toxisch für die Zelle sein können, wenn eine effektive Detoxifikation fehlt (Review: Goeptar *et al.*, 1995). Genetische Polymorphismen in Cytochrom P450 Genen können offensichtlich auch die Entstehung von Parkinson begünstigen (Riedl *et al.*, 1998). GSTs sind ebenfalls an der Detoxifikation in Zellen beteiligt, und man geht davon aus, dass sie auch an der Entfernung von reaktiven Zwischenprodukten mitwirken (Review: Sheehan *et al.*, 2001). Die veränderte Expression von P450 Enzymen und GSTs, könnte auf eine gestörte Detoxifikation oder auf einen erhöhten Bedarf an Entgiftungsreaktionen in der *vap* Mutante hinweisen. Möglicherweise spielt auch oxidativer Stress bei der durch die RasGAP Mutation verursachten Degeneration eine Rolle.

- **Ubiquitinsystem**

Das Ubiquitinsystem ist in der Zelle für den Abbau von kurzlebigen regulatorischen und von beschädigten Proteinen verantwortlich. Es besteht aus Enzymen, die Zielproteine ubiquitinieren und aus dem Proteasom, welches für ihre effiziente Degradation benötigt wird (Review: Ciechanover *et al.*, 2000). Deubiquitinierende Enzyme, zu denen auch die Ubiquitin Carboxy-terminalen Hydrolasen (UCH) gerechnet werden, sind ebenfalls ein Bestandteil dieses Systems: sie entfernen Polyubiquitinreste noch vor der Hydrolyse des jeweiligen Proteins, oder editieren die Ubiquitinmarkierung eines Proteins auf dem Weg zum Proteasom (Review: Chung und Baek, 1999).

Ein gestörtes Ubiquitinsystem kann beim Menschen zu Neurodegeneration führen, wobei für alle chronischen neurodegenerativen Erkrankungen ubiquitinassoziierte Proteinaggregate typisch sind, und auf eine fehlerhafte ubiquitinvermittelte Degradation hinweisen (Layfield *et al.*, 2001). Die Microarray Daten lassen vermuten, dass auch Abweichungen im Proteolysesystem die Degeneration in der *vap* Mutante beeinflussen. In den adulten Köpfen, sind das für eine putative UCH kodierende Gene CG1950, und das Gen *Uch* hochreguliert.

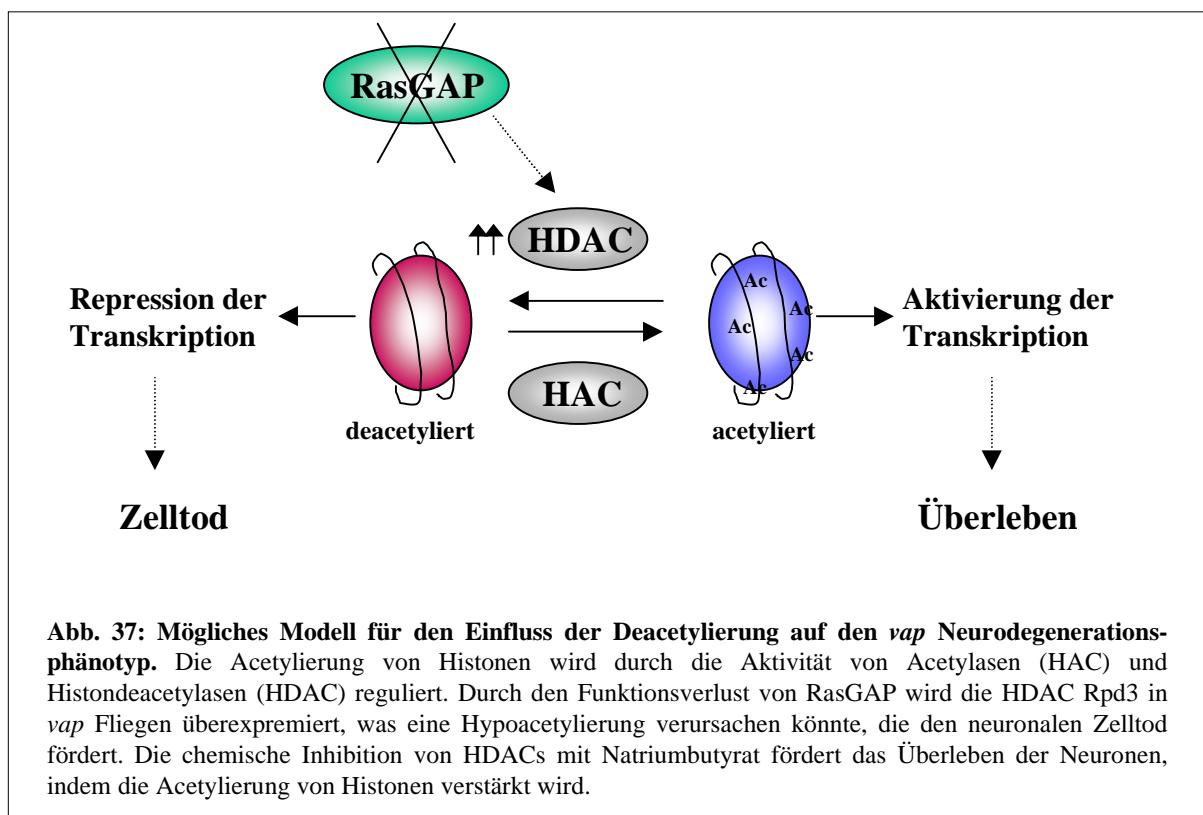
Tatsächlich lassen sich familiäre Fälle von Parkinson mit einer Mutation im *Uch-L1* Gen in Verbindung bringen (Review: Leroy *et al.*, 1998). Ferner scheint Uch-L1 mit den Lewy Körperchen, die typisch für die Parkinson Erkrankung sind, assoziiert zu sein (Lowe *et al.*, 1990). Ein weiteres Argument für diese Hypothese liefern Studien, die an der *gad* (gracile axonal dystrophy) Maus durchgeführt wurden. In dieser Mutante degenerieren Axone aufgrund einer Deletion im *Uch-L1* Gen, wobei die Kombination dieser Mutation mit einem mutierten *Uch-L3* Gen, zu einem verstärkten Phänotyp führt (Kurihara *et al.*, 2001).

- **Die Histondeacetylase RPD3**

Das Gen *Rpd3* ist das *Drosophila* Homologe der Histondeacetylase (HDAC) RPD3 in Hefe, und wurde in einem genetischen Screen nach Mutationen, die den Variegationseffekt der Expression des *white* Gens im Auge beeinflussen können identifiziert (De Rubertis *et al.*, 1996). Durch biochemische Assays konnte die HDAC Aktivität von *Rpd3* bestätigt werden (Huang und Kadonaga, 2001). Die Acetylierung von Histonen wird als ein wichtiger Mechanismus bei der Aktivierung der Genexpression angesehen, da sie eine Auflockerung der Chromatinstruktur verursacht, und diese so für die Aktivatoren der Transkription zugänglich macht. Im Gegensatz dazu reprimiert die Deacetylierung von Histonen die Transkription (Review: Waterborg, 2002).

Das *Rpd3* Transkript wird in den adulten Köpfen der *vap* Mutante überexprimiert, aber nicht im dritten Larvenstadium. Die Reduktion seiner Gendosis schwächt den *vap*² Degenerationsphänotyp deutlich ab. Das legt nahe, dass die Überexpression von *Rpd3* das durch die Mutation in RasGAP induzierte Absterben der Neuronen fördert. *Rpd3* ist in der Hefe eine Komponente eines 2 MDa großen Proteinkomplexes, der unter anderem auch den Korepressor *Sin3* enthält (Review: Ayer, 1999). *Sin3A* ist ein *Drosophila* Homologes des *Sin3* aus der Hefe Genes (Pennetta und Pauli, 1998), dessen Kolokalisation mit *Rpd3* an den polytänen Chromosomen der Speicheldrüsen von *Drosophila* gezeigt werden konnte (Pile und Wasserman, 2000). Auch die reduzierte Aktivität von *Sin3A* im *vap*² Hintergrund verminderte die Vakuolisierung. Damit wird die Annahme unterstützt, dass *Rpd3* und *Sin3A* in dem gleichen Signalweg agieren, über den auch das Überleben von Neuronen reguliert wird. Das über den Acetylierungsgrad von Histonen, neurodegenerative Prozesse beeinflusst werden können, wurde an einem *Drosophila* Huntingtinmodell gezeigt (Steffan *et al.*, 2001). Die Expression des ersten Exons des Huntingtin Gens, das 93 zusätzliche Polyglutaminreste enthält (Httex1p Q93), verursacht das Absterben von Rhabdomeren im Auge von *Drosophila*,

und in Zellkultur die reduzierte Acetylierung von Histon H3 und H4. Dieser Augenphänotyp wurde ebenfalls durch die Reduktion der Gendosis von Sin3A supprimiert. Außerdem konnte durch das Füttern der HDAC Inhibitoren Natriumbutyrat (NaBu) und Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) die Degeneration der Rhabdomere verlangsamt werden. Das Füttern von NaBu verursachte auch in *vap*² Fliegen eine signifikante Verlangsamung des Degenerationsprozesses. NaBu ist ein schwacher HDAC Inhibitor, der wie andere dieser Substanzen, die Hyperacetylierung des Chromatins induziert und somit zur Aktivierung der Transkription bestimmter Gene führt (Review: Jung, 2001). Dass NaBu in der *vap* Mutante eine neuroprotektive Wirkung vermittelt, legt die Vermutung nahe, dass Änderungen in der Histonacetylierung im kausalen Zusammenhang mit dem neuronalen Zelltod stehen. Neuere Studien zeigen auch, dass die Lebensspanne von Drosophila durch Mutationen in Rpd3, oder durch das Füttern von NaBu deutlich verlängert werden kann (Rogina *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2001).



Der Verhaltensphänotyp der *vap* Mutante konnte durch die reduzierte Aktivität von Rpd3 und Sin3A ebenfalls verbessert werden. Das Füttern von NaBu hatte aber den gegenteiligen Effekt auf das Verhalten, die Phototaxisreaktion wurde dadurch verschlechtert. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass NaBu die Aktivierung eines breiten Spektrums

an Genen induziert, welche zusätzlich einen schädlichen Einfluss auf die Ausprägung des Verhaltensphänotyps haben können. Dieses Argument ist von besonderer Bedeutung, da wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, der Verhaltensphänotyp und die Neurodegeneration offensichtlich nicht über die gleichen Signalwege vermittelt werden.

5.3.2. Differentiell regulierte Gene im dritten Larvenstadium

Die DNA-Chip Experimente der adulten Köpfe, waren so ausgerichtet, dass die Gene identifiziert wurden, die aufgrund der Mutation in dem *RasGAP* Gen differentiell reguliert werden. Inwiefern die veränderte Expression dieser Gene aber auch tatsächlich im Zusammenhang mit der Neurodegeneration steht, muss erst nachgewiesen werden, insbesondere da es wahrscheinlich ist, dass RasGAP an verschiedenen Prozessen beteiligt ist. Deshalb wurden auch die Genexpressionsprofile des dritten Larvenstadium der *vap*² Mutante erstellt, in dem noch keine degenerativen Prozesse beobachtet werden können, und von Larven dieses Stadiums, in denen RasGAP in Neuronen überexprimiert wird. Dieses Entwicklungsstadium ist experimentell leicht zugänglich, und verfügt außerdem über ein funktionstüchtiges peripheres und zentrales Nervensystem (Review: Jan und Jan, 1993; Turman *et al.*, 1993). Dass das RasGAP Protein im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt exprimiert wird, wurde bereits durch das Anfertigen eines Western Blots der verschiedenen Entwicklungsstadien gezeigt.

Gene, die nur in den adulten Köpfen differentiell reguliert werden, sind gute Kandidaten für Faktoren, die den neuronalen Zelltod fördern bzw. als eine Konsequenz des Zelltodes verändert reguliert werden. Keines der in adulten Köpfen überexprimierten Gene, die an der synaptischen Architektur wie *Fas1* und *Fas3*, oder an der Differenzierung von Synapsen wie *Appl* oder *Gad1* beteiligt sind, oder an synaptischen Vesikeln gefunden werden können wie *Syn*, *Syt* oder *SytIV*, war im dritten Larvenstadium differentiell exprimiert. Damit korreliert deren Überexpression mit dem Auftreten des Degenerationsprozesses, und unterstützt die Annahme, dass die synaptische Plastizität in der *vap* Mutante gestört sein könnte.

In den adulten Köpfen, waren verschieden Rezeptoren überexprimiert, die an der Reizweiterleitung im Nervensystem mitwirken, z.B. *GABA-B-R1*, *5-HT2* oder *Grd*. Diese waren im dritten Larvenstadium nicht überexprimiert, dagegen waren anderer Rezeptoren die

in diese Gruppe eingeteilt werden können reprimiert, z.B. *GABA-B-R2*, *DopR* oder *nAcRalpha-96A*. Im Vergleich zu den adulten Köpfen konnte in den Larven kein Gen identifiziert werden, das in die Gruppe Kalziumhomöostase eingeteilt hätte werden können. Auch das näher besprochene Gen *Cbp53E* wird in den Larven nicht verändert reguliert. Damit kann der veränderte Kalziumhaushalt wie bereits diskutiert, mit den Zelltod in der *vap* Mutante in Verbindung gebracht werden.

Auffällig sind die Gruppen Glucosemetabolismus, Detoxifikation und Zytoskelett. In allen drei Chip Experimenten wurden mehrere Gene gefunden, die in diese Gruppen eingeteilt werden können. Zum Beispiel wird, dass Gen *Amy-d* neben anderen Genen mit Funktionen im Glucosemetabolismus, in allen drei Bedingungen überexprimiert. Eine gleichzeitige differentielle Regulation von Genen in adulten Köpfen und in Larven, heißt allerdings nicht zwangsläufig, dass sie mit der Ausprägung des *vap* Phänotyps nicht in Verbindung stehen können. Ferner handelt es sich bei der Neurodegeneration um einen progressiven Vorgang. Aufgrund der relativ kurzen Dauer des dritten Larvenstadiums kommt die möglicherweise toxische Wirkung mancher Genprodukte noch nicht zum Tragen. Es ist aber bei der Interpretation dieser Gengruppen mehr Vorsicht geboten. Man kann vermuten, dass die veränderte Expression dieser Gene keine direkte Folge der RasGAP Mutation ist und somit auch in keinem spezifischen Zusammenhang mit der Neurodegeneration steht. Es könnte sich um eine generelle Reaktion der Zellen auf eine Stresssituation handeln. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass in den Larven, die RasGAP überexprimieren, viele Gene dereguliert sind, die für Hitzeschockproteine oder Komponenten des Ubiquitinsystems kodieren, was auf eine Stressreaktion der Zellen hinweist. Andererseits könnten diese Gengruppen auch im direkten Zusammenhang mit der RasGAP Mutation stehen. Von Ras ist beispielsweise bekannt, dass es Einfluss auf die Modellierung des Aktinzytoskeletts nimmt (Vojtek und Der, 1998). Es ist denkbar, dass sich die veränderte Expression von Bestandteilen des Zytoskeletts in allen drei Experimenten, auf eine gestörte Regulation von Ras zurückzuführen lässt. Wobei besonders auffällt, dass in den RasGAP überexprimierenden Larven alle Zytoskelettkomponenten bis auf zwei aktinbindende Proteine reprimiert sind.

Die Ergebnisse von Microarraystudien, wie die hier diskutierten, können sehr nützlich sein um neue Gene oder Gengruppen zu identifizieren, die durch pathologische Vorgänge reprimiert oder induziert werden, und deshalb möglicherweise an der Pathophysiologie oder

an regenerativen Prozessen beteiligt sind. Im Gehirn der *vap* Mutante wurde die veränderte Expression von Genen festgestellt, die in Prozesse involviert sind, die auch bei menschlichen neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung sind. Eine gestörte Kalziumhomöostase, eine Zunahme an freien Radikalen, und ein gestörter Glucosemetabolismus sind beispielsweise kennzeichnend für die Alzheimer Erkrankung, und scheinen miteinander zu interagieren bzw. sich gegenseitig zu bedingen (Review: Ying, 1996; Gibson, 2002). Es können auch Parallelen zu anderen *Drosophila* Neurodegenerationsstudien gefunden werden, So wurde in einem Screen nach Suppressoren und Enhancern eines durch die Expression von menschlichem Ataxin-1 induzierten Augenphänotyps, eine Mutation in einer UCH neben anderen Elementen des Ubiquitinsystems als Enhancer identifiziert. In diesem Screen zeigte sich auch, dass die Überexpression von GSTs den Neurodegenerationsphänotyp supprimieren kann, und das Mutationen in diesen Genen den Phänotyp verstärken. Offensichtlich liegen den neurodegenerativen Prozessen in verschiedenen Organismen ähnliche Mechanismen zugrunde. Es ist denkbar, dass diese verschiedene Ausgangspunkte haben, wie z.B. Mutationen in unterschiedlichen Genen, die dann in gemeinsame Ereignisse münden, die den Tod von Neuronen zur Folge haben.

6. Anhang

Tabelle 10: Differentiell exprimierte Gene in *vap²* Larven

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
<u>Zytoskelett:</u>		
CG2955	structural constituent of cytoskeleton	4.2
CG10177	myosin light chain kinase / protein kinase	2.6
MICAL	actin-like / actin binding, involved in axon guidance	2.4
Mlc-k	Myosin light chain kinase / calcium/calmodulin dependent kinase	-5.2
Klp64D	Kinesin-like protein at 64D / kinesin motor	-2.2
<u>Zelladhäsion:</u>		
Scgδ	Sarcoglycan / cell adhesion	-7.6
CG12199	cell adhesion	-5.6
CG7526	fibrillin 2-like / cell adhesion	-3.9
dally	division abnormality delayed / heparin sulfate proteoglycan	-3.2
CG4861	cell adhesion	-2.7
betaInt-nu	beta ^{III} integrin / cell adhesion receptor	-2.7
CG17824	peritrophin-like / cell adhesion	-2.4
CG9005	cell adhesion	-2.2
CG7896	cell adhesion	-2.2
<u>Detoxifikation:</u>		
Cyp4p1	Cytochrome P450-4p1	11.5
Ugt 35a	UDP-glycosyl-transferase35a	-3.0
CG11748	glutathione transferase	6.3
Cyp4a3	Cytochrome P450-4e3	2.6
Cyp307a1	Cytochrome P450-307a1	2.6
Cyp6a19	Cytochrome P450-6a19	2.2
CG17531	glutathione transferase	-32.8
Cyp6a8	Cytochrome P450-6a8	-4.2
Cyp311a1	Cytochrome P450-311a1	-4.1
Cyp28d1	Cytochrome P450-28d1	-3.9
CG17527	glutathione transferase	-2.6
Cyp6a13	Cytochrome P450-6a13	-2.3
CG17524	glutathione transferase	-2.1
Cyp9c1	Cytochrome P450-9c1	-2.0
<u>Ubiquitin system:</u>		
CG13343	ubiquitin activating enzyme	-2.3
<u>Glucosemetabolismus:</u>		
Amy-d	Amylase distal / α-amylase	5.7
LvpL	Larval visceral protein / alpha-glucosidase, glucose metabolism	-7.4
ImpL3	Ecdysone inducible gene L3 / L-lactate dehydrogenase, glycolysis	-2.3
CG3626	pyruvate dehydrogenase phosphatase	-3.0
<u>Transkription:</u>		
bab	bric a brac / transcription factor	3.4
CG10344	transcription factor	2.8
CG17912	transcription factor	2.5
CG15258	transcription factor	2.3
zen2	zerknüllt-related / RNA polymerase II transcription factor	2.2
TfIIFbeta	Transcription factor TFIIIFbeta, beta subunit	2.0
pfk	piefke / transcription factor	-7.0
z	zeste / RNA polymerase II transcription factor	-4.1

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 10: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
en	engrailed / transcription factor, involved in neuroblast determination	-3.5
CG5866	transcription factor	-3.4
Taf7	TBP-associated factor 7 / transcription factor	-3.1
H	Hairless / transcriptional co-repressor, negative regulation of N signaling	-3.0
CG3571	transcription factor	-2.5
cnc	cap-n-collar / transcription factor, involved in oocyte axis determination	-2.3
Gsc	Goosecoid / RNA polymerase II transcription factor	-2.3
Antp	Antennapedia / transcription factor, involved in segment specification	-2.3
ftz-f1	ftz-transcription factor 1 / ligand dependent nuclear receptor	-2.3
TfIIIEalpha	Transcription factor TFIIIEalpha, alpha subunit	-2.2
<u>Translation:</u>		
CG9841	translation factor	-3.1
<u>Ribosomen:</u>		
CG3843	ribosomal protein L10A / structural protein of ribosome	2.6
CG6764	ribosomal protein L24-like / structural protein of ribosome	-6.1
CG12275	ribosomal protein S10-like / structural protein of ribosome	-2.3
<u>Proteinphosphatasen:</u>		
csw	corkscrew / tyrosine phosphatase	2.0
aay	astray / phosphoserine phosphatase	-3.0
CG7706	phosphatase-inhibitor like	-2.6
CG3530	myotubularin-like / proteinphosphatase	-2.6
smid	smallminded / adenosinetriphosphatase	-2.4
CG3264	alkaline phosphatase	-2.2
Ptp4E	protein tyrosine phosphatase 4E / receptor tyrosine phosphatase	-2.0
<u>Proteinkinasen:</u>		
CG9222	protein serine/threonine kinase	4.6
CG7983	guanylate kinase	-6.1
CG1271	glycerol-kinase	-5.8
CG11573	protein tyrosine kinase-like	-3.1
CG11228	STE20-like / protein kinase	-2.9
CyclinE	cycline-dependent protein kinase	-2.6
PEK	type-I transmembrane ER-resident serine/threonine kinase-like	-2.6
CG8866	protein serine/threonine kinase	-2.3
Ady43A	adenosine kinase-like	-2.2
<u>Proteasen:</u>		
CG17475	chymotrypsine-like serin protease / endopeptidase	4.0
CG4386	serine protease / endopeptidase	2.5
CG8579	serine protease-like / endopeptidase	2.3
CG11668	serine protease / endopeptidase	-5.0
CG8215	serine protease / endopeptidase	-3.7
CG3487	serine protease / endopeptidase	-2.2
CG6367	serine protease / endopeptidase	-2.0
<u>Kanäle:</u>		
CG15627	glutamate receptor-like / ion-channel	4.1
ort	transientless / histamine-gated chloride channel	-5.9
<u>Rezeptoren:</u>		
GABA-B-R2	metabotropic GABA-B receptor subtype 2	-5.0

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 10: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
DopR	dopamine receptor	-3.8
CG3921	scavenger receptor	-3.1
nAcRalpha-96Aa	nicotinic Acetylcholine Receptor alpha subunit 96Aa / receptor channel	-2.8
InR	Insulin-like receptor, alpha-subunit-like	-3.0
CG14219	transmembrane receptor	-2.8
CG17905	low-density lipoprotein receptor-like	-2.7
CG7000	transmembrane receptor	-2.3
CG16992	G protein linked receptor-like	-2.0
Hr46	Hormone receptor-like in 46 / ligand-dependent nuclear receptor	-2.0
<u>Lipasen:</u>		
CG2772	lipase 3-like	3.2
CG6277	triacylglycerol lipase	3.2
CG17192	lipase-like	2.1
CG11124	phospholipase A2	-2.5
Pld	phospholipase D	-2.4
CG9966	triacylglycerol lipase-like	-2.0
<u>Chaperone:</u>		
Hsc70-2	Heat shock protein cognate 2	2.3
Hsp68	Heat shock protein 68kD	-7.1
Hsp67Ba	Heat shock gene 67Ba	-4.3
jdp	chaperone	-3.3
Hsp67Bb	Heat shock gene 67Bb	-3.0
Hsp26	Heat shock protein 26	-2.8
CG7130	chaperone	-2.5
Hsc70-5	Heat shock protein cognate 5 / mitochondrial chaperone	-2.2
DnaJ-1	DnaJ-like-1 / chaperone	-2.2
CG7747	peptidylprolyl isomerase 4 / chaperone	-2.0
<u>Ecdyson induzierte Proteine:</u>		
Eig71Ed	Ecdysone-induced gene 71Ed	3.7
Eig71Eg	Ecdysone-induced gene 71Eg	3.3
Eig71Ec	Ecdysone-induced gene 71Ec	3.2
Eig71Eb	Ecdysone-induced gene 71Eb	2.1
Eip78C	Ecdysone-induced protein 78C / nuclear receptor NR1E1	-5.3
<u>nicht gruppierbare Gene:</u>		
tty	tweetey	-5.6
ninaE	neither inactivation nor afterpotential, Rhodopsin 1	-4.6
Hmgcr	HMG coenzym A reductase / cholesterol biosynthesis	-4.1
Odc2	Ornithine decarboxylase	-3.8
Yp1	Yolk protein 1 / Vitellogenesis	-3.8
blm	bloom / ATP dependent DNA helicase	-3.5
fau	anoxia upregulated protein	-3.2
Hus1-like	DNA repair protein	-3.0
trx	trithorax / DNA-binding	-3.0
ena	enabled / involved in axon guidance	-2.9
term	terminus / DNA-binding	-2.9
Irp-1A	Iron regulatory protein 1A	-2.9
I(2)35Df	ATP dependent DNA helicase	-2.5
Ote	Otefin	-2.3

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 10: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
alpha-Est9	alpha Esterase	-2.3
Rhp	Rhophilin / Rho-binding protein, Rho small GTPase	-2.2
mbc	myoblast city / involved in myoblast fusion	-2.0
Est-6	Esterase 6, carboxy-esterase	2.3
osk	oskar / involved in poleplasm protein localization	2.0

Die Gene wurden entsprechend der bekannten bzw. vorhergesagten Funktion (Flybase, 2003) ihrer Genprodukte in verschiedene funktionelle Kategorien eingeteilt. Der Faktor gibt die Änderung des Expressionslevels des jeweiligen Genes in der *vap* Mutante im Vergleich zum Wildtyp wieder. Ein positiver Faktor zeigt an, dass die Expression eines Genes erhöht war, während ein negativer Faktor für einen erniedrigtes Expressionslevel steht. Die Werte wurden aus jeweils einem Array-Experiment ermittelt.

Tabelle 11: Differentiell exprimierte Gene in RasGAP überexprimierenden Larven

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
<u>Synapsen:</u>		
Frq	Frequenin / involved in neurotransmitter secretion	2.9
Ace	Acetylcholine esterase / acetylcholine metabolism	2.6
lap	likeAP18 / clathrin adaptor, synaptic vesicle coating	2.4
mAcR-60C	muscarinic Acetylcholine Receptor 60C	-2.2
<u>Zytoskelett:</u>		
CG9322	actin binding	3.0
jbug	jitterbug / actin binding protein-like	2.2
Cdlc2	Cytoplasmic dynein light chain 2 / motor	-19.3
betaTub85D	beta Tubulin 85C / cytoskeletal structural protein	-18.6
Arp53D	Actin related protein 53D / cytoskeletal structural protein	-10.5
CG7940	actin-like / cytoskeletal structural protein	-8.3
Dhc 98D	Dynein heavy chain at 89D / motor	-5.2
Lrr47	Leucine-rich repeat 47D / actin binding	-4.3
CG6873	cofilin / actin binding	-4.7
Actn3	alpha actinin 3 / actin cross-linking	-4.9
CG10177	myosin light chain kinase /protein kinase	-4.5
Klp59D	kinesin motor	-4.1
Sdic	Sperm-specific dynein intermediate chain / microtuble binding	-3.6
bxz	dynein light chain / motor	-3.3
CG2955	structural constituent of cytoskeleton	-3.3
Dhc64C	Dynein heavy chain 64C / microtuble motor protein	-3.2
CG5359	dynein light chain	-3.2
up	upheld / troponin T / tropomyosin binding	-2.7
<u>Zelladhäsion:</u>		
trn	tartan / cell adhesion	2.1
CG8003	cell adhesion	-5.1
CG7607	cell adhesion	-4.2
CG14469	cell adhesion	-4.1
CG4861	cell adhesion	-2.5
CG11674	cell adhesion	-2.2

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 11: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
<u>Detoxifikation:</u>		
Cyp4p2	Cytochrome P450-4p2	24.2
Cyp6a23	Cytochrome P450-6a23	2.0
Cyp4e3	Cytochrome P450-4e3	-3.6
Cyp6a8	Cytochrome P450-6a8	-2.8
Cyp49a1	Cytochrome P450-49a1	-2.6
CG5164	gutathione transferase	-2.1
<u>Ubiquitinsystem:</u>		
not	non-stop / ubiquitin thiolesterase, involved in axon target recognition	2.2
Pros28.1B	20S proteasome, alpha4 subunit / multicatalytic endopeptidase	-7.5
Pros.1A	20S proteasome, alpha subunit / multicatalytic endopeptidase	-3.0
CG12161	20S proteasome, beta subunit / endopeptidase	-7.0
CG17301	20S proteasome, beta4 subunit / endopeptidase	-6.7
Ubc84D	Ubiquitin conjugating enzyme 84D	-6.6
CG9475	19S proteasome regulatory particle, subunit S6b endopeptidase	-5.1
CG5440	ubiquitin conjugation enzyme	-4.1
CG9602	ubiquitin conjugation enzyme	-2.1
<u>Kalziumhomöostase:</u>		
TpnC41C	Troponin C at 41D	3.2
CG12295	voltage-gated calcium channel	2.1
CG12376	potassium dependent sodium/calcium exchanger / transporter	-4.4
TpnC47D	Troponin C at 47D	-2.7
trpl	trp-like, calmodulin binding / calcium channel	-2.5
<u>Glucosemetabolismus:</u>		
Amy-d	Amylase distal / α -amylase	5.5
Amyrel	α -amylase-like / oligo-6-glucosidase	4.9
CG12539	glucose dehydrogenase	3.2
LvpL	Larval visceral protein / alpha-glucosidase	-7.4
sut4	sugar transporter	-5.2
Sodh-2	Sorbitol dehydrogenase 2	-2.9
<u>Transkription:</u>		
ETS 98B	ETS protein / transcription factor	4.9
pan	pangolin / transcription factor	3.6
stwl	stonewall / RNA polymerase II transcription factor	3.4
zen2	zerknüllt related 2 / RNA polymerase II transcription factor	2.8
odd	odd skipped / RNA polymerase II transcription factor	2.7
sc	scute / RNA polymerase II transcription factor, involved in neurogenesis	2.6
CG11511	transcription factor	2.6
CrebA	Cyclic-AMP response element binding protein A / transcription factor	2.4
ind	intermediate neuroblastes defective / transcription factor	2.2
dl	dorsal / RNA polymerase II transcription factor	2.1
Lim3	RNA polymerase II transcription factor	-2.4
CG17401	transcription factor	-44.0
CG15306	transcription factor	-28.7
pfk	piefke / transcription factor	-8.8
CG8821	transcription factor	-8.8
CG17196	transcription factor	-6.3
CG4956	transcription factor	-4.7
achi	achintya / transcription factor	-4.5

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 11: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
Taf7	TBP-associated factor 7 / transcription factor	-4.0
CG10563	transcription factor	-3.9
CG6470	transcription factor	-3.8
TfIIA-γ-2	transcription initiation factor IIA gamma-like	-3.6
CG4483	transcription factor	-3.1
Taf13	TBP-associated factor 13 / transcription factor	-2.8
<u>Translation:</u>		
CG6412	translation elongation factor Ts	-2.7
CG8335	translation initiatin factor 3-epsilon	-2.0
<u>Ribosomen:</u>		
CG5338	ribosomal protein S19-like / structural protein of ribosome	-5.6
CG3843	ribosomal protein L10A / structural protein of ribosome	-5.3
CG11386	ribosomal protein S6-like / structural protein or ribosome	-4.4
sm	smooth / ribonucleoprotein	-4.7
CG7014	ribosomal protein S5-like / structural protein of ribosome	-3.3
CG12275	ribosomal protein S10-like / structural protein of ribosome	-3.1
<u>Proteinphosphatasen:</u>		
CG6656	acid-phosphatase	2.2
ex	expanded / protein phosphatase	2.1
CG3292	alkaline phosphatase	-20.9
CG14297	protein phosphatase-like	-8.4
CG11291	4-nitrophenylphosphatase-like	-7.3
CG4724	proteine phosphatase, regulatory subunit-like	-5.3
Pp1-13C	Protein phosphatase 1 at 13C / catalytic subunit	-2.8
CG5150	alkaline phosphatase-like	-2.7
<u>Proteinkinasen:</u>		
CG5217	protein kinase	-7.7
CG9961	phosphoglycerate kinase-like	-5.7
Ssl	suppressor of Stellate-like / protein serine/threonine kinase	-5.0
CG13414	protein kinase	-4.6
Pka-C2	cAMP-dependent protein kinase 2 / catalytic subunit	-4.4
CG15547	nucleoside-diphosphate kinase-like	-3.7
CG3809	adenosine kinase-like	-3.4
CkIIbeta2	Casein kinase II beta2 subunit / regulatory subunit	-2.5
<u>Proteasen:</u>		
CG4386	serine protease / endopeptidase	3.2
CG16731	serine protease / endopeptidase	3.0
CG10764	serine protease / endopeptidase	2.8
CG8579	serine protease-like / endopeptidase	2.3
<u>Kanäle:</u>		
CG12624	ion channel	3.2
CG14376	ion channel	2.6
CG9701	ion channel	2.0
NaCP60E	Na channel protein 6E / voltage-gated sodium channel, alpha subunit	2.0
CG3397	ion channel	-48.7
CG17137	voltage-dependent anion-selective channel-like	-8.3
CG4712	ion channel	-7.7
CG14076	glutamate receptor subunit-like / ion channel	-3.3

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 11: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
CG2657	glutamate receptor, delta subunit-like / ion channel	-2.3
CG8533	glutamate receptor, delta-1-like / receptor	2.6
Cirl	latrophilin receptor-like / G-protein linked receptor	2.0
CG7856	transmembrane receptor	-5.4
CG16801	nuclear hormone receptor-like / steroid hormone receptor	-2.6
CG12672	receptor	-2.6
CG13976	receptor	-2.5
<u>Lipasen:</u>		
CG9966	triacylglycerol lipase-like	-6.7
CG17192	lipase-like	-4.0
CG10116	lipoprotein lipase-like	-3.8
<u>Chaperone:</u>		
CG10029	chaperone	2.6
CG2911	chaperone	2.5
CG7235	Heat shock protein 60-like / chaperone	-31.0
CG5017	chaperone	-25.6
CG8517	protein disulfid isomerase / chaperone	-20.2
Hsc-70-2	Heat shock cognate 2	-8.2
CG3492	chaperone	-5.0
CG10346	chaperone	-4.9
CG8476	chaperone	-4.5
Hsp67Bb	Heat shock gene 67Bb	-3.4
CG6980	chaperone	-3.2
CG7768	peptidylprolyl isomerase / chaperon	-3.0
<u>Gene, die keiner der oben genannten Gruppen zugeordnet werden können:</u>		
rho	rhomboide	3.1
Ac78c	Adenylylclase	3.1
Nc	Nedd 2-like / caspase, involved in apoptotic signalling	2.7
Sema-1b	Semaphorin-like / involved in axon guidance	2.6
Rh2	Rhodopsin 2	2.5
Dl	Delta / Notch receptor ligand, involved in nervous system development	2.4
stumps	involved in FGF receptor signaling	2.3
BG4	death domain containing adaptor protein, involved in immune response	2.3
not	non-stop / ubiquitin thiolesterase, involved in axon target recognition	2.2
drk	downstream of receptor kinase / involved in Ras protein signal transduction	2.0
dj	don juan / linker histon H1-like	-19.1
janB	janus B	-9.8
Cytc1	Cytochrome c distal / electron transfer,	-8.4
gld	gonadal / involved in oogenesis/spermatogenesis	-5.7
Rbp 4	RNA-binding protein 4	-5.6
mael	maelstrom	-5.3
Odc2	Ornithine decarboxylase / polyamine biosynthesis	-4.3
axo	axotactin	-4.3
igl	igloo / calmodulin binding	-3.4
blm	bloom / ATP dependent DNA helicase	-3.6
fzo	fuzzy onion / GTPase	-3.6
swa	swallow / RNA-binding	-3.6
bol	boule / RNA-binding	-3.2

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 11: Fortsetzung

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
ng1	new glue 1 / ecdysone regulated	-3.0
E(Pc)	Enhancer of Polycomb	-2.5
beat-1a	beaten path 1a / involved in axon choice point recognition	-2.3
beat-1c	beaten path 1c / involved in axon choice point recognition	-2.3
Dbi	Diazepam-binding inhibitor	-2.2

Die Gene wurden entsprechend der bekannten bzw. vorhergesagten Funktion (Flybase, 2003) ihrer Genprodukte in verschiedene funktionelle Kategorien eingeteilt. Der Faktor gibt die Änderung des Expressionslevels des jeweiligen Genes in der *vap* Mutante im Vergleich zum Wildtyp wieder. Ein positiver Faktor zeigt an, dass das Expressionslevel eines Genes erhöht war, während ein negativer Faktor für ein erniedrigtes Expressionslevel steht. Die Werte wurden aus jeweils einem Array-Experiment ermittelt.

Tabelle 12: Gene, die sowohl in den Larven wie in den adulten Köpfen in die Gleiche Richtung differentiell reguliert werden

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor
<u>A: <i>vap</i>² Larven:</u>		
Amy-d	Amylase distal / α -amylase	5.7
CG7000	transmembrane receptor / scavenger receptor	2.3
zen2	zerknult related 2 / RNA polymerase II transcription factor	2.2
alpha-Est2	alpha-Esterase-2 / esterase unknown substrate	-10.6
jdp	chaperone	-3.3
CG3626	pyruvate dehydrogenase phosphatase	-3.0
CG11124	phospholipase A2	-2.5
CG17527	glutathione transferase	-2.6
CG17531	glutathione transferase	-32.8
Gycbeta100B	Guanyl cyclase beta-subunit at 100B / synthesis of cGMP	-2.3
<u>B: elav-GAL4/UAS-RasGAP Larven:</u>		
Amy-d	Amylase distal / α -amylase	5.5
stwl	stonewall / RNA polymerase II transcription factor	3.4
TpnC41C	Troponin C at 41D	3.2
zen2	zerknult related 2 / RNA polymerase II transcription factor	2.8
CG8533	glutamate gated ion-channel-like	2.6
CG12295	voltage-gated calcium channel	2.1
CG9961	phosphoglycerate kinase-like	-5.7
TpnC47D	Troponin C at 47D	-2.7

Aus den Genen, die in den *vap*² und in den elav-GAL4/UAS-RasGAP Larven eine veränderte Expression zeigten, wurden diejenigen herausgesucht, die auch in den adulten Köpfen der *vap* Mutante differentiell in die gleiche Richtung reguliert werden.

Tabelle 13: Reziprok regulierte Gene in *vap*² Larven und Larven in denen RasGAP überexprimiert wird

Flybase ID	Name / Funktion	Faktor	
		<i>vap</i> ²	elav-GAL4/ UAS-RasGAP
CG9070	-	19.2	-3.4
CG2955	structural consistent of cytoskeleton	4.2	-3.3
CG15068	-	3.6	-2.7
CG9757	-	3.2	-3.1
CG11300	-	3.0	-3.0
CG10177	myosine light chain kinase	2.6	-4.5
CG3843	ribosomal protein L10A / structural protein of ribosom	2.6	-5.3
CG4691	-	2.5	-15.8
CG12861	-	2.4	-32.4
Hsc70-2	Heat shock protein cognate 2	2.3	-8.3
CG15657	-	2.4	-12.2
CG4750	leucyl aminopeptidase	2.3	-12.0
CG12699	-	2.1	-51.4
CG15109	-	2.1	-20.4
CG4362	-	2.1	-1.9
CG12853	-	2.1	-25.9
CG10919	-	2.0	-8.1
CG12617	-	2.0	-16.9
CG5089	-	2.0	-17.8
CG18461	-	1.9	-16.4
CG13102	-	1.9	-1.2
CG18449	-	1.9	-14.0
CG14604	-	1.9	-4.4
CG7046	DNA-binding	1.9	-6.1
CG13245	-	1.9	-10.6
CG8701	-	1.9	-18.5
CG4836	L-iditol 2 dehydrogenase	1.9	-9.3
CG9966	triacylglycerol lipase-like	-6.7	2.0
MESR1	Misexpression suppressor of Ras1 / transcription factor	-6.0	2.2
CG5804	diazepam-binding inhibitor	-2.7	2.0
CG12224	oxidoreductase	-2.0	3.0
CG13624	-	-2.1	1.3
CG10550	-	-3.2	2.4
CG14567	-	-3.3	2.1
CG14272	-	-3.4	3.7
CG17110	aminoacylase	-4.7	1.6

Es wurden die Gene aus den Genexpressionsprofilen der *vap*² Larven und den Larven in denen RasGAP überexprimiert ausgewählt, die in den beiden Experimenten jeweils in die gegensätzliche Richtung reguliert wurden.

7. Literaturangaben

Affimetrix (2002). Statistical Algorithms Reference Guide. http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical_reference_guide.pdf.

Allard, J.D., Chang, H.C., Herbst, R., McNeill, H., Simon, M.A. (1996). The SH2-containing tyrosine phosphatase corkscrew is required during signaling by sevenless, Ras1 and Raf. *Development* 122(4): 1137-1146.

Alzheimer, A. (1906): Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* 23: 1134.

Anderson D., Koch C.A., Grey L., Ellis C., Moran M.F., Pawson T. (1990). Binding of SH2 domains of PLC- γ 1, GAP and src to activated growth factor receptors. *Science* 250: 979-982.

Arendt, T. (2001). Disturbance of neuronal plasticity is a critical pathogenetic event in Alzheimer' s disease. *Int J Dev Neurosci.* 19(3): 231-45.

Ashburner M. (1989). *Drosophila* a Laboratory Handbook. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York

Auluck, P.K., Chan, H.Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Bonini, N.M. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson' s disease. *Science*. 295(5556): 865-8.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl K. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.

Ayer, D.E. (2000). Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol.* 9: 193-198.

Bainbridge, K.G., Celio, M.R., Rogers, J.H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15(8): 303-8.

Bainbridge, S.P. and Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol.* 66: 57-80.

Bang, A.G., und Kintner, C. (2000). Rhomboid and star facilitate presentation and processing of the *Drosophila* TGF-alpha homolog spitz. *Genes Dev.* 14(2): 177-86

Bar-Sagi, D., Feramisco, J.R. (1985). Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell*. 42(3): 841-8.

Beiman, M., Shilo, B.-Z. and Volk, T. (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.* 10: 2993-3002.

Benzer S. (1967). Behavioral Mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc. Natl. Sci. USA* 58: 1112-1119.

Bier, E., Jan,L.Y., and Jan, Y.N. (1990). rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 4: 190-203.

Biggs, W.H., Zavitz, K.H., Dickson, B., van der Straten, A., Brunner, D., Hafen, E., Zipursky, S.L. (1994). The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *EMBO J.* 13(7): 1628-1635.

Bigl, M., Bruckner, M.K., Arendt, T., Bigl, V., Eschrich, K. (1999). Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer' s disease. *J Neural Transm.* 106(5-6): 499-511.

Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299(5604): 256-9

- Bos, J.L.** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer. Res.* 49(17): 4682-4689.
- Brand, A.H.** and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brunner, D.**, Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W.H., Zipursky, S.L., Hafen,E. (1994) A gain-of-function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76(5): 875-888.
- Burright, E. N.**, Clark, H. B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R. M., Yunis, W. S., Duvick, L. A., Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (1995). SCA1 Transgenic Mice: a Model For Neurodegeneration Caused by an Expanded CAG Trinucleotide Repeat. *Cell* 82: 937-948.
- Campbell, S.L.**, Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., Der, C.J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17(11 Reviews): 1395-413.
- Carpino N.**, Wisniewski A., Strife A., Marshak R., Kobayashi B., Stillman B., Clarkson B. (1997). p62^{dok}: a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-assiociated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 88: 197-204.
- Casci, T.**, Vinos, J., Freeman, M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 96(5): 655-665 .
- Champagne, M.B.**, Edwards, K.A., Erickson, H.P., Kiehart, D.P. (2000). *Drosophila* Stretchin-MLCK is a novel member of the Titin/Myosin light chain kinase family. *J. molec. Biol.* 300(4): 759-777.
- Chi, S.**, Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Fujita, H., Yoshida, M., Chen, W., Asai, A., Himeno, M., Yokoyama, S.,Kuchino, Y. (1999). Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*. 18(13): 2281-90.
- Chou, Q.**, Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves lox-copy-number amplifications. *Nucleic Acid Res.* 20(7): 1717-23.
- Chung, C.H.** und baek S.H. (1999). Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 633-640.
- Ciechanover, A.**, Orian, A., Schwartz, A.L. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*. 22(5): 442-51.
- Clarke, P.G.** (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)* 181: 195-213.
- Cleghon, V.**, Feldmann, P., Ghiglione, C., Copeland, T.D., Perrimon, N., Hughes, D.A., Morrison, D.K. et al., (1998). Opposing actions of CSW and RasGAP modulate the strength of Torso RTK signaling in the Drosophila terminal pathway. *Molec. Cell* 2(6): 719-727.
- Clifford, R.J.**, Schupbach, T. (1989). Coordinately and differentially mutable activities of torpedo, the Drosophila melanogaster homolog of the vertebrate EGF receptorgene. *Genetics*. 123(4): 771-87.
- Crespo, P.** and Leon, J. (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 57(11): 1613-36.
- Dawson, T.M.** and Dawson, V.L. (2003). Rare genetic mutations shed light on the phathogenesis of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 111: 145-151.
- de Belle, J.S.** and Heisenberg, M. (1996). Expression of *Drosophila* mushroom body mutations in alternative genetic backgrounds: a case study of the mushroom body miniature gene (mbm). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9875-9880.

- De Robertis**, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., Spierer, P. (1996). The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* 384(6609): 589-591.
- Donovan**, S., Shanon, K.M., Bollag, G. (2002). GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1602: 23-45.
- Duncan**, R.R., Shipston, M.J., Chow, R.H. (2000). Double C2 protein. A Review. *Biochimie* 82: 421-426.
- Dunn**, W. A. Jr. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4: 139-143.
- Feany**, M.B., Bender, W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson' s disease. *Nature* 404 (6776): 394-8.
- Featherstone**, D.E., Rushton, E.M., Hilderbrand-Chae, M., Phillips, A.M., Jackson, F.R., Broadie, K. (2000). Presynaptic glutamic acid decarboxylase is required for induction of the postsynaptic receptor field at an aglutamatergic synapse. *Neuron* 27(1): 71-84.
- Feigin**, A. und Zgaljardic, D. (2002). Recent advances in Huntington's disease: implications for experimental therapeutics. *Curr. Opin. Neurol.* 15: 483-489.
- Feldman**, P., Eicher, E.N., Leevers, S.J., Hafen, E., Hughes, D.A. (1999). Control of growth and differentiation by *Drosophila* RasGAP , a homolog of p120 Ras-GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1928-1937.
- Fernandez-Funez**. P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J., McCall, A., Canal, I., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y., Botas, J. (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*. 408(6808):101-6.
- Feyereisen**, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* Vol. 44: 507-533
- Fleury**, C., Mignotte, B., Vayssiere, J.L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*. 84(2-3): 131-41.
- Flybase** (2003). <http://flybase.bio.indiana.edu:7081/>
- Fortini**, M.E. and Bonini, N.M. (2000). Modeling human neurodegenerative disease in *Drosophila* : on a wing and a prayer. *Trends Genet.* 16(4): 161-7.
- 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(23): 13703-8.
- Fyrberg**, C.C., Parker, H., Hutchison, B., Fyrberg, E. (1994). *Drosophila melanogaster* genes encoding three troponin-C isoforms and a calmodulin-related protein. *Biochem. Genet.* 32(3-4): 119-135
- Fyrberg**, C.C., Ryan, L., Kenton, M., Fyrberg, E. (1994). Genes encoding actin-related proteins of *Drosophila melanogaster*. *J. molec. Biol.* 241(3): 498-503.
- Gabay**, L., Scholz, H., Golembio, M., Klaes, A., Shilo, B.Z., Klambt, C. (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila*embryonic ventral ectoderm. *Development* 122(11): 3355-3362.
- Gabay**, Y., Seger, R., Shilo, B-Z. (1997). In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* 277: 1103-1106.
- Ganetzky**, B. and Wu, C.F. (1982). *Drosophila* mutants with opposing effects on nerve excitability: genetic and spatial interactions in repetitive firing. *J Neurophysiol.* 47(3): 501-14.
- Gaul**, U., Mardon, G., and Rubin, G.M. (1992). A putative Ras GTPase activating protein acts as a negative regulator of signaling by the Sevenless receptor tyrosine kinase. *Cell* 68: 1007-1019.

- Gavrieli**, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J.Cell Biol.* 119: 493-501.
- Ghosh**, A., Greenberg, M.E. (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*. 268(5208): 239-47.
- Gibson**, G.E. (2002). Interactions of oxidative stress with cellular calcium dynamics and glucose metabolism in Alzheimer' s disease. *Free Radic Biol Med*. 32(11): 1061-70.
- Giesecke**, A. (2002). Molekulare und funktionelle Analyse der Neurodegenerationsmutante *vap* in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Universität Regensburg.
- Glenner**, G.G. und Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebro vascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Communun.* 120: 885-890.
- Gloor**, G.B., Preston, C.R., Johnson-Schlitz, D.M., Nassif, N.A., Phillis, R.W., Benz, W.K., Robertson, H.M., Engels WR. (1993). Type I repressors of P element mobility. *Genetics*. 135(1): 81-95.
- 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' sdisease. *Nature* 349(6311): 704-6
- Goedert**, M., Jakes, R., Spillantini, M.G. (1998). α -Synuclein and the Lewy body. *Neurosci. News* 1: 47-52.
- Goeptar**, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol*. 25(1): 25-65.
- Goldstein**, L.S. and Gunawardena, S (2000). Table S2. Identified cytoskeletal protein coding genes in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 150(2): <http://intl.jcb.org/cgi/content/full/150/2/F63/DC1/2>
- Golembio**, M., Raz, E. and Shilo, B.-Z. (1996). The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development* 122: 3363-3370.
- Grigliatti**, T. A. (1998). In *Drosophila: A Practical Approach*, ed. D. Roberts, New York: IRL Press at Oxford Univerty Press.
- Gunawardena**, S. and Goldstein, L.S. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron*. 32(3): 389-401.
- Guo**, Q., Christakos, S., Robinson, N., Mattson, M.P. (1998). Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrialfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(6): 3227-32.
- Harris**, W.A., Stark, W.S., Walker, J.A. (1976). Genetic dissection of the photoreceptor system in the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *J. Physiol.* 256: 415-439.
- Harrison**, S.D., Solomon, N., Rubin, G.M. A genetic analysis of the 63E-64A genomic region of *Drosophila melanogaster*: Identification of mutations in a replication factor C subunit. *Genetics* 1995 139(4): 1701-1709.
- Hartl**, F.U., und Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* 295: 1852-1858.
- Heisenberg** and Bohl, 1979 Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z. Naturf. C. Biosci.* 34: 143-147.
- Henkemeyer**, M., Rossi, D.J., Holmyard, D.P., Puri, M.C., Mbamalu, G., Harpal, K., Shih, T.S., Jacks, T., Pawson, T. (1995). Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* 377(6551): 695-701.

- Hickey** and Benkel, (1982). Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: effects of dietary carbohydrate. *Biochem. Genet.* 20(11/12): 1117-1129.
- Hirokawa**, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 279(5350): 519-26.
- Hoogeveen**, A.T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij K.E., Roos, R.A., van Ommen G.J., and Galjaard, H., (1993). Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 2: 2069-2073.
- Hou**, X. S., Chou, T.B., Melnick ,M.B., Perrimon, N. (1995). The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* 81 (1): 63-71.
- Huang**, A.M.and Rubin G.M. (2000). A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 156(3): 1219-1230.
- Huang**, X. and Kadonaga, J.T. (2001). Biochemical analysis of transcriptional repression by *Drosophila* histone deacetylase 1. *J. Biol. Chem.* 276(16): 12497-12500.
- Iacopino**, A.M. and Christakos, S. (1990). Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(11): 4078-82.
- Igarashi**, S., Koide, R., Shimohata, T., Yamada, M., Hayashi, Y., Takano, H., Date, H., Oyake, M., Sato, T., Sato, A., Egawa, S., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Nakano, R., Tanaka, K., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H., Tsuji, S. (1998). Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet*. 18(2): 111-7.
- Imam**, F., Sutherland, D., Huang, W., Krasnow, M.A. (1999). stumps, a *Drosophila* gene required for fibroblast growth factor (FGF)-directed migrations of tracheal and mesodermal cells. *Genetics* 152(1): 307-318.
- Ischiropoulos**, H. and Beckman, J.S. (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest*. 111(2): 163-9.
- Jackson**, F.R., Newby, L.M., Kulkarni, S.J. (1990). *Drosophila* GABAergic systems: sequence and expression of glutamic acid decarboxylase. *J. Neurochem*. 54(3): 1068-1078.
- Jackson**, G.R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P.W., MacDonald, M.E., Zipursky, S.L. (1998). Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron*. 21(3): 633-42.
- Jan**, Y.N. und Jan, L.Y. (1993). The peripheral nervous system. in: *The Development of Drosophila melanogaster*. Bate, M. and Martinez Arias (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: pp 1207-1244.
- Jung**, M. (2001). Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents. *Curr Med Chem*. 8(12): 1505-11.
- Kadosh**, D., Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to targetpromoters. *Cell*. 89(3): 365-71.
- Kamal**, A., Stokin, G.B., Yang, Z., Xia, C.H., Goldstein, L.S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron*. 28(2): 449-59.
- Kang**, H.L., Benzer. S., Min, K.T. (2002). Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(2): 838-43.
- Kang**, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters,C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuter, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736.
- Karim**, F.D. und Rubin, G.M. (1998). Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. *Development* 125(1): 1-9

- Kegel**, K.B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J.G., Aronin, N., DiFiglia, M. (2000). Huntington expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci.* 20(19): 7268-78.
- Kiermayer**, C (1999). Genetische und molekulare Analyse einer *RasGAP* Neurodegenerationsmutante in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Universität Regensburg
- Kitada**, T., Asakawa, S., Hattori, N., Masumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998). Mutations in the Parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Natur* 392: 605-608.
- Kim**, A.J. and Endow, S.A. (2000). A kinesin family tree. *J. Cell Sci.* 113(21): 3681-3682.
- Kim**, J.H., Liao, D., Lau, L.F., Huganir, R.L. (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron.* 20(4):683-91.
- Kretzschmar**, D., Hasan, G., Sharma, S., Heisenberg, M., Benzer, S. (1997). The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*. *J Neurosci.* 17(19): 7425-32.
- Kulkarni**, S.J., Newby, L.M., Jackson, F.R. (1994). *Drosophila* GABAergic systems. *Molec. gen. Genet.* 243(5): 555-564.
- Kurihara**, L.J., Kikuchi, T., Wada, K., Tilghman, S.M. (2001). Loss of Uch-L1 and Uch-L3 leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia. *Hum Mol Genet.* 10(18): 1963-70.
- Kuwert**, T., Lange, H.W., Langen, K.J., Herzog, H., Aulich, A., Feinendegen, L.E. (1990). Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain.* 113 (Pt 5):1405-23.
- Lai**, Z.C. and Rubin, G.M. (1992). Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the yan gene, an ETS domain protein. *Cell.* 70(4): 609-20.
- Layfield**, R., Alban, A., Mayer, R.J., Lowe J. (2001). The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27: 171-179.
- Lee**, J., Hahn, Y., Yun, J.H., Mita, K., Chung, J.H. (2000). Characterization of JDP genes, an evolutionarily conserved J domain-only protein family, from human and moths. *Biochim. biophys. Acta* 2000 1491(1-3): 355-363
- Lemmon**, M.A., Ferguson, K.M., Abrams, C.S. (2002). Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* 513(1): 71-6
- Leon**, J., Guerrero, I., Pellicer, A. (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol.* 7(4): 1535-40.
- Leroy**, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D., Polymeropoulos, M.H. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395(6701): 451-2
- Lindsley**, D.L. and Zimm G.G. (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Lipshutz**, R.J., Fodor, S.P.A., Gingras, T.R., und Lockhart D.J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* 21: 20-24.
- Livneh**, E., Glazer, L., Segal, D., Schlessinger, J., Shilo, B.Z. (1985). The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell* 40: 599-607.
- Lockhart**, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., und Horton, H. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14: 1675-1680.

- Luo**, L.Q., Martin-Morris, L., White, K. (1990). Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J. Neurosci.* 10(12): 3849-3861.
- Luo**, L.Q., Tully., White K. (1992). Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron* 9: 595-605
- Lowe**, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J., Wilkinson, K.D. (1990). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of humanneurodegenerative diseases. *J Pathol.* 161(2):153-60.
- Ma**, J., Yee, A., Brewer, H.B. Jr., Das, S., Potter, H. (1994). Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature.* 372(6501): 92-4.
- Matsuo**, T., Takahashi, K., Kondo, S., Kaibuchi, K., Yamamoto, D. (1997). Regulation of cone cell formation by Canoe and Ras in the developing Drosophila eye. *Development* 124(14): 2671-2680
- Mattson**, M.P. (1997). Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *J Neurobiol* 25: 439-450.
- McGlade**, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settleman, J., Dedha,r S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L.B., Pawson, T. (1993). The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J.* 12(8): 3073-81.
- McMahon**, A., Wong, B.S., Iacopino, A.M., Ng, M.C., Chi, S., German, D.C. (1998) Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 54(1): 56-63.
- Marsh**, J.L., Walker, H., Theisen, H., Zhu, Y.Z., Fielder, T., Purcell, J., Thompson, L.M. (2000). Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in Drosophila. *Hum Mol Genet.* 9(1): 3-25.
- Maughan**, N.J., Lewis, F.A., und Smith, V. (2001). An introduction to arrays. *J. Pathol.* 195: 3-6.
- Melzig**, J., Rein, K.H., Schäfer, U., Pfister, H., Jäckle, H., Heisenberg, M., Raabe T. (1998). A protein related to p21-activated kinase (PAK) that is involved in neurogenesis in the Drosophila adult central nervous system. *Curr Biol.* 22: 1223-1226.
- Min**, K-T. and Benzer S. (1997). Spongewake and eggroll: two hereditary diseases in Drosophila resemble patterns of human brain degeneration. *Current Biology* 7: 885-888.
- Moodie**, S.A. and Wolfman, A. (1994). The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 10(2): 44-8.
- Mügschl**, M. (2003). Titel noch nicht verfügbar. Diplomarbeit. Universität Regensburg
- Müller**, U. and Kins, S. (2002). APP on the move. *Trends Mol Med.* 8(4): 152-5.
- Mutsuddi**, M. and Nambu, R. (1998). Neural Disease: *Drosophila* degenerates for a good cause. *Current Biology* 8: R809-R811.
- Neuman-Silberberg**, F.S., Schejter, E., Hoffmann, F.M., Shilo, B.Z. (1984). The Drosophila ras oncogenes: structure and nucleotide sequence. *Cell* 37:1027-1033.
- Nixon**, R.A., Cataldo, A.M., Mathews, P.M. (2000). The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer' s disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res.* 25(9-10): 1161-72.
- Noda**, M., Ko, M., Ogura, A., Liu, D.G., Amano, T., Takano, T., Ikawa, Y. (1985). Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature*.318(6041): 73-5.

Norremolle, A., Riess, O., Epplen, J.T., Fenger, K., Hasholt, L., Sorensen, S.A. (1993). Trinucleotide repeat elongation in the Huntington gene in Huntington disease patients from 71 Danish families. *Hum Mol Genet* 2(9): 1475-6.

O' Connell und Rosbash, (1984) Sequence, structure, and codon preference of the Drosophila ribosomal protein 49 gene. *Nucleic Acids Res.* 12: 5495-5513.

Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 211-6.

Olivier, J.P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., Pawson, T. Olivier et al., (1993). A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* 73(1): 179-191.

O'Neil, E.M., Rebay, I., Tjian und Rubin G.M. (1994). The activities of two Ets-related transkription factors required for Drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78: 137-147.

Pantaloni, D., Le Clainche, C., Carlier, M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science*. 292(5521): 1502-6.

Parker, F., Maurier F., Delumeau I., Duchesne M., Faucher D., Debussche L., Dugue A., Schweighoffer F., Tocque. (1996). A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2561-2569.

Parsons, P.A. (1973). Behavioral and Ecological Genetics. A study in Drosophila. Clarendon Press Oxford.

Paulson H. L., Perez M. K., Trottier Y., Trojanowski J. Q., Subramony S. H., Das S. S., Vig P., Mandel J.-L., Fischbeck K. H., and Pittman R. N. (1997). Intranuclear Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuron* 19: 333-344.

Pennetta, G. and Pauli, D. (1998). The Drosophila sin3 gene encodes a widely distributed transcription factor essential for embryonic viability. *Dev. Genes Evol.* 208(9): 531-536

Pettmann, B. und Henderson , C.E. (1998). Neuronal cell death. *Neuron*. 20(4): 633-47.

Pile, L.A. und Wassarman, D.A. (2000). Chromosomal localization links the SIN3-RPD3 complex to the regulation of chromatin condensation, histone acetylation and gene expression. *EMBO J.* 19(22): 6131-6140

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Globe, L.I., Nussbaum, R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047.

Prober,D.A. and Edgar,B.A. (2000).Ras1 promotes cellular growth in the Drosophila wing. *Cell*. 100(4):435-46.

Rebay, I. and Rubin, G.M. (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell*. 81(6): 857-66.

Rebay, I., Chen, F., Hsiao, F., Kolodziej, P.A., Kuang, B.H., Laverty, T., Suh, C., Voas, M., Williams, A., Rubin, G.M. (2000). A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the yan gene of Drosophila identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein. *Genetics* 154(2): 695-712.

Redlich, E. (1898). Über miliäre Sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie. *Jahrbücher für Psychiatrie und Neurologie*. 17: 208-216.

Reichman-Fried, M., Dickson, B., Hafen, E., Shilo, B.Z. (1994). Elucidation of the role of breathless, a Drosophila FGF receptor homolog, in tracheal cell migration. *Genes Dev.* 8: 428-39

Reifegerste, R., Grimm, S., Albert, S., Lipski, N., Heimbeck, G., Hofbauer, A., Pflugfelder, G.O., Quack, D., Reichmuth, C., Schug, B., Zinsmaier, K.E., Buchner, S., Buchner, E. (1993). An invertebrate calcium-binding

protein of the calbindin subfamily: protein structure, genomic organization, and expression pattern of the Calbindin-32 gene of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 13(5): 2186-2198

Riedl, A.G., Watts, P.M., Jenner, P., Marsden, C.D. (1998). P450 enzymes and Parkinson' s disease: the story so Mov Disord. 13(2): 212-20.

Robinow, S., and White, K. (1988). The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons in all developmental stages. *Dev. Biol.* 126: 294-303.

Roch, F., Serras, F., Cifuentes, F.J., Corominas, M., Alsina, B., Amoros, M., Lopez-Varea, A., Hernandez, R., Guerra, D., Cavicchi, S., Baguna, J., Garcia-Bellido, A. (1998). Screening of larval/pupal P-element induced lethals on the second chromosome in *Drosophila melanogaster*: clonal analysis and morphology of imaginal discs. *Mol Gen Genet.* 257(2): 103-12.

Rodriguez, M.C., Obeso, J.A., Olanow, C.W. (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson' s disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44(3 Suppl 1): S175-88.

Roger, N., Rosenberg, R.N. (2000). The molecular and genetic basis of Alzheimer disease: the end of the beginning. The 2000 Wartenberg lecture. *Neurology* 54: 2045-2054.

Rogina, B., Helfand, S.L., Frankel, S. (2002). Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science*. 298(5599):1745.

Rorth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(22): 12418-22.

Rosen, D.R., Martin-Morris, L., Luo, L.Q., White, K. (1989). A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human b-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2478-2482.

Ross, C.A. (1997). Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* 19(6): 1147-50.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning – A Laboratory manual second edition. *Cold Spring Harbour Laboratory press.*, New York.

Sarov-Blat, L., So, V., Liu, L., Rosbash, M. (2000): The *Drosophila* takeout gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior.

Sarpal, R. and Ray, K. (2002). Investigating the role of KAP (Kinesin Associated Protein) in *Drosophila*. *A. Dros. Res. Conf.* 43: 1008C

Sawamoto, K., Taguchi, A., Hirota, Y., Yamada, C., Jin, M.H., Okano, H. (1998). Argos induces programmed cell death in the developing *Drosophila* eye by inhibition of the Ras pathway. *Cell Death Differ.* 5(4): 262-70.

Schalet, A.P. (1986). The distribution of and complementation relationships between spontaneous X-linked recessive lethalmutations recovered from crossing long-term laboratory stocks of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 163: 115-144.

Schejter, E.D., Segal, D., Glazer, L., Shilo, B.Z. (1986). Alternative 5' exons and tissue-specific expression of the *Drosophila* EGF receptor homolog transcripts. *Cell* 46: 1091-1101

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schnellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2: 864-870.

Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci.* 18(8): 273-5.
Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4(1): 25-30.

- Schnorr**, J. D. and Berg, C. A. (1996). Differential activity of Ras1 during patterning of the Drosophila dorsoventral axis. *Genetics* 144 (4): 1545-1557
- Schweitzer**, R., Howes, R., Smith, R., Shilo, B.Z., Freeman, M. (1995). Inhibition of Drosophila EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature* 376(6542): 699-702.
- Seger**, R. and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726-735.
- Selkoe**, D.J. (1999). Alzheimer' s disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2): 741-66.
- Selkoe**, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer' s disease. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738 Suppl): A23-31.
- Selkoe**, D.J. (2002). Alzheimer' s disease is a synaptic failure. *Science*. 298(5594): 789-91.
- Settelmann**, J., Narasimhan V., Foster C.L., Weinberg R.A. (1992): Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190 - implications for a signaling pathway from Ras to the Nucleus. *Cell* 69: 539-549.
- Sheehan**, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360(Pt 1): 1-16.
- Simon**, M.A., Bowtell, D.D.L., Dodson, G.S., Laverty, T.R., Rubin, G.M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67: 701-716
- Singh** S. (1993). Quantification of countercurrent distribution: from molecular partition to animal behavior. *Biochem. biophys. res. commun.* 196: 430-434.
- Small**, D.H. (1998). The role of the amyloid protein precursor (APP) in Alzheimer's disease: does the normal function of APP explain the topography of neurodegeneration? *Neurochem. Res.* 23: 795-806.
- Spradling**, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Laverty, T., Mozden, N., Misra, S., Rubin, G.M. (1999). The Berkeley Drosophila genome project gene disruption project. Single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. *Genetics* 153(1): 135-177.
- Steffan**, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D.E., Jackson, G.R., Marsh, J.L., Thompson, L.M. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila. *Nature*. 413(6857): 739-43.
- Stryer**, L. (1996). Biochemie. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag
- Sturtevant**, M.A., Roark, M., Bier, E. (1993). The Drosophila rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGFR signaling pathway. *Genes Dev.* (6):961-73.
- Sulzbacher**, S. (1999). Analyse einer p120 RasGAP Mutante in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Universität Regensburg
- 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 beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264(5163): 1336-40.
- Sweetser**, D.A., Kapur, R.P., Froelick, G.J., Kafe, K.E., Palmiter, R.D. (1997). Oncogenesis and altered differentiation induced by activated Ras in neuroblasts of transgenic mice. *Oncogene* 15(23): 2783-94
- Takahashi**, M., Kanuka, H., Fujiwara, H., Koyama, A., Hasegawa, M., Miura, M., Iwatsubo, T. (2003). Phosphorylation of α -synuclein characteristic of synucleinopathy lesions is recapitulated in α -synuclein transgenic Drosophila. *Neurosci Lett.* 336(3): 155-8.

- The, I.**, Hannigan, G.E., Cowley, G.S., Reginald, S., Zhong, Y., Gusella, J.F., Hariharan, I.K., Bernards, A. (1997). Rescue of a Drosophila NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* 276(5313): 791-794.
- Tocque, B.**, Delumeau, I., Parker, F., Maurier, F., Multon, M.C., Schweighoffer, F. (1997). Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal*. 9(2): 153-8.
- Torroja, L.**, Chu, H., Kotovsky, I., and White, K. (1999a). Neuronal overexpression of APPL, the Drosophila homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr. Biol.* 9: 489-492.
- Torroja, L.**, Luo, L., White, K. (1996). APPL, the Drosophila member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons. *J. Neurosci.* 16(15): 4638-4650.
- Torroja, L.**, Packard, M., Gorczyca, M., White, K., Budnik, V. (1999b). The Drosophila β -amyloid precursor protein homologe promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 19 (18): 7793-7803.
- Tschäpe, J.A.**, Hammerschmied, C., Mühlig-Versen, M., Athenstaedt, K., Daum, G., Kretzschmar, D. (2002). The neurodegeneration mutant lochrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing. *EMBO J.* 21(23): 6367-76.
- Turmann, J.W.**, Taylor B.J., Awad, T.A. (1993). Formation of the adult nervous system. in: The Development of *Drosophila melanogaster*. Bate, M. and Martinez Arias (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: pp 1245-1276.
- Vojtek, A.B.** and Der, C.J. (1998). Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem*. Aug 7;273(32):19925-8.
- Warner, L.E.**, Garcia, C.A., Lupski, J.R. (1999). Hereditary peripheral neuropathies: clinical forms, genetics, and molecular mechanisms. *Annu Rev Med*.50: 263-75.
- Warrick, J.M.**, Paulson, H.L., Gray-Board, G.L., Bui, Q.T., Fischbeck, K.H., Pittman, R.N., Bonini, N.M. (1998). Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in Drosophila. *Cell* 93(6): 939-49.
- Wassarman, D.A.**, Therrien, M., Rubin, G.M. (1995). The Ras signaling pathway in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 44-50.
- Waterborg JH.** (2002): Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochem Cell Biol.* 80(3):363-78.
- Wen, L.P.**, Madani, K., Martin, G.A., Rosen, G.D. (1998). Proteolytic cleavage of ras GTPase-activating protein during apoptosis. *Cell Death Differ.* 5(9): 729-34.
- Wittinghofer, A.**, Scheffzek, K., Ahadian, M.R. (1997). The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Letters* 410: 63-67.
- Wittmann, C.W.**, Wszolek, M.F., Shulman, J.M., Salvaterra, P.M., Lewis, J., Hutton, M., Feany, M.B. (2001). Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*. 293(5530): 711-4.
- Wolf, T.** and Ready, D. (1993). Pattern Formation in the *Drosophila* Retina. in: The Development of *Drosophila melanogaster*. Bate, M. and Martinez Arias (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: pp 1277-1326.
- Woodruff, R.C.** and Ashburner, M. (1979). The genetics of a small autosomal region of Drosophila melanogaster containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. *Genetics* 92: 133-149
- Wright, L.G.**, Chen, T., Thummel, C.S., Guild, G.M. (1996). Molecular characterization of the 71E late puff in *Drosophila melanogaster* reveals a family of novel genes. *J. molec. Biol.* 255(3): 387-400.

- Wrighton, S.A., Stevens, J.C.** (1992). The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol.* 22(1): 1-21
- Xia, W.** (2001). Amyloid metabolism and secretases in Alzheimer' s disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 1(5): 422-7.
- Xue, L., Fletcher, G.C., Tolkovsky, A.M.** (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci.* 14(3): 180-98.
- Yagi, Y. and Hayashi, S.** (1997). Role of the Drosophila EGF receptor in determination of the dorsoventral domains of escargot expression during primary neurogenesis. *Genes to Cells* 2(1): 41-53.
- Yankner, B.A.,** (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16: 921-932.
- Ying, W.** (1996). Deleterious network hypothesis of Alzheimer' s disease. *Med Hypotheses.* 46(5): 421-8.
- Yung, Y., Dolgino, Y., Yao, Z., Rubinfeld, H., Michael, D., Hanoch, T., Roubini, E., Lando, Z., Zharhary, D., Seger, R.,** (1997). Detection of ERK activation by a novel monoclonal antibody. *FEBS Lett.* 408: 292-296.
- Zinsmaier, K.E., Hofbauer, A., Heimbeck, G., Pflugfelder, G.O., Buchner, S., Buchner, E.** (1990). A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of Drosophila. *J. Neurogenet.* 7: 15-29.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Stephan Schneuwly, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand. Seine Ideen, Anregungen und Aufmunterungen, sowie sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ohne die freundliche Überlassung des RasGAP Anikörpers und der cDNA Konstrukte durch David Hughes wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Ein besonderer Dank auch an ihn.

Ein Dankeschön geht außerdem an Jose für seine Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft. Doris danke ich für die Überlassung der *vap¹* Mutante sowie der EM-Aufnahmen und Ralf für die Hilfe bei meinen ersten Western Blot ‘Gehversuchen’.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls ein großes Dankeschön für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre. Besonders an Alois für die geduldige Beantwortung vieler Fragen, und an meine Laborkollegen Moni, Katharina und Christoph für den Spaß zwischen, während und nach den Experimenten.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an Sabine und Corinna, auf die ich mich bei allen Hochs und Tiefs verlassen konnte.

Tausend Dank an meine Familie:
meine Mutter Christine, Jochen, Petra und Ralph.
an meinen Vater Herbert, dem diese Arbeit gewidmet ist.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen und Abbildungen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder einer Prüfungsbehörde vorgelegt, noch veröffentlicht.

Regensburg, den 20.5.2003

Claudia Kiermayer