

Histologische und funktionelle Untersuchung des
swiss-cheese-Proteins und seines Orthologs aus
Vertebraten in transgenen *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

Maximilian Mühlig-Versen aus Regensburg

im Jahr 2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 28.06.2001

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Schneuwly

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Kramer

Prof. Dr. Schneuwly

Prof. Dr. Heinze

Prof. Dr. Dr. Kalbitzer

Für meine Mutter
Heidi Felicitas Mühlig-Versen

1	Einleitung	Seite 5
1.1	<u>Die <i>sws</i>-Mutation in <i>Drosophila melanogaster</i></u>	Seite 6
1.2	<u>Analyse des Maus-Orthologen (<i>mNTE</i>)</u>	Seite 9
1.3	<u>Das <i>NTE</i>-Protein in Vertebraten</u>	Seite 10
1.3.1	Die Inhibition von Serinesterasen durch Organophosphate.....	Seite 10
1.3.2	<i>NTE</i> als Auslöser für die Entwicklung von OPIDN.....	Seite 12
1.3.3	OPIDN und Waller´sche Degeneration.....	Seite 14
1.3.4	Waller´sche Degeneration und Gliazellen.....	Seite 15
1.3.5	Die <i>SWS/NTE</i> -Proteinfamilie.....	Seite 17
1.4	<u>Ziel der vorliegenden Arbeit</u>	Seite 20
2	Material und Methoden	Seite 22
2.1	<u>Verwendete Fliegenstämme, Antikörper und Kits</u>	Seite 22
2.1.1	Allgemeine Fliegenstämme.....	Seite 22
2.1.2	<i>sws</i> -Allele.....	Seite 22
2.1.3	Verwendete <i>Gal4</i> -Linien.....	Seite 23
2.1.4	Verwendete UAS-Linien.....	Seite 23
2.1.5	Verwendete Defizienzen.....	Seite 23
2.2	<u>Verwendete Antikörper</u>	Seite 24
2.2.1	Primäre Antikörper.....	Seite 24
2.2.2	Sekundäre Antikörper.....	Seite 24
2.3	<u>Kits</u>	Seite 24
2.4	<u>Verwendete Datenbankanalysen</u>	Seite 25
2.5	<u>Methoden</u>	Seite 25
2.5.1	Immunisierung und Zellkultur.....	Seite 25
2.5.1.1	DNA-Immunisierung einer Maus.....	Seite 25
2.5.1.2	Kulturbedingungen der Maushybridoma-Zellen.....	Seite 25
2.5.1.3	Kulturbedingungen der Schneider-Zellen.....	Seite 25
2.5.2	Rekombinante Expression von <i>SWS</i> -Protein in <i>E.coli</i>	Seite 26
2.5.3	Western Blot.....	Seite 26
2.5.3.1	Herstellung des Proteinextrakts aus <i>E.coli</i>	Seite 26
2.5.3.1.1	Extraktionspuffer für Gesamtprotein.....	Seite 26
2.5.3.1.2	Auftrennung des Proteinextrakts.....	Seite 26
2.5.3.1.3	Transfer der Proteine.....	Seite 26
2.5.3.1.4	Immunodetektion.....	Seite 26
2.5.4	Untersuchung der Membranzusammensetzung.....	Seite 27
2.5.4.1	Total-Lipidextraktion.....	Seite 26

2.5.4.2	Dünnschichtchromatographie.....	Seite 26
2.5.4.3	Membranextraktion für gaschromatographische Untersuchungen.....	Seite 26
2.5.5	Keimbahntransformation von <i>Drosophila melanogaster</i>	Seite 28
2.5.6	Histologische Präparate.....	Seite 28
2.5.6.1	Paraffinschnitte.....	Seite 28
2.5.6.2	Kryostatschnitte.....	Seite 28
2.5.6.3	Immunhistochemie an Kryostatschnitten.....	Seite 28
2.5.6.4	Semidünnschnitte.....	Seite 29
2.5.6.5	Ultradünnschnitte.....	Seite 29
2.5.6.6	Immunhistochemie an <i>Drosophila melanogaster</i> -Embryonen.....	Seite 29
2.5.6.7	DAPI-Färbungen an <i>Drosophila melanogaster</i> -Embryonen.....	Seite 29
2.5.6.8	Verwendete PCR-Protokolle.....	Seite 30
2.5.6.9	Sequenzierung.....	Seite 30
2.5.6.10	Verwendete Primer.....	Seite 30
2.5.7	Klonierung der cDNAs und Produktion der transgenen Linien.....	Seite 31
2.5.7.1	Das wildtypische <i>Drosophila melanogaster</i> <i>sws</i> -Konstrukt: <i>p{UAS-sws}</i>	Seite 31
2.5.7.2	Das wildtypische <i>Mus musculus</i> <i>sws</i> -Konstrukt: <i>p{UAS-m-nte}</i>	Seite 32
2.5.7.3	Das <i>Drosophila melanogaster</i> <i>sws</i> -Konstrukt ohne erste Transmembrandomäne: <i>p{UAS-sws-TM}</i>	Seite 32
2.5.7.4	Das <i>Drosophila melanogaster</i> <i>sws</i> -Konstrukt mit einer Serin/Aspartat-Substitution im aktiven Zentrum: <i>p{UAS-sws Ser985/Asp985}</i>	Seite 33
2.5.7.5	Das wildtypische <i>Drosophila melanogaster</i> <i>sws</i> -Konstrukt in Schneider-Zellen: <i>pMT-</i> <i>GH-ORF-V5</i>	Seite 34
2.5.7.6	Das <i>Drosophila melanogaster</i> <i>sws</i> -Konstrukt ohne erste Transmembrandomäne in Schneider-Zellen: <i>pGH-ORF(-TM)-V5</i>	Seite 34
2.5.7.7	<i>SWS/NTE</i> -Aktivitätsbestimmung (PV-Aktivität).....	Seite 35
3	Ergebnisse und Diskussion.....	Seite 36
3.1	<u>Der immunologische Nachweis des <i>SWS</i>-Proteins.....</u>	Seite 36
3.1.1	DNA-Immunisierung.....	Seite 36
3.1.2	Peptidimmunisierung.....	Seite 37
3.1.3	Produktion eines <i>SWS</i> -Fusionsproteins in Zellkulturen.....	Seite 38
3.2	<u>Funktionelle Untersuchung des <i>Drosophila-sws</i>-Konstrukts.....</u>	Seite 39
3.2.1	Untersuchung der Expression der <i>Drosophila</i> -cDNA (<i>p{UAS-sws}</i>) im <i>sws</i> ¹ - Hintergrund.....	Seite 39
3.2.1.1	Untersuchung der <i>elav</i> -getriebenen Expression der wildtypischen <i>Drosophila-sws</i> - cDNA im <i>sws</i> ¹ -Hintergrund: <i>sws</i> ¹ ; <i>p{UAS-sws}</i> ⁵ / <i>elav</i>	Seite 40
3.2.1.2	<i>loco</i> -getriebene Expression der wildtypischen <i>sws</i> -cDNA im <i>sws</i> ¹ -Hintergrund: <i>sws</i> ¹ ; <i>p{UAS-sws}</i> ⁵ / <i>loco</i>	Seite 44

3.2.1.3	Zusammenfassung: Analyse der induzierten Expression der <i>Drosophila-sws</i> -cDNA im <i>sws</i> ¹ -Hintergrund.....	Seite 46
3.2.2	Untersuchung der Überexpression der <i>Drosophila</i> -cDNA im wildtypischen Hintergrund.....	Seite 48
3.2.2.1	Untersuchung der <i>elav</i> -getriebenen Expression der <i>Drosophila</i> -cDNA im wildtypischen Hintergrund: <i>w; p{UAS-sws}¹⁰/elav</i>	Seite 48
3.2.2.2	Untersuchung der <i>loco</i> -getriebenen Expression der <i>Drosophila</i> -cDNA im wildtypischen Hintergrund: <i>w; p{UAS-sws}¹⁰/loco</i>	Seite 49
3.2.2.3	Zusammenfassung der Resultate der <i>sws</i> -cDNA-Expression im wildtypischen Hintergrund.....	Seite 52
3.3	<u>Funktionelle Untersuchung des <i>sws</i>-Orthologen der Maus: <i>m-nte</i>.....</u>	Seite 53
3.3.1	Untersuchung der <i>elav</i> -getriebenen Expression der Maus- <i>nte</i> -cDNA im <i>sws</i> ¹ -Hintergrund: <i>sws</i> ¹ ; <i>p{UAS-m-nte}¹³/II; elav/III</i>	Seite 53
3.3.2	Untersuchung der <i>loco</i> -getriebenen Expression der <i>m-nte</i> -cDNA im <i>sws</i> ¹ -Hintergrund <i>sws</i> ¹ ; <i>p{UAS-m-nte}¹³/II; loco/III</i>	Seite 55
3.3.3	Untersuchung der <i>elav</i> -getriebenen Expression der <i>m-nte</i> -cDNA im wildtypischen Hintergrund: <i>w; p{UAS-m-nte}¹³/II; elav/III</i>	Seite 57
3.3.4	Untersuchung der <i>loco</i> -getriebenen Expression der <i>m-nte</i> -cDNA im wildtypischen Hintergrund: <i>w; p{UAS-m-nte}¹³/II; loco/III</i>	Seite 58
3.3.5	Zusammenfassung der Expressionsanalysen der Maus- <i>nte</i> -cDNA.....	Seite 59
3.4	<u>Expressionsanalysen der <i>Drosophila</i>-cDNA ohne erste Transmembrandomäne: <i>p{UAS-sws-TM}¹⁷</i>.....</u>	Seite 62
3.4.1	Analyse der neuronalen Expression im <i>sws</i> ¹ -Hintergrund unter Kontrolle des <i>elav</i> -Treibers: <i>sws</i> ¹ ; <i>p{UAS-sws-TM}¹⁷/elav</i>	Seite 63
3.4.2	Untersuchung der Überexpression des cDNA-Konstrukts ohne erste Transmembrandomäne im wildtypischen Hintergrund.....	Seite 65
3.4.2.1	Analyse der neuronalen Expression im wildtypischen Hintergrund unter Kontrolle des <i>elav</i> -Treibers: <i>w; p{UAS-sws-TM}¹⁷/elav</i>	Seite 65
3.4.2.2	Analyse der glialen Expression im wildtypischen Hintergrund unter Kontrolle des <i>loco</i> -Treibers: <i>w; p{UAS-sws-TM}¹⁷/loco</i>	Seite 67
3.4.3	Zusammenfassende Diskussion der Expressionsanalysen des <i>p{UAS-sws-TM}¹⁷</i> -Konstrukts.....	Seite 68
3.4.4	Die Stellung der zweiten Transmembrandomäne innerhalb des SWS-Proteins.....	Seite 71
3.5	<u>Die Rolle des <i>Serins</i> im aktiven Zentrum der Esterase.....</u>	Seite 77
3.5.1	Zusammenfassung der PV-Aktivitätsmessung der Expression des <i>p{UAS-sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}</i> -Konstrukts.....	Seite 78
3.5.2	Ektopische Expression des <i>p{UAS-sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}</i> Konstrukts unter Kontrolle der <i>elav</i> -, <i>loco</i> - und <i>actin</i> -Treiber im <i>sws</i> ¹ -Hintergrund.....	Seite 79
3.5.3	Ektopische Expression des <i>p{UAS-sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}</i> Konstrukts unter Kontrolle der <i>elav</i> -, <i>loco</i> - und <i>actin</i> -Treiber im wildtypischen Hintergrund.....	Seite 80
3.5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>p{UAS-sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}</i> -Expression...	Seite 82
3.6	<u>Ergebnisse der Untersuchungen des Lipidhaushalts von <i>swiss-cheese</i>-Fliegen: Spielt SWS eine Rolle im Membran-Metabolismus?.....</u>	Seite 82
3.6.1	Dünnschichtchromatographie.....	Seite 83
3.6.2	Gaschromatographische Untersuchung der Neutrallipide.....	Seite 84
3.7	<u>Analyse der Defizienzkreuzungen 61A1-100F5.....</u>	Seite 86

3.8	<u>Untersuchung von potentiellen Entwicklungsdefekten an <i>sws</i>¹-Embryonen</u>	Seite 88
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	Seite 91
5	Anhang.....	Seite 94
5.1	<u>Sequenz des wildtypischen <i>Drososophila melanogaster sws</i>-Gens</u>	Seite 94
5.2	<u>Sequenz des wildtypischen <i>Drososophila melanogaster SWS</i>-Proteins</u> ..	Seite 96
6	Literaturverzeichnis.....	Seite 97
7	Danksagung.....	Seite 104

1 Einleitung

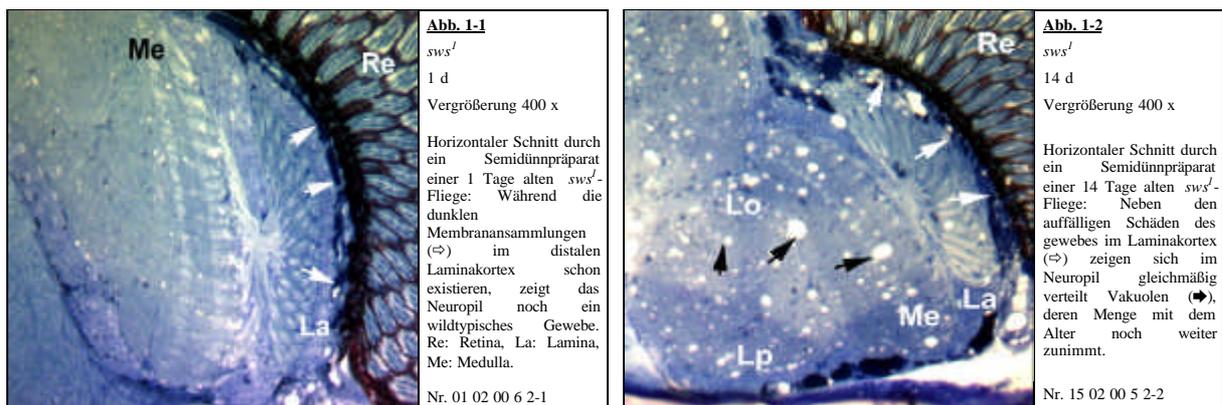
Die molekularen Mechanismen der neuropathologischen Erkrankungen, ihre sozialen und klinischen Implikationen sind in den letzten Jahren zunehmend in das Interesse der Öffentlichkeit gerückt. Im Zeitraum von 1980 bis 2000 hat sich die Anzahl der jährlich veröffentlichten wissenschaftlichen Artikel zu diesem Themengebiet verzwanzigfacht. Sowohl eine Reihe von spektakulären Durchbrüchen in der Ergründung pathogener Mechanismen einzelner Krankheiten, wie der Gruppe der Prionenerkrankungen (Prusiner, 1998), als auch die demographische Entwicklung unserer Gesellschaft und die damit einhergehende Zunahme einer Reihe seniler Demenzen (Forstl, 1998), hat zu dieser Entwicklung beigetragen. Das Risiko für die Entwicklung einer Demenz im Alter zwischen 65 und 100 Jahren beträgt 33% für Männer und 45% für Frauen (Bancher et al., 1998). Doch es ist nicht nur die Alterungsdynamik unserer westlichen Gesellschaft, die uns dazu zwingt, enorme Kosten bei der Erforschung der molekularen Grundlagen neurologischer Fehlfunktionen in Kauf zu nehmen. Das Auftreten neurodegenerativer Demenzen hat nur zum Teil seine Ursache in einer alterungsbedingten Störanfälligkeit der molekularen und genetischen Regelungsmechanismen. Die Menschheit setzt sich selbst durch die Freisetzung einer Vielzahl von neurotoxischen Substanzen, die in ihrer funktionellen Vielfalt und in ihren weitgehend unbekanntem Interaktionsmöglichkeiten nur eingeschränkt vorhersagbar sind, einer nicht unerheblichen Gefährdung aus. Alleine die vom Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG) im Zeitraum von 1991-1995 angezeigten Fälle von Berufskrankheiten, bei denen neurotoxische Substanzen an der Entstehung von Neuropathien oder Encephalopathien ursächlich beteiligt sein könnten, umfassen 10.040 Arbeitsunfälle (Triebig und Lang, 1993). Die Aufklärung der molekularen und physiologischen Mechanismen, die derartigen neurologischen Fehlfunktionen zugrunde liegen, ermöglicht eine genauere Einschätzung der Risiken, welche die Freisetzung von neurotoxischen Substanzen für Mensch und Umwelt beherbergen. Und schließlich ermöglicht der Einblick in die Wirkungsmechanismen nervöser Schädigungen zentrale Fortschritte bei der Behandlung von Erkrankungen des Nervensystems und der Rehabilitation betroffener Mitmenschen.

In der vorliegenden Arbeit wird die neurodegenerative Mutante *swiss-cheese (sws)* in *Drosophila melanogaster* untersucht (Kretschmar et al., 1997), die mit fortschreitendem Alter ein zunehmendes Ausmaß an zentralnervösen Schädigungen der Neuronen und der Gliazellen zeigt. Das humane Ortholog, die *neuropathy target esterase (NTE)*, ist der medizinischen Forschung als Zielprotein einer organophosphat-induzierten Polyneuropathie schon seit dreißig Jahren bekannt (Johnson, 1969). Ihre Inhibition gilt, neben der Blockade der Acetylcholinesterase, als eine der häufigsten Ursachen organophosphat-induzierter Neuropathien.

1.1 Die *sws*-Mutation in *Drosophila melanogaster*

Die X-chromosomale Mutante *sws* in *Drosophila melanogaster* wurde aus einem Screen nach Mutanten mit anatomischen Defekten im adulten Gehirn isoliert (Heisenberg und Böhl 1979). Das für diesen Phänotyp verantwortliche Gen wurde kloniert, sequenziert und die mutanten Allele identifiziert (Kretzschmar et al., 1997). Die bereits vorausgegangenen Arbeiten werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Fliegen der *sws*-Linie zeigen eine auffällige Vakuolenbildung im gesamten Gehirn, deren zeitlich progressiver Charakter eindeutig in mit Toluidinblau gefärbten Eponschnitten zu sehen ist.



Die Vakuolisierung erstreckt sich über das gesamte Gehirn; es handelt sich hier deshalb um einen generellen, neurodegenerativen Phänotyp. Neben der Bildung von Vakuolen im Neuropil sind die im Kortex (und hier besonders im distalen Laminakortex) dunkelblau angefärbten Strukturen für die Mutation des *sws*-Gens charakteristisch (Abb. 1-1, Abb. 1-2. ⇨). Während die Vakuolen sich erst im adulten Gehirn zu bilden beginnen (Abb. 1-2, ⇨), sind diese Akkumulationen zwischen der Retina und Lamina schon am Ende der Pupalentwicklung sichtbar. Da diese Strukturen (⇨) wahrscheinlich aus Gliazellen entstehen, liegt es nahe, dem *sws*-Gen eine noch nicht näher definierte Funktion in der Differenzierung der Gliazellen zuzuweisen (Kretzschmar et al., 1997). Da die neuronalen Strukturen des frisch geschlüpften Imagos keine sichtbaren Schädigungen aufweisen, liegt vermutlich keine vitale Rolle des *sws*-Gens in der Neurogenese vor (Abb. 1-1).

Die Analyse der räumlichen Verteilung des *sws*-Transkripts wurde durch *in situ*-Hybridisierungen an Gefrierschnitten von wildtypischen *Drosophila*-Gehirnen durchgeführt. Diese zeigen eine Detektion der mRNA innerhalb des gesamten Kortex und legen damit eine Expression in den kortikalen, neuronalen Zellkörpern nahe (Abb. 1-3). In diesen Experimenten gibt es keinen eindeutigen Hinweis auf eine Expression des *sws*-Gens in Gliazellen, sie kann aber aufgrund der Ergebnisse auch nicht ausgeschlossen werden (Kretzschmar et al., 1997).

Untersuchungen zur Art des Zelltodes in *sws*-Fliegen anhand von TUNEL-Färbungen zeigten in 20 Tage alten Individuen eine deutliche Färbung des Kortex und hiermit einen Hinweis auf das ausgedehnte Auftreten von apoptotischem Zelltod der kortikalen Zellkörper in *sws*-Fliegen.

Die Tatsache, daß Gliazellen durch die Mutationen des *sws*-Gens Schaden erleiden und absterben kann in *lacZ*-Färbungen an gealterten Fliegen der Enhancer-Trap-Linie *rC56* im *sws*-Hintergrund gesehen werden. Mit Hilfe dieser Linie können spezifisch Gliazellen durch die Expression von β -Galaktosidase detektiert werden (Abb. 1-4). Die deutliche Abnahme der markierten Gliazellen im *sws/rC56*-Hintergrund ist ein Indikator für das Absterben der Gliazellpopulationen in *sws*-Fliegen (Abb. 1-5).

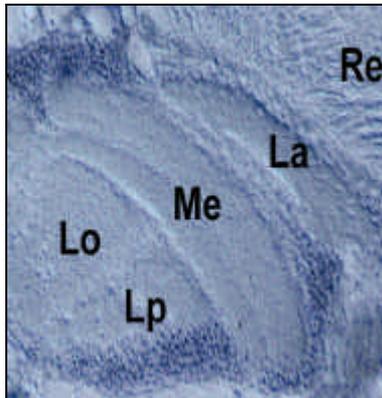


Abb. 1-3 *Canton^S* 14 d
in situ-Hybridisierungen mit *sws*-mRNA an horizontalem Gefrierschnitt: Das *sws*-Transkript läßt sich im gesamten Kortex nachweisen. Re: Retina, La: Lamina, Md: Medulla, Lb: Lobula, Lp: Lobulaplatte.
 Vergrößerung 600 x

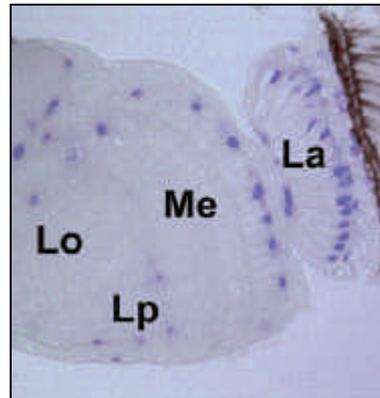


Abb. 1-4 *w/rC56* 10 d
LacZ-Färbung eines Horizontalschnittes einer *w/rC56*-Fliege: Die β -Galactosidase-Aktivität des *rC56*-Hintergrunds zeigt die Lokalisation von Gliazellen an.
 Vergrößerung 400 x

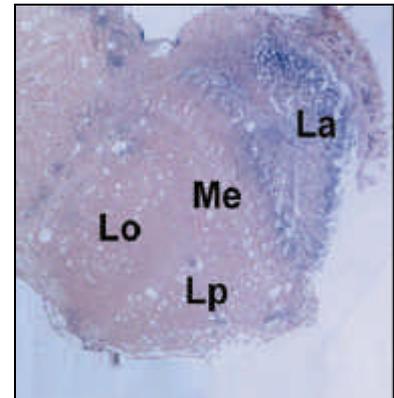
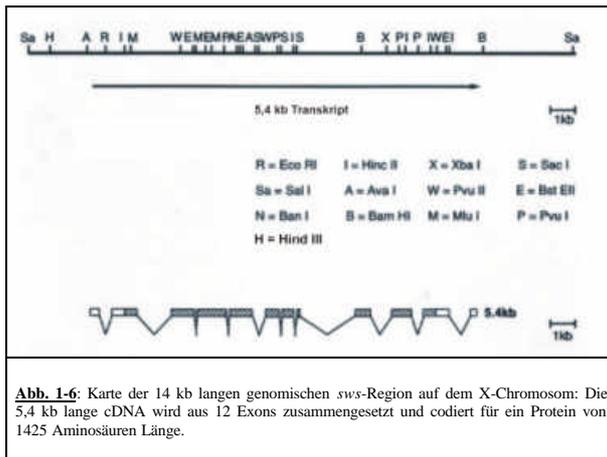


Abb. 1-5 *sws¹/rC56* 14 d
LacZ-Färbung eines Horizontalschnittes einer *sws¹/rC56*-Fliege: Die *LacZ*-Färbung der Gliazellen ist nahezu vollständig verschwunden und impliziert eine gliale Degeneration der *sws¹*-Fliegen.
 Vergrößerung 400 x

Es kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob dieser gliale Zelltod in der *sws*-Mutation *primärer* Natur ist, oder ob er den Schädigungen der Neuronen als *sekundärer* Prozess folgt.

Die progressive Degeneration von Gliazellen und Neuronen in *sws*-Fliegen manifestiert sich auch in einer stark verkürzten durchschnittlichen Lebensspanne. Während in einer wildtypischen Kontrollpopulation 50 % aller Individuen nach 15 Tagen sterben ($t_{1/2} = \sim 15$), so zeigt eine Population von *sws*-Fliegen eine durchschnittliche Überlebensdauer der Hälfte der Population von $t_{1/2} = \sim 6-9$ (Kretzschmar et al., 1997). Mosaik-Analysen von Gynandromorphen, daß heißt von Fliegen, die sowohl aus weiblichen und daher für die X-chromosomale *sws*-Mutation heterozygoten Zellen, als auch aus hemizygoten männlichen Zellen (Hotta und Benzer, 1972) bestehen, zeigten, daß der *sws*-Phänotyp auf hemizygoten Bereiche beschränkt ist und daher das *SWS*-Protein keiner weitreichenden Diffusion unterliegt, sondern vermutlich zellulär gebunden ist.

Durch Defizienzanalysen wurde die zytologische Position des *sws*-Gens ursprünglich auf den Bereich 7D1-7D5 des X-Chromosoms festgelegt. Durch die Revertierung des mutanten Phänotyps mit der Duplikation *Dp(1;3)sn13a1* konnte der Bereich des *sws*-Gens weiter auf die zytologische Position 7D1 eingengt werden. Ein 14 kb langes genomisches Fragment dieser Region rettete, als p-Element-Transformation in *sws*-Fliegen eingebracht, den Phänotyp aller untersuchten *sws*-Allele (Kretzschmar 1997).



Die *sws*-Transkriptionseinheit besteht aus 12 Exons, die zu einer mRNA von 5360 bp zusammen gefügt werden. Der offene Leserahmen beträgt 4274 bp. Von den ursprünglich sechs vorhandenen *sws*-Allelen wurden drei (*sws*¹, *sws*⁵ und *sws*⁴) Allele sequenziert und die ihnen zu Grunde liegenden Mutationen dokumentiert (Kretzschmar et al., 1997).

Das Allel *sws*¹ entsteht durch eine C/A Substitution an Position bp 1124 des ORFs, wodurch sich anstatt des Codons für ein Serin (TCG) ein *amber*-Stop-Codon (TAG) ergibt. Hierdurch bricht die Translation nach dem Valin³⁷⁴ ab.

Eine G/A Substitution an Position 1942 ist für das Allel *sws*⁵ verantwortlich und führt zu einem Arginin⁶⁴⁸ (AGG) anstelle eines Glycins⁶⁴⁸ (GGG).

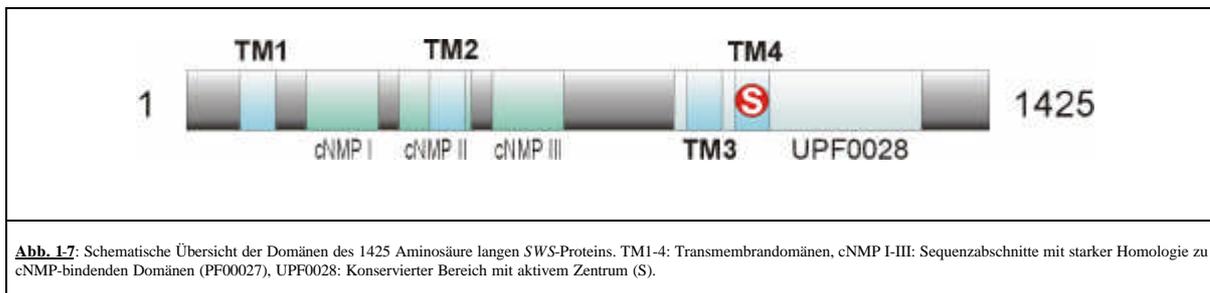
Das Allel *sws*⁴ besitzt aufgrund eines G/A Austauschs an Position bp 2877 anstelle des Glycins⁹⁵⁶ (GGC) ein Aspartat⁹⁵⁶ (GAC).

Das vorhergesagte Protein ist 1425 Aminosäuren lang und besitzt eine errechnete molekulare Masse von 160 kDa. Hydrophobizitätsanalysen zeigen die Anwesenheit von vier Transmembrandomänen (TM1-TM4) auf (Siehe Kapitel 3.4.4). Die Sequenz G-X-S-X-G von Glycin⁹⁸³ bis Glycin⁹⁸⁷ ist als Konsensussequenz der Serin-Esterasen beschrieben. Diese Sequenz stellt das aktive Zentrum dieser Enzymklasse dar und liegt am N-terminalen Ende eines hochkonservierten Proteinmotivs (UPF0028) unbekannter Funktion (L⁹²⁹ bis R¹²⁴⁸) innerhalb der vierten Transmembrandomäne.

Den stärksten Transmembrancharakter ordnen alle verwendeten Transmembrandomänen-Analyse-Programme (TSEG, TopPred2, Split, TMpred) der N-Terminalen TM1 (V³⁵ bis F⁵⁵) zu. Zwischen der ersten und der dritten Transmembrandomäne liegen ein 128 (R¹²⁷ bis N²²⁵) und ein 28 Aminosäuren (V⁵⁵³ bis S⁵⁷⁶) langer Bereich mit 21%, beziehungsweise 39 % Identität zur regulatorischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase Typ α (RI α). Der erste Bereich besitzt in dem Sequenzabschnitt I¹²⁹ bis Y¹⁵⁰ eine Konsensussequenz für die Interaktionsdomäne zwischen der regulatorischen und der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase. Der Sequenzabschnitt V⁵⁵³ bis S⁵⁷⁶ stellt eine konservierte Sequenz für die cAMP-Bindung der regulatorischen Untereinheit dar (Kretzschmar et al., 1997).

Neuere Datenbankanalysen (Pfam 6.1) postulieren neben den eben dargelegten Ergebnissen weitere Sequenzbereiche, die starke Homologien zu cNMP-Bindungsdomänen aufweisen. Es handelt sich hierbei um weite Bereiche der N-terminalen Hälfte des Proteins: Von H¹⁸⁹ bis V²⁹⁰ ($E = 1,2 \times 10^{-10}$), von E⁴⁹⁴ bis R⁵⁹⁷ ($E = 3,3 \times 10^{-8}$) und von Y⁶¹⁹ bis I⁷¹³ ($E = 3,9 \times 10^{-23}$). Die zu Grunde liegende

Konsensussequenz PF00027 stellt eine funktionelle Domäne einer neuen Familie von cNMP gesteuerten Kanälen dar (Yau, 1994).



1.2 Analyse des Maus-Orthologen (*mNTE*)

Mit Hilfe der Sequenzinformation des *sws*-Gens aus *Drosophila melanogaster* wurde das Maus-Orthologe (*mNTE*) aus einer cDNA-Bank isoliert und sequenziert (Moser et al., 2000). Mit einer Identität von 48% und einer Ähnlichkeit von 63% auf Ebene der Proteinsequenz zeigt sich deutlich der hohe Konservierungsgrad der Genprodukte aus Maus und *Drosophila*. Dies wird noch deutlicher, betrachtet man einzelne Domänen. So besteht zum Beispiel zwischen der UPF0028-Domäne von *Drosophila melanogaster* und der der Maus eine Identität von 57 % und eine Ähnlichkeit von 75 %.

Die Hydrophobizitätsanalyse ergab für das 1327 Aminosäuren lange Protein ebenso wie für *Drosophila sws* die Vorhersage von vier Transmembrandomänen, wovon die Dritte und die Vierte eng beisammen liegen (V⁹²⁵ bis C⁹⁴³ und G⁹⁵⁶ bis A⁹⁷⁶) und sich in der vierten Transmembrandomäne die Konsensussequenz des aktiven Zentrums der Serinesterase befindet (Moser et al., 2000).

Die Expressionsanalysen durch *in situ*-Hybridisierungen an Gefrierschnitten des Gehirns von Mäusen oder an Ganzkörpersektionen von Mäuse-Embryonen, zeigen eine weit verbreitete Expression mit einem deutlichen Entwicklungsprofil. Die ersten Signale der *NTE* mRNA sind in den Cranial- und Spinalganglien am Tag 11 p.c. zu sehen. Spätere Expression zeigt sich ab 13 p.c. im Mesonephros, im Darmepithelium und in den Epithelien des olfaktorischen Systems, sowie im Rachen- und im Luftröhrenepithel. Post natale *in situ*-Hybridisierungen weisen Expression im gesamten Gehirn nach, die im weiteren Verlauf der Ontogenese abnimmt und im Adulten auf eine Restexpression in großen Neuronen des Kortex, des Riechkolbens, des Thalamus und des Hypothalamus, sowie der Medulla oblongata reduziert ist. Persistierende starke Färbung besteht auch im adulten Tier in den Pyramidalneuronen und in den Purkinje-Zellen des Cerebellums.

1.3 Das NTE-Protein in Vertebraten

Mit der Sequenzierung der cDNA der *neuropathy target esterase NTE* wurde der Gruppe der homologen Gene, die bis dahin ohne eine bekannte Funktion lediglich Vorhersagen aufgrund von Sequenzvergleichen erlaubten, ein Enzym hinzugefügt, welches in den letzten 30 Jahren eingehend untersucht wurde. Ein Großteil dieser Erkenntnisse stammt aus der klinischen Forschung, da *NTE* als Mitglied der Proteinfamilie der Serin-Esterasen durch organische Phosphorsäureester zu inhibieren ist. Seit dem industriellen Einsatz dieser Stoffklasse wurde *NTE* in die Aufklärung von pathologischen Mechanismen mit einbezogen (Johnson 1982, Jamal 1997). Den entsprechenden Genprodukten von *Drosophila melanogaster*, Maus, *C.elegans*, *S. cerevisiae* und vielen weiteren orthologen Mitgliedern dieser Genfamilie wurde damit ein funktioneller Kontext zugewiesen, der sich durch eine Vielzahl physiologischer, biochemischer und klinischer Daten auszeichnet (Lush et al., 1998).

1.3.1 Die Inhibition von Serinesterasen durch Organophosphate

In der unübersehbaren Menge anthropogener Stoffe, die seit dem Beginn der industriellen Revolution in großem Maßstab produziert und freigesetzt werden, nimmt die Stoffklasse der Organophosphate eine herausragende Stellung ein. Seit der ersten Organophosphat-Synthese durch Clermont im Jahr 1854 wurden über 20.000 neuartige Verbindungen dieser Substanzklasse hergestellt und in den verschiedensten Bereichen der industriellen Fertigung und des täglichen Lebens eingesetzt (Edmunson, 1988). Doch erst seit Beschreibung ihrer insektiziden Wirkung durch Schrader 1937 wurden sie in der industriellen Landwirtschaft, durch ihre toxischen Wirkungen auf den Menschen aber auch seit dem 2. Weltkrieg in Form von Kampfgasen zur Vernichtung menschlichen Lebens, eingesetzt. Die hohe Säugetiertoxizität von Verbindungen wie Tabun, Sarin oder VX führen zu der ungebrochenen militärischen Bedeutung dieser Substanzklasse (Marrs et al., 1996).

Die Anzahl der akuten Vergiftungen durch Unfälle mit Organophosphaten weltweit wird auf über drei Millionen Fälle geschätzt, worunter jährlich ungefähr 220.000 Todesfälle zu verzeichnen sind (Rosenstock et al., 1991). Eine exakte Einschätzung des Schadens und die pathologische Bewertung wird jedoch durch mangelhafte Dokumentation der vielen subklinischen Fälle und der hohen individuellen Schwankung der Empfindlichkeit eines Geschädigten erschwert.

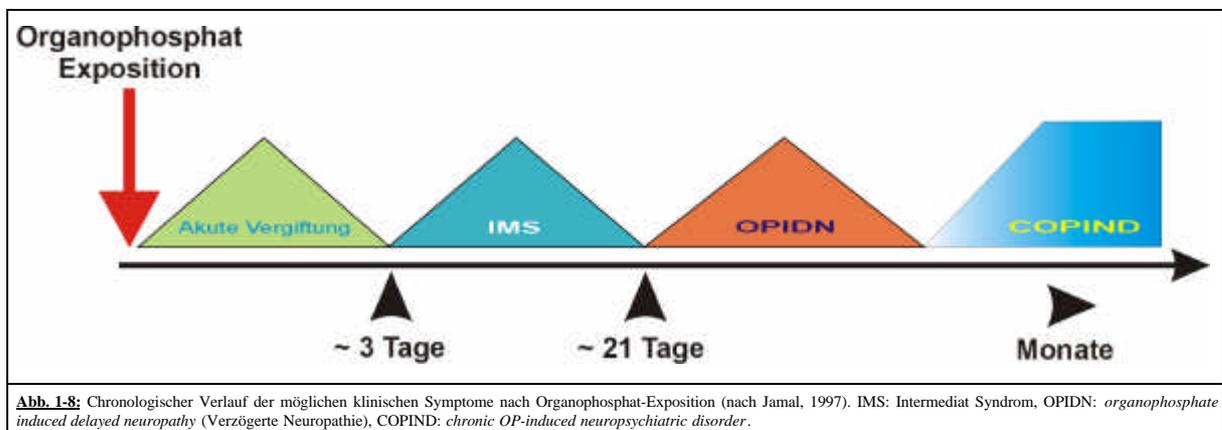
Da die meisten klinischen Fälle auf eine Inhibition des an der Übertragung von Nervenimpulsen beteiligten Enzyms Acetylcholin-Esterase (AChE) zurückzuführen sind, stellt dieses System das am besten verstandene Modell für die Inhibition einer Esterase dar. Da jedoch auch andere Esterasen in verschiedenem Ausmaß inhibiert werden, ergibt sich oft ein klinischer Mischtyp, der theoretisch in vier Phasen eingeteilt werden kann und in Abb. 1-8 graphisch dargestellt ist (Jamal, 1997).

Eine Inhibition der AChE führt zu einer Überstimulation der nikotinischen und muskarinischen Synapsen des peripheren und zentralen Nervensystems durch Akkumulation des Neurotransmitters im synaptischen Spalt und zeitlich verzögert zu einem Zusammenbruch der Nervenübertragung (Taylor,

1980). Die klinischen Zeichen beginnen meist 12-24 Stunden nach Exposition und können mehrere Tage oder (aufgrund der guten Lipid-Löslichkeit von Organophosphaten) auch Wochen andauern (**Akute Vergiftung**). Die durch die Inhibition der AchE hervorgerufene Neuropathie umfasst Muskellähmungen, Magen- und Verdauungsstörungen bis hin zum Atemstillstand und Kreislaufkollaps (Ecobichon, 1991).

Eine als **Intermediat Syndrom** (IMS) bezeichnete klinische Manifestation beschreibt cholinerge Effekte, die nach oder *ohne* eine akute Vergiftung auftreten. Kennzeichnend ist eine lebensbedrohliche Muskelschwäche, die insbesondere die Nacken- und Atemmuskulatur betrifft (Karalliedde, 1993). IMS folgt möglicherweise einem anderen, bislang völlig unbekanntem pathophysiologischen Mechanismus wie die *Akute Neurotoxizität* (Jamal 1995, Senanayake 1887).

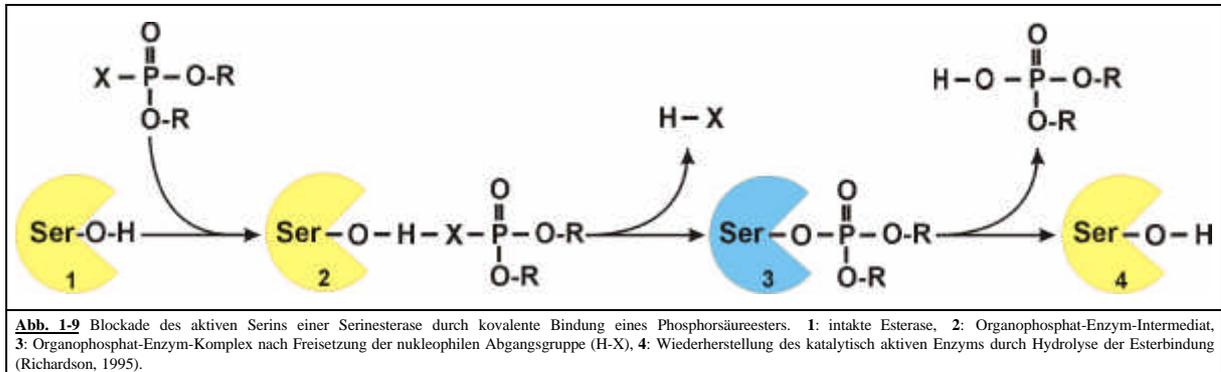
Eine Anzahl von Organophosphaten mit spezifischen, chemischen Eigenschaften (siehe Kapitel 1.3.2) führt zu einer peripheren Neuropathie distaler sensorischer und motorischer Nervenfasern zwei bis drei Wochen nach der Intoxikation. Dieses als **organophosphate induced delayed neuropathy** (OPIDN) bezeichnete Phänomen ist nicht auf eine Inhibition der AChE zurück zu führen (Marrs, 1993; Jamal, 1995; Davis et al., 1980). OPIDN beginnt mit einer Muskelschwäche der Extremitäten. Nach der Entwicklung einer schlaffen Lähmung folgen aufgrund der Degeneration von Pyramidenbahnneuronen Spastizität und Ataxie. Bei Beeinflussung zentralnervöser Bahnen ist Reversibilität der Neuropathie meist nicht gegeben und es verbleiben Koordinationsstörungen und verminderte mentale Leistungen (Triebig, 1990).



Es gibt darüber hinaus vermehrt Hinweise darauf, daß langanhaltende Exposition gegenüber Organophosphaten oder akute Intoxikation zu einer chronischen Spätsymptomatik führt, die mit Beeinträchtigungen der neuromuskulären Funktionen, kognitiven Einschränkungen und Verhaltensänderungen einhergeht (Steenland, 1996). Dieses als „**chronic OP induced neuropsychiatric disorder**“ (COPIND) benannte Syndrom wird ebenso wie IMS nicht auf eine Inhibition der AchE oder der NTE zurück geführt (Jamal 1995).

Die physiologisch wirksame Gruppe der organischen Phosphorverbindungen sind Ester, Amide oder Schwefelderivate der Phosphorsäure und werden unter dem Begriff „Organophosphate“

zusammengefasst. Sie sind lipophil und aufgrund der geringen Elektronendichte des Phosphors reaktive Elektrophile, die insbesondere mit den nukleophilen Serinresten von Proteinen durch Umesterung und Abspaltung einer nukleophilen Abgangsgruppe eine Verbindung eingehen (Abb. 1-9, (2)).



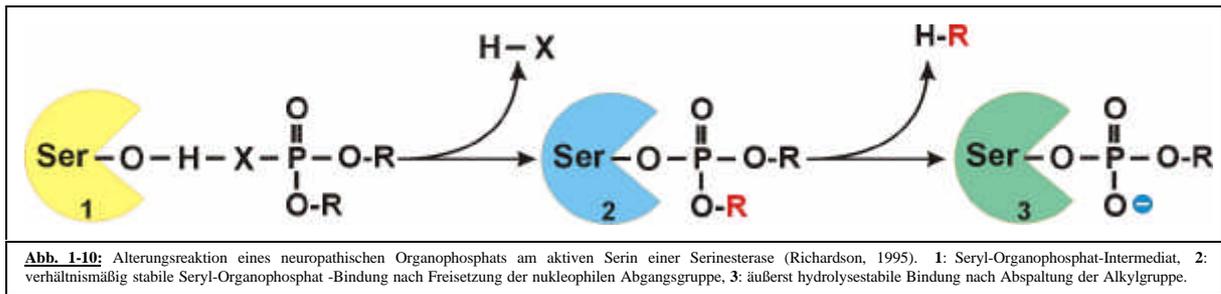
Dieses phosphorylierte Enzym (3) ist um mehrere Größenordnungen hydrolysestabiler als das natürliche Acyl-Enzym-Intermediat, so daß diese neue Bindung das aktive Zentrum einer Serinesterase möglicherweise wochenlang inhibieren kann.

1.3.2 NTE als Auslöser für die Entwicklung von OPIDN

Mitten in der amerikanischen Prohibitionszeit, in den Jahren 1929 und 1930, kam es zu einer Massenvergiftung, als über 20.000 Menschen ein alkoholisches Getränk („Jamaica Ginger“) konsumierten, das tri-ortho-Kresylphosphat (TOPC) enthielt. Die beschriebenen Neuropathien manifestierten sich klinisch erst Wochen nach der Aufnahme von TOPC. Seitdem wurden 40.000 Fälle dieser Art der verzögerten Neuropathie (OPIDN) beschrieben (Abou Donia und Lapadula, 1990) und mehrfach kam es seitdem auch wieder zu Massenvergiftungen durch Lebensmittel, die mit Organophosphaten kontaminiert waren.

Erst 1969 wurde *NTE* als molekularer Angriffspunkt der Entstehung von OPIDN definiert und konnte als ^{35}P *di-isopropyl-fluoro-Phosphat* (DFP) markiertes Protein in Mikrosomen eines Gehirnhomogenats nachgewiesen werden (Johnson, 1969). Durch ein kolorimetrisches Nachweisverfahren mit dem artifiziellen Substrat Phenyl-Valerat konnte das Vorkommen von *NTE* in verschiedenen Geweben von Hühnern belegt und quantifiziert werden (Johnson, 1977).

Doch nicht alle Organophosphate, die eine Serinesterase inhibieren können, sind Auslöser für OPIDN. Neben OPIDN auslösenden „neuropathischen Organophosphaten“ existieren sogenannte „nicht-neuropathische Organophosphate“. Diese inhibieren die *NTE*-Enzymaktivität vollständig, führen aber nicht zur Manifestation von OPIDN (Johnson, 1974, Meredith et al., 1988).



Neuropathische Organophosphate durchlaufen nach der Bildung des Serylesters (Abb. 1-10, (2)) eine weitere Reaktion: Sie können eine ihrer zwei Alkylgruppen abspalten und hinterlassen so im aktiven Zentrum einen negativ geladenen Phosphorylrest (3). Die Hydrolyserate dieses mono-organo-Phosphorylrests ist um mehrere Größenordnungen verringert. Dieser Prozess wird als „Alterung“ bezeichnet und ist Voraussetzung für das Entstehen einer OPIDN (Johnson, 1974). Die abgespaltene Alkylgruppe mancher neuropathischer Organophosphate wird nicht in die Lösung abgegeben, sondern erfährt eine intramolekulare Umsetzung (Clothier und Johnson, 1979). In der *NTE* des Huhns wurde durch Vergiftung mit 3H-Isopropyl-markiertem DFP das Asp¹⁰⁴⁴ als Zielaminosäure dieser intramolekularen Umsetzung identifiziert (Glynn, 2000). Da die bloße Inhibition des aktiven Zentrums der *NTE* durch ein nicht-neuropathisches Organophosphat keine pathologischen Folgen hat, liegt der Grund für die Auslösung einer OPIDN möglicherweise in der Veränderung einer Domäne außerhalb des aktiven Zentrums („nicht-Esterase-Funktion“) oder in einem toxischen Funktionsgewinn eines normalerweise im adulten Tier „stillgelegten“ Mechanismus durch die negative Ladung im aktiven Zentrum (Glynn, 2000).

Die Versuche das *NTE*-Enzym zu isolieren waren lange Zeit nicht erfolgreich, da zwei Faktoren eine Aufreinigung behinderten. Erstens ist die Konzentration des *NTE*-Enzyms in Gehirnhomogenaten sehr gering und selbst in angereicherten Mikrosomenfraktionen beträgt sie weniger als 0,1% des mikrosomalen Gesamtproteins (Williams und Johnson, 1981). Zweitens verliert das Enzym seine Aktivität, sobald es aus der Membran isoliert wird und ist damit einem Nachweis nicht mehr zugänglich (Pope und Padilla, 1989). Aber auch darüber hinaus verfestigte sich schon vor der Klonierung des Gens der Verdacht, daß es sich bei *NTE* um ein integrales Membranprotein handeln muß. Letztendlich hat erst die Synthese des künstlichen spezifischen Substrats S9B (*Saligenin-cyclophospho-9-biotinyl-diamino-nonan*) zu einer Aufreinigung des Proteins aus Gehirnmembranfraktionen und zum Nachweis seiner Membranlokalisation geführt (Glynn et al., 1994).

Mit Hilfe der hiermit zum ersten Mal zugänglichen Information über die Abfolge der Aminosäuren konnten Antikörper gegen das *NTE*-Protein generiert und immunhistologisch eingesetzt werden (Glynn, 1997).

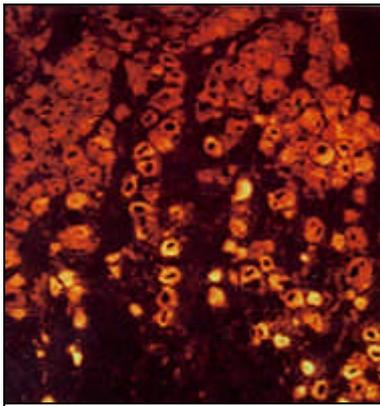


Abb. 1-11: *NTE*-Antikörperfärbung am zentralen Nervensystem des Huhns: Immunoreaktivität in den sensorischen Neuronen der Spinalganglien

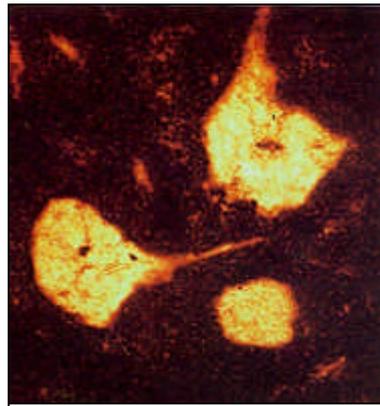


Abb. 1-12: *NTE*-Antikörperfärbung am zentralen Nervensystem des Huhns: Große Neuronen im Cerebellum.

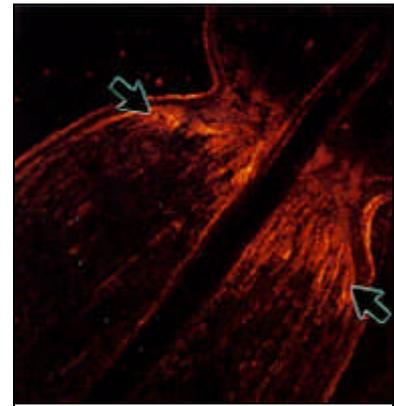


Abb. 1-13: *NTE*-Antikörperfärbung am peripheren Nervensystem des Huhns: Akkumulation immunoreaktiven Materials proximal zu einer Ligatur des Ischiasnerven.

Immunhistochemische Untersuchungen der Verteilung des *NTE*-Enzyms in Gewebepräparationen des Gehirns von Hühnern zeigen ein hohes Vorkommen des Enzyms, insbesondere in den Purkinje Zellen, den Spinalganglien (Abb. 1-11), im Kortex und im optischen Tektum des zentralen Nervensystems. Das Protein ist im Zytoplasma des Zellkörpers detektierbar, nicht jedoch im Zellkern (Abb. 1-11, 1-12). In den Axonen ist das *NTE*-Protein immunhistochemisch nur proximal und distal einer Ligatur (Abb. 1-13), vermutlich aufgrund von Akkumulationsprozessen, nachzuweisen (Glynn, 1997). Hier scheint das Protein mit axonalen Mikrosomen assoziiert zu sein und wird mit dem schnellen axonalen Transport sowohl anterograd als auch retrograd transportiert (Glynn, 1997; Carrington, 1985). Untersuchungen der Aktivitätsverteilungen des *NTE*-Enzyms haben einen proximo-distalen Gradienten entlang des Ischiasnervs des Huhns mit den Verhältnissen 25:5:1 ergeben. In allen bislang untersuchten Spezies konnte die höchste *NTE*-Aktivität im Gehirn, gefolgt vom Rückenmark, nachgewiesen werden. Eine Immunoreaktivität in Gliazellen der untersuchten Individuen konnte nicht nachgewiesen werden (Glynn, 1997). In nicht-neuronalen Geweben ist eine *NTE*-Aktivität in den Lymphozyten, in der Plazenta und im Hoden nachweisbar (Moretto und Lotti, 1988).

1.3.3 OPIDN und Waller'sche Degeneration

Ultrastrukturelle Studien zum zeitlichen Verlauf einer verzögerten Neuropathie durch Inhibition von *NTE* in Katzen mit *Di-isopropyl-fluorophosphat* (DFP) zeigte einen Degenerationsverlauf peripherer Axone, die hinsichtlich ihrer phänotypischen Entwicklung in der klinischen Literatur als Waller'sche Degeneration nach Ligatur eines Axons beschrieben worden ist (Bouldin und Cavanagh, 1979).

Hierbei handelt es sich um charakteristische, zelluläre Prozesse, die sich nach der Transsektion eines Axons im Sinne einer distalen axonalen Degeneration („dying back“) ereignen. Nach der Axotomie kommt es innerhalb einer Latenzperiode von 1-3 Tagen zu keinerlei sichtbaren histologischen Ereignissen. Direkt nach der Verletzung des Axons kann man jedoch einen Zusammenbruch des schnellen axonalen Transports nachweisen. Den Beginn der Degeneration kennzeichnet ein Kalzium-Influx durch das intakte Axolemma (Schaeffer und Bunge 1973, George et al., 1995). Die Synthese von Tubulin und Aktin steigt an und die Synthese von Neurofilamenten sinkt ab (Hoffmann und

Cleaveland, 1988). Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt zu einer Aktivierung von Kalzium abhängigen Proteasen (*Calpaine*) und dadurch zu einer Verstärkung der proteolytischen Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts. Histopathologisch charakteristisch für die Waller'sche Degeneration ist das Auftreten von intra-axonalen Vakuolisierungen, distaler axonaler Schwellung und einer Degradation der Myelinscheide. Die Perikarya zeigen ein durchsichtiges Zytoplasma mit Vakuolisierungen und auffälligen membranösen Einschlüssen (Ginsberg, 1998). In Schwann-Zellen werden Fetttropfchen und kleine, konzentrische Membranfiguren sichtbar (Waller, 1850; Ramon y Cajal, 1928). Nach der Degeneration des Axons kann im peripheren Nervensystem der proximale Stumpf regenerieren, ein Prozess der je nach Länge des abgetrennten distalen Anteils zwischen Wochen und Monaten andauern kann.

Die auffällige Übereinstimmung der morphologischen Veränderungen nach einer physikalischen Transsektion des Nerven mit den auftretenden Degenerationserscheinungen nach Inhibition von *NTE* durch DFP, führten zu der Aussage, daß neurotoxische Organophosphate durch Inhibition von *NTE* eine „chemische Transsektion“ des Nerven verursachen und dadurch OPIDN auslösen (Bouldin und Cavanagh 1979).

1.3.4 Waller'sche Degeneration und Gliazellen

Im Gegensatz zu der Betrachtung, daß es sich im Falle der Gliazellen lediglich um ein „Stützgewebe“ der Nervenzellen handele (Virchow, 1846), erkennt man mehr und mehr eine zentrale und aktive Funktion, die Gliazellen bei der Aufrechterhaltung eines funktionstüchtigen Nervensystems leisten. So scheinen Mikrogliazellen einen zentralen Einfluß auf die Pathophysiologie der amyloiden Plaques der Alzheimer Krankheit (Uchihara et al., 1997) zu besitzen und sind somit ein zentraler Angriffspunkt für mögliche Behandlungsstrategien. Auch gibt es vermehrt Hinweise darauf, daß Mikrogliazellen eine ausschlaggebende Funktion in der Entwicklung des HIV induzierten *aids dementia complex* (Achim und Wiley, 1996) zukommt.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen des peripheren Nervensystems, wie dem Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMT), haben Gliazellen entscheidenden Einfluß auf die Pathogenese: Die Untersuchung der Expression des mit CMT assoziierten *peripheral myelin protein 22* (PMP22) in Ratten (Niemann et al., 1999) und Mäusen weist dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat von Schwann-Zellen bei der Entwicklung derartiger Demyelinisierungskrankheiten eine zentrale Stellung zu (D'Urso et al., 1998). Eine gesteigerte zelluläre Produktion der zytosolischen Phospholipase A2 in Nachbarschaft zu degenerierenden Neuronen ist in Astro- und Mikrogliazellen wesentlicher Bestandteil der inflammatorischen Signalkaskade (Stephenson et al., 1999). Neben der Unterstützung der Signalübertragung kommt den Schwann-Zellen und Makrophagen im peripheren Nervensystem eine führende Rolle bei der Entfernung der axonalen Reste nach der Waller'schen Degeneration eines Nerven und der damit verbundenen Möglichkeit zur axonalen Regeneration zu (Perry et al., 1987).

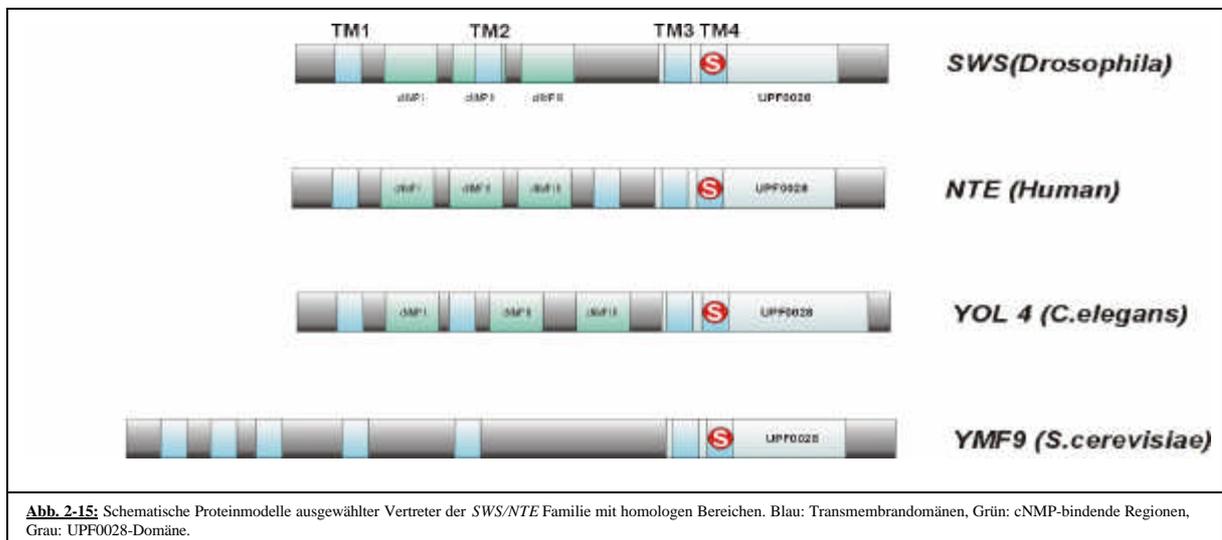
Nach Axotomie fragmentieren Schwann-Zellen ihre eigene Myelinscheide in *Ovoide*, die sie autophagozytieren, bis Makrophagen in den Tubus des degenerierenden Nervs eindringen und die Abbauprodukte des distalen Axonstumpfs und der Myelinscheide abbauen (Liu et al., 1995). Nach einer Proliferationsphase der Schwann-Zellen haben Axone des peripheren Nervensystems die Fähigkeit, in den nun leeren Tubus erneut auszuwachsen und zu regenerieren (Fugleholm et al., 1994). Die Gliazellen sorgen während dieses Prozesses für Stabilität und stellen Signalmoleküle sowie trophische Faktoren zur Verfügung (Fu und Gordon, 1997). Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem, bleiben im zentralen Nervensystem nach Waller'scher Degeneration die entscheidenden Schritte, die zu einer Regeneration des distalen Anteils des Axons führen, aus. Es kommt weder zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen (Perry et al., 1987), noch werden hämatogene Makrophagen rekrutiert. Diese können nicht zu degenerierenden Nervenbahnen des ZNS vordringen, da die Blut-Gehirn-Schranke (BGS) eine Penetration verhindert (Griffin et al., 1992). Gliazellen haben somit eine zentrale Stellung innerhalb des Mechanismus, der nach Waller'scher Degeneration zu einer *Regeneration* des beschädigten Nervs und damit zu einer funktionellen Restauration des Organismus führt.

Die Inhibition von *NTE* durch ein geeignetes neurotoxisches Organophosphat führt zu einer verzögerten Neuropathie, deren phänotypischer Verlauf hinsichtlich histologischer und physiologischer Ereignisse mit einer Waller'schen Degeneration gleichzusetzen ist. Und ebenso wie in physikalischen Transsektions-Experimenten sind die durch OPIDN ausgelösten Degenerationserscheinungen reversibel, solange sie nur periphere Nervenbahnen betreffen. Werden zentralnervöse Strukturen beschädigt, so bleibt eine axonale Regeneration aus (Jortner et al., 1989). In den vergangenen Jahrzehnten hat sich daher die Waller'sche Degeneration zu einem histopathologischen Modell für das Erscheinungsbild von OPIDN etabliert, das nicht nur die neuronalen Prozesse sehr genau beschreibt, sondern auch den Beitrag von Gliazellen mehr und mehr in den Vordergrund rückt.

Die immunhistochemischen Experimente an Präparaten des Huhns (Abb. 1-11, 1-12, 1-13) legen nahe, daß das *SWS/NTE*-Protein in Gliazellen nicht oder nur in geringer Konzentration vorhanden ist. Ebenso deuten die Muster der *in situ*-Hybridisierungen darauf hin, daß Gliazellen kein *sws*-Transkript beinhalten (Abb. 2-3) und damit, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Funktion im Wirkungsgefüge des *SWS/NTE*-Proteins wahrnehmen. Im Gegensatz zu dieser scheinbar fehlenden Beteiligung auf Ebene der mRNA- und Proteinexpression, repräsentieren Gliazellen in der Histopathologie der *sws*-Mutation einen wesentlichen Teil des Erscheinungsbilds in *Drosophila melanogaster*. Und wie an der Existenz einer glialen Schädigung des frisch geschlüpften Imagos (Abb. 1-1) vor dem Beginn der neuronalen Degeneration zu sehen ist, kommt Gliazellen in der Pathophysiologie der durch die *sws*-Mutation ausgelösten degenerativen Prozesse möglicherweise eine entscheidende Funktion zu.

1.3.5 Die SWS/NTE-Proteinfamilie

SWS und NTE sind Mitglieder einer bislang unbekanntenen Proteinfamilie, deren Mitglieder signifikante Homologien zwischen den Vertretern von *Drosophila melanogaster*, des Menschen bis hin zu Vertretern im Reich der Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Neisseria meningitidis* aufweisen. Abgesehen von der Konsensussequenz des aktiven Zentrums der Serinesterase zeigen das SWS-Protein und seine Familienmitglieder nur geringe Ähnlichkeiten mit der bisher am besten untersuchten Serinesterase AchE oder zu allen anderen bislang bekannten Serin-Esterasen (Glynn, 2000). Die meisten Mitglieder dieser neuen Familie sind konzeptuelle Proteine aus verschiedenen Genom-Sequenzierungsprogrammen. Alle eukaryontischen Vertreter [SWS (*Drosophila melanogaster*), NTE (*Homo sapiens*, *Mus musculus*), YOL4 (*Caenorhabditis elegans*), YMF9 (*Saccharomyces cerevisiae*)] weisen in ihrer Proteinsequenz mehrfach analogisierbare Transmembrandomänen auf und zeigen im weiteren Aufbau ihrer Domänen eine starke Kongruenz.



Die N-terminale Hälfte des SWS/NTE Proteins enthält in *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* und *Mus musculus* einen Bereich ausgeprägter Übereinstimmung, welcher wiederum signifikante Homologien zu der cNMP-Bindungsdomäne (Pfam accession number PF00027) einer Familie der cNMP-gesteuerten Kanäle aufweist (Yau, 1994). Auch in *Caenorhabditis elegans* existieren diese drei homologen Bereiche, nur ist hier die Konservierung der N-terminalen Sequenz (E²⁷⁸ bis E³⁷⁸) schwächer ausgeprägt.

Problematisch erscheint die Lage der zweiten Transmembrandomäne (TM2) in bezug auf die cNMP-Domänen in *Drosophila* und *C. elegans*, da je nach dem wo TM2 liegt, die cNMP-Domänen an unterschiedlicher Membranseite zu liegen kommen (siehe Kapitel 3.4.4).

Die stärkste Einstimmigkeit der Sequenzen durch so verschiedene phylogenetische Klassen hindurch zeigt sich an der katalytischen Domäne, die neben zwei Transmembrandomänen auch das aktive Zentrum der Serinesterasen enthält. Der als UPF0028 bezeichnete Sequenzabschnitt mit der

Konsensussequenz [GA]-[GS]-G-[GA]-A-R-G-x-[SA]-[H-x-G-x(9)]-[IV]-D-x(2)-[GA]-G-x-S-x-G findet sich als C-terminale Region in vielen Proteinen aus Eu- und Prokaryonten.

<i>Drosophila</i>	929	LSEPNMHSDFSRLARWLTGNSIGLVLGGGGARGAAHIGMLKAIQEAGIPVDMVGGVSIGALMGALWC	
Maus	910	SRRADRHSDFSRLARVLTGNTIALVLGGGGARGCASHIGVLKALEEAGVPVDLVGGTSIGSFICALYA	
		oo: ***** **++*o*****o+***+***+***+***+***o***+***+o	
<i>Drosophila</i>		SDFSRLARWLTGNSIGLVLGGGGARGAAHIGMLKAIQEAGIPVDMVGGVSIGALMGALWCSESNITT	
Maus		SDFSRLARVLTGNTIALVLGGGGARGCASHIGVLKALEEAGVPVDLVGGTSIGSFICALYAEERSASR	
		***** **++*o*****o+***+***+***+***+***o***+***+o**o +	
<i>Drosophila</i>		VTQKAREWSKMTKWFLQLLDLTYPITSMFSGREFNKTIHDTFGDVSIEDLWIPYFTLTDDITASCH	
Maus		TKQRAREWAKSMTSVLEPVLDTYPTVSMFTGSAFNRSIHRVFDKQIEDLWLPYFNVTDDITASAM	
		o*+***+*o**o + +*****+***+* **++* o* * o*****+***o+*****o	
<i>Drosophila</i>		RIHTNGSLWRYVRSMSLSGYMPLCDPKDGHLLLDGGYVNNLPADVMHNLGAAHIIAIDVGSQDDT	
Maus		RVHKDGLWRYVRASMTLSGYLPLCDPKDGHLLMDGGYINNLPADIARSMGAKTVIAIDVGSQDET	
		*+*o+*****+***+***+*****+*****+*****+ +o+** +*****+**	
<i>Drosophila</i>		DLTNYGDDLSGWLLYKKNPFTSPVKVPDLPDIQSRLAYVSCVRQLEEVKNSDYCEYIRPPIDKYK	
Maus		DLSTYGDLSGWLLWKRLNPWADKVKVPDMAEIQSRLAYVSCVRQLEEVKSSSYCEYLRSIDCFK	
		+o*o*****+**+ **++o *****o+*****+***** **o*****+*o** +*	
<i>Drosophila</i>		TLAFGSFDEIRDVG YVFGKNYFESMAKAGRLGRFNQWFNKEPPKR 1248	
Maus		TMDFGKFDQIYDVG YQYKAVFG-----GWTRGEVIEK 1217	
		*+ **o**+* **++ +** * * o * **++	

Abb. 1-16: UPF0028 Domänenvergleich von *Drosophila* und Maus. *: Identische Aminosäuren, +: konservativ ausgetauschte Aminosäuren, °: Aminosäuren mit einer ähnlichen sterischen Beschaffenheit

Der Sequenzvergleich dieser Domäne von *Drosophila melanogaster* mit *Mus musculus* zeigt mit 57 % Identität und 75 % Ähnlichkeit über einen Proteinbereich von 319 Aminosäuren hinweg (*Drosophila melanogaster* L⁹²⁹-R¹²⁴⁸, *Mus musculus* S⁹¹⁰-K¹²¹⁷) seine hochgradige Konservierung.

Aber auch der Vergleich der UPF0028-Domäne aus den Orthologen von Maus, Mensch, *Drosophila*, *C. elegans* (*YOLA*) und *Saccharomyces cerevisiae* (*YMF9*) veranschaulicht mit 32 % Identität und 56 % Ähnlichkeit einen enormen Selektionsdruck hinsichtlich funktioneller Konstanz während der Evolution. Selbst zu so entfernten Verwandten wie dem Bakterium *Escherichia coli* (*yckK*) zeigt sich bei einem phylogenetischen Vergleich der *Drosophila*-Sequenz L⁹²⁹-R¹²⁴⁸ ein Identitätsgrad von 27 % und einer Ähnlichkeit von 50 %.

Charakteristisch für die Familie der Serin-Esterasen ist neben dem aktiven Serin in der Sequenz G-X-S-X-G eine spezifische räumliche Anordnung weiterer zwei Aminosäuren, die den Sauerstoff des aktiven Serins in jenen reaktiven Status überführen, der ihm den nukleophilen Angriff auf das Carbonylatom der Esterbindung oder das Phosphoratom des Organophosphats erlaubt. In den meisten analysierten Serin-Esterasen sind dies ein Aspartat und ein Histidin in der Nähe des zentralen Serylrests (Dodson und Wlodawer, 1998). Sie können nur kooperativ Ester hydrolisieren und werden deswegen als „katalytische Triade“ bezeichnet. Durch gezielte Aminosäuresubstitutionen konnten neben dem aktiven Serin die Reste A⁹⁶⁰, A¹⁰⁸⁶ und H⁸⁸⁵ als mögliche Mitglieder der katalytischen Triade des humanen *NTE* identifiziert werden. Diese vier Aminosäurereste sind in Maus, Mensch, *Drosophila*, *C. elegans* und Hefe konserviert (Atkins und Glynn, 2000).

All diese Daten demonstrieren eine durch viele phylogenetische Stufen hindurchgehende Konservierung, die einen einheitlichen Reaktionsmechanismus und einen ähnlichen Funktionskreis nahelegt. Auffällig ist eine deutliche Dreiteilung der funktionellen Domänen in die Bereiche der Transmembrandomänen, die der möglicherweise regulatorischen cNMP-bindenden Sequenzeinheiten und jener, bislang keiner Funktion zuzuordnenden und meist C-terminal liegenden Domäne UPF0028. Ebenso wie die Homologien der cNMP-bindenden Domänen zu einer Familie cNMP-gesteuerter Kanäle, legt die Tatsache, daß das aktive Zentrum innerhalb einer Transmembrandomäne liegt und die katalytische Umsetzung eines Esters immer in einer wässrigen Umgebung stattfinden muss, eine Rolle des *SWS/NTE*-Proteines als porenbildendes Protein nahe (Padilla, 1989; Thomas, 1990).

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die bis hierher zusammengefassten Daten zeigen an Hand ausgewählter Experimente ein vielschichtiges und langjährig angesammeltes Repertoire an Erkenntnissen und Mutmaßungen über Natur, Funktion und physiologische Rolle der Serinesterase *SWS/NTE*. Obwohl auf diesem Gebiet nachhaltige und weitreichende Forschung betrieben worden ist, stehen doch nach wie vor unbeantwortete Kernfragen einer endgültigen Aufklärung der pathologischen Mechanismen einer Inhibition oder Mutation dieses Enzyms im Wege. Trotz einer klaren Zuweisung des *SWS/NTE* Proteins zu der funktionellen Enzymklasse der *Serinesterasen* und dem Verständnis der Katalyse, ist nichts über ein mögliches Substrat bekannt. Und die Zugehörigkeit zu einer derartig weitverbreiteten und ubiquitären Gruppe von Enzymen erschwert die Identifikation einer oder mehrerer spezifischer Substrate. Daher bleiben auch die Verdachtsmomente etwaiger Funktionsmodelle weiterhin bloße Spekulation. Über die Identität des Substrats hinaus, ist in *Drosophila melanogaster* die Lokalisation des aktiven Proteins *in vivo* nicht eindeutig beschrieben. Die Frage der *neuronalen* Expression von *SWS/NTE* konnte an Vertebraten immunhistochemisch belegt werden, ob aber *Gliazellen* dieses Protein auch exprimieren und ob sie als obligatorischer Partner in einem *SWS/NTE*-Funktionskreis eine entscheidende Rolle innehaben, konnte an keinem der bislang untersuchten Organismen aufgeklärt werden. *Drosophila* bietet, neben vielen anderen charakteristischen Merkmalen, in Gestalt des *GAL4*-Systems ein funktionell ausgereiftes und wirkungsvolles Instrument zur Aufklärung solcher Fragestellungen.

Das *GAL4*-System erlaubt es, ein beliebiges, kloniertes Gen in einer Vielzahl verschiedener Gewebe spezifisch zu exprimieren (Phelbs und Brand, 1998). Ein Promotor oder Enhancer steuert die Expression des Hefe-Transkriptionsfaktors *GAL4* in einer gewissen Subpopulation von Zellen. Dieser Transkriptionsfaktor wiederum kann die Expression eines Zielgens unter der Kontrolle der *upstream activating sequence* (UAS) in der gleichen Zellpopulation induzieren. Da die *GAL4*-Linie („Treiber-Linie“) und die UAS-Linie mit dem induzierbaren Gen als zwei separate transgene Einheiten vorliegen, kommt es durch Kreuzung dieser beiden Linien zu einer Expressionsaktivierung in den Nachkommen.

Die Identität einer Zelle ist zum überwiegenden Anteil durch das charakteristische Profil ihrer Genexpression festgelegt. Die Expression eines Gens in Zellen, in denen es normalerweise nicht aktiv ist, oder die quantitative Steigerung der natürlichen Expression, kann wertvolle Hinweise auf die funktionelle Identität des gesuchten Proteins geben.

Die durch das *GAL4*-System gewebespezifisch steuerbare Expression wildtypischer oder modifizierter *sws*-cDNA in *Drosophila melanogaster* und die anschließende Untersuchung möglicher

Veränderungen anhand von elektronenmikroskopischen Präparaten stellt daher einen zentralen Aufgabenkomplex innerhalb dieser Arbeit dar. Die parallele Untersuchung des *SWS*-Proteins aus *Drosophila* und des *NTE*-Proteins der Maus ermöglicht die Überprüfung der funktionellen Konservierung dieser beiden Orthologen. Durch die Wahl von geeigneten *GAL4*-Linien kann die Auswirkung der ektopischen Expression innerhalb neuronaler mit der innerhalb glialer Zellverbände verglichen werden. Da neben der ektopischen Expression im wildtypischen Hintergrund auch das Zielgen im mutanten Hintergrund exprimiert werden soll, wird versucht, den ursächliche Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der *sws*-Mutante und der *sws* cDNA erstmals zu verifizieren. Über die gesteuerte Expression der wildtypischen cDNA hinaus, tragen auch modifizierte cDNA-Konstrukte zur besseren Bewertung der Funktion einzelner Domänen des *SWS*-Proteins bei. Im Einzelnen wird hierbei die Transmembrandomäne mit dem höchsten Hydrophobizitätsindex des *Drosophila*-Gens (TM1) aus der cDNA entfernt und die Folgen der dadurch veränderten Membrantopologie auf die Aktivität des Enzyms und auf die Histologie von Neuronen und Gliazellen beschrieben. Des weiteren wird durch gezielte Aminosäuresubstitution das Serin⁹⁸⁵ des aktiven Zentrums der *Drosophila*-cDNA durch ein Aspartat ersetzt. Hiermit wird anstelle der Hydroxylgruppe des Serins eine Carbonylgruppe erzeugt und die Folgen einer Einfügung dieser negativen Ladung im aktiven Zentrum dokumentiert.

Begleitend zu den Analysen der Ultrastruktur wird von jedem untersuchten Genotyp die Aktivität des *SWS*-Proteins quantifiziert. Mit Hilfe dieser biochemischen Daten werden die histologischen Daten gewichtet und einer vergleichenden Diskussion unterzogen. Besonderes Augenmerk gilt hierbei den Implikationen einer zusätzlichen oder fehlenden *SWS/NTE*-Expression sowohl in Neuronen, als auch in Gliazellen unter Berücksichtigung eines möglichen interzellulären *SWS/NTE* Transports.

Neben den *histologischen* Ansätzen, welche eine mögliche Veränderung des Gewebes nach ektopischer Expression der *UAS-cDNAs* unter verschiedenen *GAL4*-Treibern beschreiben, steht die Notwendigkeit eines immunologischen Nachweisverfahrens für eine tiefgreifende Charakterisierung des *SWS*-Proteins außer Frage. Um die exakte Verteilung des *SWS*-Proteins und einen möglichen Unterschied zwischen dem Ort seiner Expression und seiner Lokalisation aufgrund interzellulärer Translokationsprozesse, sowie das Profil seiner zeitlichen Expression zu untersuchen, soll eine geeignete monoklonale Antikörperlinie hergestellt werden. Anhand dieser Antikörper können im Folgenden nicht nur die zelluläre Distribution des *SWS*-Proteins, sondern nach Entwicklung eines geeigneten Reinigungsverfahrens, auch seine biochemischen Eigenschaften und als *in vitro*-System physiologische Aktivitätsparameter bestimmt werden. Die Expression des *SWS*-Proteins im Zellkultursystem soll die Resultate vorhergegangener Untersuchungen auf zellulärer Ebene verifizieren und zusammen mit den strukturellen und biochemischen Daten zu einem tieferen Verständnis beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Fliegenstämme, Antikörper und Kits

2.1.1 Allgemeine Fliegenstämme

Genotyp	Erklärung	Herkunft	Literatur
<i>CantonS</i>	wildtypisch Canton Spezial	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>white</i> Mutante	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>p[w⁺D2-3] Sb/TM3Ser</i>	Transposasequelle	Stammsammlung	Robertson et al., 1988
<i>FM7c/w; TM3Sb/D</i>	<i>white</i> -Stamm, balanciert auf I. und III. Chromosom	Stammsammlung	
<i>w; TM3Sb/D</i>	<i>white</i> -Stamm, balanciert auf III. Chromosom	Stammsammlung	
<i>FM7c/w; CyO/Sco</i>	<i>white</i> -Stamm, balanciert auf I. und II. Chromosom	Stammsammlung	
<i>w, CyO/Sco; TM3Sb/D</i>	<i>white</i> -Stamm, balanciert auf II. und III. Chromosom	Stammsammlung	
<i>w; CyO/Sco</i>	<i>white</i> -Stamm, balanciert auf II. Chromosom	Stammsammlung	

2.1.2 *sws*-Allele

Genotyp	Erklärung	Herkunft	Literatur
<i>sws¹</i>	C ⁽¹¹²⁴⁾ /A-Austausch; Ser ³⁷⁵ / Stop-Codon	D. Kretzschmar	Kretzschmar et al., 1997
<i>sws²</i>		D. Kretzschmar	Kretzschmar et al., 1997
<i>sws⁴</i>	G ⁽²⁸⁷⁷⁾ /A: Gly/Asp	D. Kretzschmar	Kretzschmar et al., 1997
<i>sws⁵</i>	G ⁽¹⁹⁴²⁾ /A: Gly/Arg	D. Kretzschmar	Kretzschmar et al., 1997
<i>sws⁶</i>		D. Kretzschmar	Kretzschmar et al., 1997

2.1.3 Verwendete Gal4-Linien

Stamm	Erklärung	Herkunft	Literatur
<i>w; p{elavGal4}/TM3Sb</i>	neuronale <i>GAL4</i> -Expression	Bloomington Stock Center	
<i>w; p{loco-Gal4}</i>	gliale <i>GAL4</i> -Expression	C. Klämbt	
<i>y w f sws p{hs-Gal4}</i>	<i>GAL4</i> -Expression unter Hitze-Schock Kontrolle	Bloomington Stock Center, Remobilisierung von <i>sws</i> auf X.: D. Kretschmar	
<i>w; p{actin-Gal4}/ Tb</i>	<i>GAL4</i> -Expression unter Kontrolle des actin-Promotors	Bloomington Stock Center	
<i>w; p{MIB-Gal4}/Tm3Sb</i>	gliale <i>GAL4</i> -Expression	Nambu	
<i>w; p{Rh1-66.1-Gal4}/</i>	<i>GAL4</i> -Expression unter Kontrolle des Rhodopsin Promotors	Bloomington Stock Center	
<i>w; p{Tra-Gal4}/TM6B</i>	<i>GAL4</i> -Expression in den Tracheen	L. Seroude (CalTech)	
<i>w; p{neuronal-Gal4}/</i>	neuronale <i>GAL4</i> -Expression	L. Seroude (CalTech)	
<i>w; p{GMR-Gal4}/Cyo</i>	retinale <i>GAL4</i> -Expression	M. Freeman	
<i>w; p{GMR-Gal4}</i>	retinale <i>GAL4</i> -Expression	F. Pignoni	

2.1.4 Verwendete UAS-Linien

Stamm	Erklärung	Herkunft	Literatur
<i>p{UAS-<i>sws</i>}^{5/10}</i>	Wildtypische <i>Drosophila melanogaster sws</i> -cDNA	vorliegende Arbeit	
<i>p{UAS-<i>m-nte</i>}¹³</i>	Wildtypische Maus <i>nte</i> -cDNA	vorliegende Arbeit	
<i>p{UAS-<i>sws-TM</i>}¹⁷</i>	<i>Drosophila melanogaster sws</i> -cDNA ohne erste Transmembrandomäne von M ⁸¹ bis N ¹⁴²⁵	vorliegende Arbeit	
<i>p{UAS-<i>sws Ser</i>⁹⁸⁵/<i>Asp</i>⁹⁸⁵}</i>	<i>Drosophila melanogaster sws</i> -cDNA mit einer Serin ⁹⁸⁵ /Aspartat Substitution	vorliegende Arbeit	

2.1.5 Verwendete Defizienzen

Stämme	Lokalisation	Herkunft
Bloomington Defizienz-Kit	61A1-100F5 (III. Chromosom)	Bloomington Stock Center

Alle Fliegen wurden, soweit nicht anders hervorgehoben, auf Standard Agar-Maismehl-Drosophilamedium bei 25°C und 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.2 Verwendete Antikörper

2.1.1 Primäre Antikörper

Antikörper	aus	Antigen	Herkunft	Verdünnung
22C10	Maus	<i>Drosophila FUTSCH</i>	S. Benzer	1:100
1D5	Maus		vorliegende Arbeit	1:100
α -His-tag	Maus	Polyhistidin	Invitrogen	1:1000
α -V5-tag	Maus	virales V5 Protein	Invitrogen	1:3000
α -Tubulin	Maus	<i>Drosophila Tubulin</i>	H. Lipschitz	1:500

2.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	aus	Antigen	Markierung	Herkunft	Verdünnung
α -Maus	Ziege	Maus Ig	AP	Rockland	1:1000
α -Maus	Ziege	Maus IgG/M	HRP	Jackson	1:1000
α -Maus	Ziege	Maus IgG	Cy3	Jackson	1:500

2.3 Kits

Immunhistochemische Färbungen mit einem biotinylierten Antikörper	Histologische Präparate wurden mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-System der Firma <i>Vector</i> gefärbt.
Immunhistochemische Färbungen mit einem HRP-gekoppelten Antikörper	Histologische Präparate wurden mit dem Di-Amino-Benzidin/H ₂ O ₂ -Kit von <i>Sigma</i> gefärbt.
DNA-Präparationen	Für die Reinigung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen und die Großpräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> wurden Kits der Firma <i>Qiagen</i> verwendet.
Färbung von Western-Blots	Für die Färbung mit Antikörper-gekoppelter Peroxidase wurde das ECL-Kit der Firma <i>Amersham-Pharmacia</i> verwendet.
DNA-Sequenzierung	Die Sequenzierreaktionen wurden mit einem <i>Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit</i> der Firma <i>Amersham-Pharmacia</i> durchgeführt.

2.4 Verwendete Datenbankanalysen

Bezeichnung	Verwendung	Internet-Adresse
TSEG	Analyse der Transmembrandomänen	www.genome.ad.jp/SIT/tseg.html
Top Pred 2	Analyse der Transmembrandomänen	www.sbc.sn.se/~erikw/toppred2
SPLIT	Analyse der Transmembrandomänen	pref.etfos.hr/split
TMpred	Analyse der Transmembrandomänen	www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
CLUSTALW	Multiple Alignements	www.clustalw.genome.ad.jp/
Pfam 6.1	Proteindomänenanalyse	pfam.wustl.edu
BLAST	Homologieanalyse	www.ncbi.nlm.nih.gov.80/BLAST/

2.5 Methoden

Falls nicht ausdrücklich anders erwähnt, sind alle molekularen Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt worden (Ausubel et al., 1999).

2.5.1 Immunisierung und Zellkultur

2.5.1.1 DNA-Immunisierung einer Maus

Die DNA-Immunisierung von Mäusen wurde von Doris Kretzschmar nach einem modifizierten Protokoll von Barry et al. (1994) durchgeführt. Das verwendete cDNA Fragment ist mit dem für die rekombinante Expression von *sws* in *E.coli* (Kapitel 2.5.2) identisch.

2.5.1.2 Kultur der Maushybridoma-Zellen

Die Herstellung und Haltung von Maus-Hybridoma Zelllinien richtete sich nach den Protokollen von Peters und Baumgarten, 1989.

2.5.1.3 Kultur der Schneider-Zellen

Kulturbedingungen, Medien und Transfektion wurden nach Anleitungen des „Drosophila Expression System Instruction Manual“ von *Invitrogen* gestaltet.

2.5.2 Rekombinante Expression von SWS-Protein in *E.coli*

Ein 2505 bp langes cDNA-Fragment wurde *in frame* mit dem ATG beginnend zwischen die 5' KpnI und 3' EcoRI Schnittstellen des pQE-30 Expressionsvektors inseriert. Die 3' EcoRI Restriktionsstelle stellt keine interne Schnittstelle dar, sondern stammt aus einem Linkerfragment der embryonalen Genbank, aus welcher das *sws*-Fragment isoliert wurde (Kretzschmar et al., 1997)

Die Zusammensetzung der Medien, die Vorgehensweise der Klonierung und Transformation richteten sich nach dem *QIAexpressionist-Manual* von *Qiagen*.

2.5.3 Western Blot

2.5.3.1 Herstellung des Proteinextraktes aus *E.coli*

2.5.3.1.1 Extraktionspuffer für Gesamtprotein

- 4 % SDS
- 20 % Glyzerin
- 20 mM Tris pH 6,8
- 0,02 % Bromphenolblau
- 2 % β -Mercaptoethanol

Die Zellkultur wurde bei 3000 upm 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen 2 x Extraktionspuffer resuspendiert und 5 min. auf 95°C erwärmt. Aliquots wurden bei -20°C eingefroren.

2.5.3.1.2 Auftrennung des Proteinextraktes

Die Auftrennung des Proteinextraktes erfolgte in einem 6 % Polyacrylamid-Gel unter denaturierenden Bedingungen nach LAEMMLI bei einer Spannung von ca. 25 mA pro Gel und einer Laufzeit von einer Stunde.

2.5.3.1.3 Transfer der Proteine

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 45 μ m) erfolgte in einer Wet-Blot-Apparatur (Hoefer Power Transfor Lid TE 50 X) nach TOWBIN bei einer Stromstärke von 1000 mA und einer Transferzeit von einer Stunde.

2.5.3.1.4 Immunodetektion

Nach dem Transfer wurden die Membranen in TBST 10 min. gewaschen und in Trockenmilchpulver/TBST 5% über Nacht 4°C inkubiert. Nach Waschen 2 x 10 min in TBST, erfolgte Inkubation des primären Antikörpers, beziehungsweise Serumüberstandes 1 Stunde auf einem Schüttler bei RT. Nach erneutem Waschen 2 x 10 min in TBST erfolgt die Inkubation mit sekundärem Antikörper (α -Maus AP gekoppelt 1:1000) 1 Stunde auf Schüttler bei RT. Die Detektion der alkalischen Phosphatase wurde nach Standardprotokoll mit NBT und X-Phosphat durchgeführt.

2.5.4 Untersuchung der Membranzusammensetzung

2.5.4.1 Total-Lipidextraktion

Lipide aus Gesamtmembranen wurden in einer modifizierten Form nach den Methoden von Bligh und Dyer (1959) und Folch et al. (1957) extrahiert.

Fliegen wurden mit einem Glas-Homogenisator homogenisiert, in 3 ml Chloroform/Methanol 2:1 aufgeschüttelt (gevortext) und durch Zentrifugation wieder in zwei Phasen getrennt. Der klare Überstand (organische Phase) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die organische Phase wurde dreimal mit 3 ml Methanol gewaschen, zentrifugiert und die wässrige Phase mit dem Protein-Niederschlag dabei jedesmal abgenommen und verworfen. Die so gereinigte Chloroform-Phase, in der die Lipide gelöst sind, wurde dann entweder in einer Vakuumzentrifuge oder unter Stickstoff bis zur Trockne eingengt. Das gereinigte Lipidpellet wurde in 50 μ l Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und weiter verarbeitet.

2.5.4.2 Dünnschichtchromatographie

Die extrahierten Lipide wurden auf Kieselgel⁶⁰ Platten in einer eindimensionalen Ein-Schritt-Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Laufmittel dienten 100 ml eines Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (75:45:12:6, v/v/v/v) Gemisches. Der Lauf erfolgte so lange, bis die Front ca. 5 cm unter der Plattenkante angekommen war. Zum Nachweis aller Lipide wurden die Platten mit 1 M H₂SO₄ besprüht und für zwei bis drei Minuten bei 200 °C geschwärzt.

2.5.4.3 Membranextraktion für gaschromatographische Untersuchungen

Für die gaschromatographische Untersuchung wurden 200 mg Köpfe der zu untersuchenden Fliegen in 5 ml PBS in einem Polytron Kinematika aufgeschlossen und in 11 ml Chloroform/Methanol 2:1 eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Nach Addition von 4 ml 0,034 % MgCl₂, mischen und zentrifugieren, wurde die obere wässrige Phase entfernt und erneut mit 8 ml 0,034% MgCl₂

versetzt und gevortext. Durch erneute Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und die untere organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Phase wurde mit 8 ml Chloroform/Methanol/Wasser 3/48/47 (v/v/v) gemischt und erneut abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und verworfen, die organische Phase unter Stickstoff bis zur Trockne eingeeengt.

2.5.5 Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster*

Die Keimbahntransformation wurde nach Rubin und Spradling (1982) durchgeführt, wobei die Embryonen nicht dechorioniert wurden. Als Transformationsvektor wurde das Plasmid pUAST (Brand und Perrimon, 1993) verwendet.

2.5.6 Histologische Präparate

2.5.6.1 Paraffinschnitte

Fliegen wurden in Krägen (nach Jäger und Fischbach, in Ashburner 1989) aufgereiht und nach CARNOY (Romeis 1948) fixiert. Nach einer weiteren Entwässerung in einer steigenden Alkoholreihe wurden die Fliegen über Nacht in Methylbenzoat inkubiert und nach einer weiteren Stunde in Methylbenzoat-Paraffin 1:1 Gemisch in Paraffin eingebettet. Nach Aushärten und Entfernen der Krägen blieben die Köpfe der Fliegen im Paraffinblock zurück und wurden zu 7 µm dicken Schnitten weiter verarbeitet.

2.5.6.2 Kryostatschnitte

Nach Entfernen des Rüssels und der Luftsäcke aus dem Kopf wurden die Tiere in eiskaltem 4% Paraformaldehyd/PBS für 3 Stunden fixiert und in 25% Saccharose/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die so gefriereschützten Köpfe wurden auf dem Objekthalter in noch flüssigem Einbettmedium positioniert. Die Aushärtung erfolgte in flüssigen Stickstoff. Nach Trimmen der Blöcke wurden die Köpfe bei -20°C geschnitten und auf gelatinisierte Objektträger aufgenommen.

2.5.6.3 Immunhistochemie an Kryostatschnitten

Die Antikörperfärbungen an Gefrierschnitten von adulten Köpfen wurden nach dem von Buchner et al. (1986) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.5.6.4 Semidünnschnitte

Den Fliegen wurde in eiskaltem Phosphatpuffer (nach SÖRENSEN pH 7,4 (PPSö)) der Rüssel und die Luftsäcke entfernt. Die Fixierung erfolgte über Nacht in 5% Glutaraldehyd in PPSö bei 4°C. Nach Waschen in PPSö und Entwässerung über eine steigende Alkoholreihe wurden die Präparate zweimal in Propylenoxid 10 min. gewaschen und in Propylenoxid:Durcupan 1:1 gesammelt. Nach Überführung in Durcupan-gefüllte Förmchen wurde das Einbettmedium bei 60°C im Wärmeschrank 12 Stunden ausgehärtet und zu 2 µm dicken Schnitten weiter verarbeitet.

2.5.6.5 Ultradünnschnitte

Präparation und Fixierung wie bei Semidünnschnitten. Nach dem Waschen in PPSö wurden die Fliegen vier Stunden in 4% OsO₄ in PPSö noch einmal fixiert. Die Entwässerung, Lagerung, Einbettung und Aushärtungsbedingungen erfolgte wie für Semidünnschnitte beschrieben. Von den Präparaten wurden mit einem Ultra-Cut ca. 50-100 nm dicke (Silber) Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Grids aufgezogen und in 4% Uranylacetat in destilliertem Wasser und Bleicitrat nach REYNOLDS kontrastiert.

Die Untersuchungen der Präparate wurden an einem *Zeiss EM 10 CR* Elektronenmikroskop durchgeführt.

Die Abmessung von Objekten auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Hilfe eines Nomogrammes nach Ghadially et al. (1981). Die zusätzliche Vergrößerung von dem Photonegativ zu dem Photopositiv wurde durch einen Faktor drei mit einberechnet.

2.5.6.6 Immunohistochemie an *Drosophila melanogaster* Embryonen

Alle Immunohistochemischen Methoden wurden nach Ashburner (1989) durchgeführt.

2.5.6.7 DAPI-Färbungen an *Drosophila melanogaster* Embryonen

Die Färbung der Zellkerne mit dem fluoreszierenden Farbstoff *4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)* wurde nach Ashburner (1989) durchgeführt.

2.5.6.8 Verwendete PCR-Protokolle

Soweit nicht anders erwähnt wurden alle PCR-Reaktionen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 1 x 5 min 95°C
- 35 x 1 min 94°C
1 min Temperaturgradient
5 min 72°C
- 3 x 1 min 94°C
1 min Temperaturgradient
8 min 72°C

2.5.6.9 Sequenzierung

Nachdem die Sangersche Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) zur Herstellung eines Gemisches verschieden langer DNA-Moleküle angewandt wurde, wurde die DNA auf einem ALF-Express-Sequenziergerät von *Pharmacia* durch Polyacrylamidgel Elektrophorese getrennt und mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen.

2.5.6.10 Verwendete Primer:

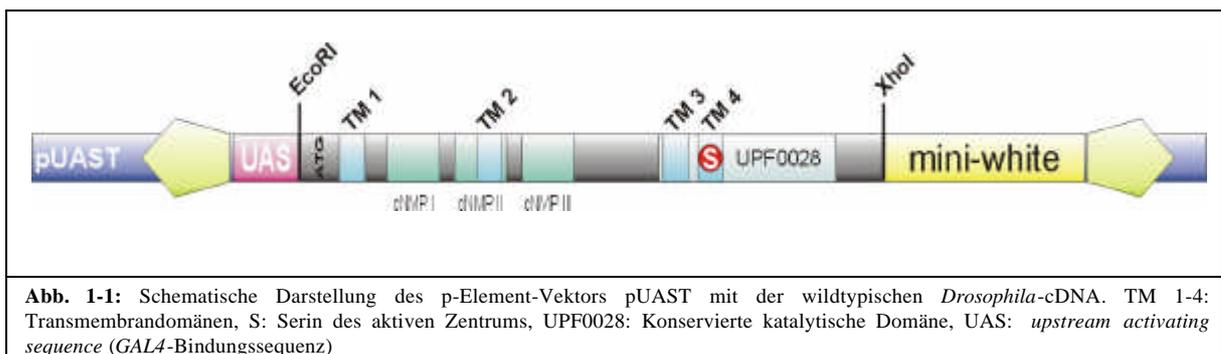
Bezeichnung	Direktion	Sequenz
<i>dsws-5' EcoRI</i>	foreward	5' ATG AAT TCA TGG CAC GTT TGC GTT TGC GC 3'
<i>dsws-R3</i>	foreward	5' TGA GCA CAG ATG TCT GTG GGG C 3'
<i>dsws-TM2</i>	foreward	5' ATG GTA CCA GAA TTC GAG GCC AGT GCG TAT ACC ATT CGA TCG 3'
<i>dsws-S/D</i>	reverse	5' GAG AGC TCC CAT CAA GGC ACC GAT GTC GAC G 3'
<i>dsws-3' XhoI</i>	reverse	5' ATC TCG AGG TTT TTG GTT TGG TTA TTC G 3'

2.5.7 Klonierung der cDNAs und Produktion der transgenen Linien

2.5.7.1 Das wildtypische *Drosophila melanogaster* *sws*-Konstrukt: $p\{UAS-sws\}^{10}$

Das wildtypische *Drosophila melanogaster*-Gen wurde in Form eines „expressed sequence tag“ (EST) von dem *Berkeley Drosophila Genome Project* bezogen. Die cDNA war 5′ EcoRI und 3′ XhoI in einen pOT2a Vektor inseriert und konnte somit ohne weitere Zwischenschritte in einen EcoRI/ XhoI geschnittenen pSK-Vektor und in den für die *Drosophila*-Transformation verwendeten EcoRI/XhoI geschnittenen pUAST-Vektor überführt werden.

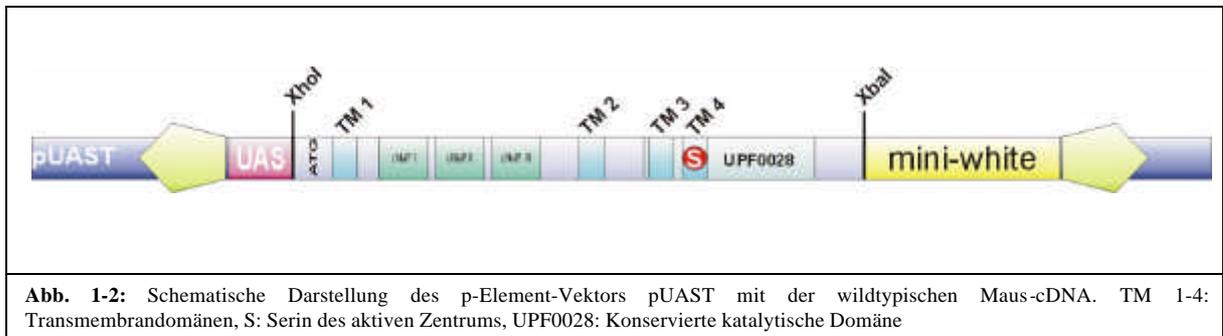
Zur Überprüfung der cDNA-Sequenz wurde das EcoRI/XhoI-ligierte Insert mit den *reverse* und *universal* Primern des pSK-Vektors sowohl 5′ als auch 3′ ansequenziert. Nach Überprüfung der Sequenz der *sws*-cDNA in pSK wurde die Sequenz der cDNA in dem pUAST-Vektor schließlich nur noch nach Restriktionsverdau anhand des Bandenmusters im Agarosegel überprüft.



Aus der Keimbahn-Transformation von *Drosophila*-Embryonen konnten 18 unabhängige p-Element-Linien isoliert werden. Die Linien $p\{sws\}^5$ und $p\{sws\}^{10}$, deren p-Element jeweils auf dem dritten Chromosom lokalisiert war, wurden in den weiteren Experimenten verwendet.

2.5.7.2 Das wildtypische *Mus musculus* *sws* Konstrukt: $p\{UAS-m-nte\}$

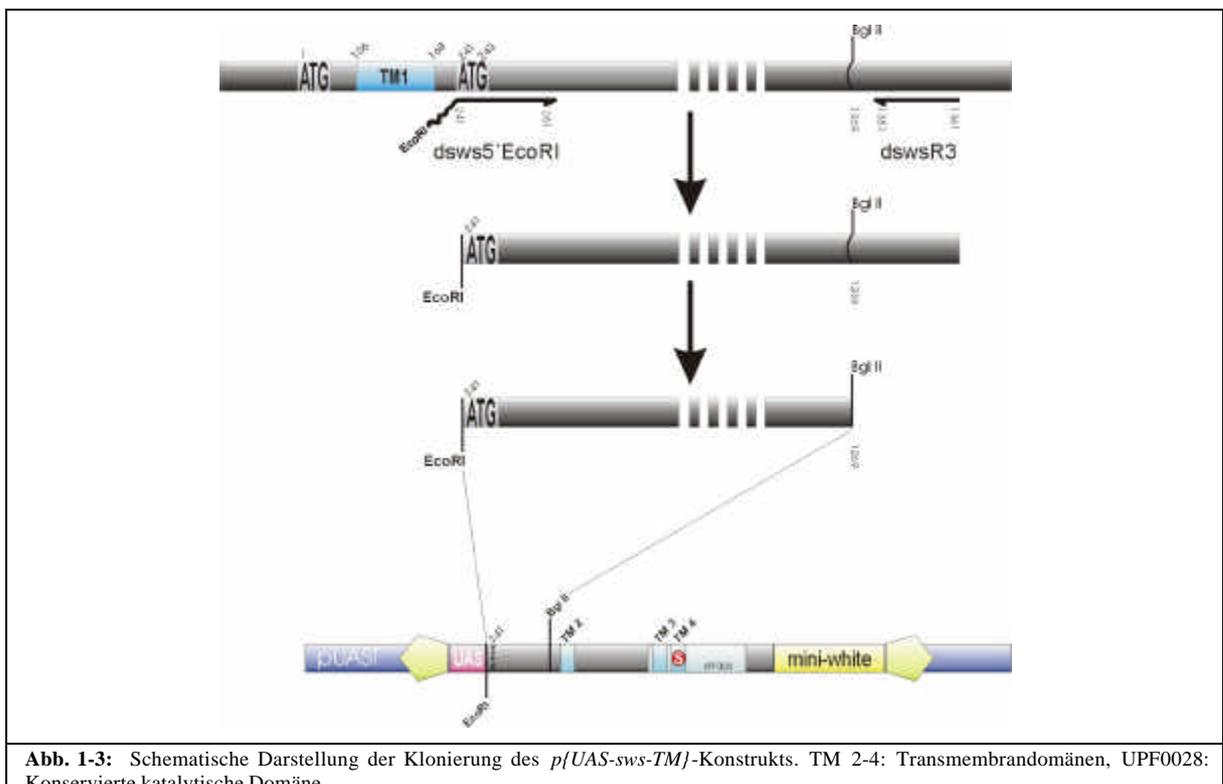
Die Maus *sws*-cDNA wurde aus den von Thomas Stempfl im Zuge seiner Diplomarbeit am Institut angefertigten Fragmenten zusammengesetzt und schließlich 5' XhoI und 3' XbaI in den Transformationsvektor pUAST inseriert.



Es konnten 28 unabhängige p-Element-Linien isoliert werden. Die Linie $p\{UAS-m-nte\}^{13}$ wurde für die weiteren Experimente verwendet.

2.5.7.3 Das *Drosophila melanogaster* *sws* Konstrukt ohne erste Transmembrandomäne: $p\{UAS-sws-TM\}$

Das von den Primern *dsws5'* EcoRI und *dswsR3* flankierte Fragment von bp241 (ATG) bis bp 1381 wurde aus der wildtypischen *sws*-cDNA über PCR amplifiziert.



Nach Gelextraktion und Reinigung des 1100bp langen Fragmentes sowie Verdau mit EcoRI und BglII (bp1269) wurde das wildtypische 5'-Fragment von Base 1 bis 1381 in pSK-GH durch das 5' verkürzte Fragment substituiert (*pSK-sws-TM*).

Die 5'-Sequenzierung bestätigte die korrekte Klonierung. Aus dem *pSK-sws-TM* wurde die modifizierte cDNA EcoRI/XhoI ausgeschnitten und nach präparativer Reinigung in einen EcoRI/XhoI geschnittenen pUAST überführt. Das derart modifizierte Genprodukt beginnt somit C-terminal der ersten Transmembrandomäne nach M⁸¹.

Es konnten nach p-Element-Transformation 8 unabhängige Linien isoliert werden.

2.5.7.4 Das *Drosophila melanogaster* sws Konstrukt mit einer Serin/Aspartat-Substitution im aktiven Zentrum: *p{UAS-sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}*

Um das für das aktive Serin⁹⁸⁵ im katalytischen Zentrum des Proteins codierende Basentriplet AGC (bp 2953-2955) durch die für ein Aspartat codierenden Basen GAC auszutauschen, wurde ein Gegenstrang-Primer konstruiert (5' bp 2979 bis 3' bp 2949), der anstelle des komplementären Codon für das Ser⁹⁸⁵ ein CTG (Asp)-Triplet enthielt (*dsws-S/D*). Über PCR wurde ein cDNA-Fragment vermehrt das 3' von dem Primer *dsws-S/D* und 5' von dem Primer *dsws-TM2* flankiert wurde (bp 1697 bis bp 2979). Dieses Fragment wurde SacI verdaut. Aufgrund dreier interner SacI Schnittstellen in diesem Amplifikat (2318, 2622 und 2997) resultierten zwei nahezu gleich lange Bruchstücke (2318-2622: 304 bp und 2622-2979: 357 bp).

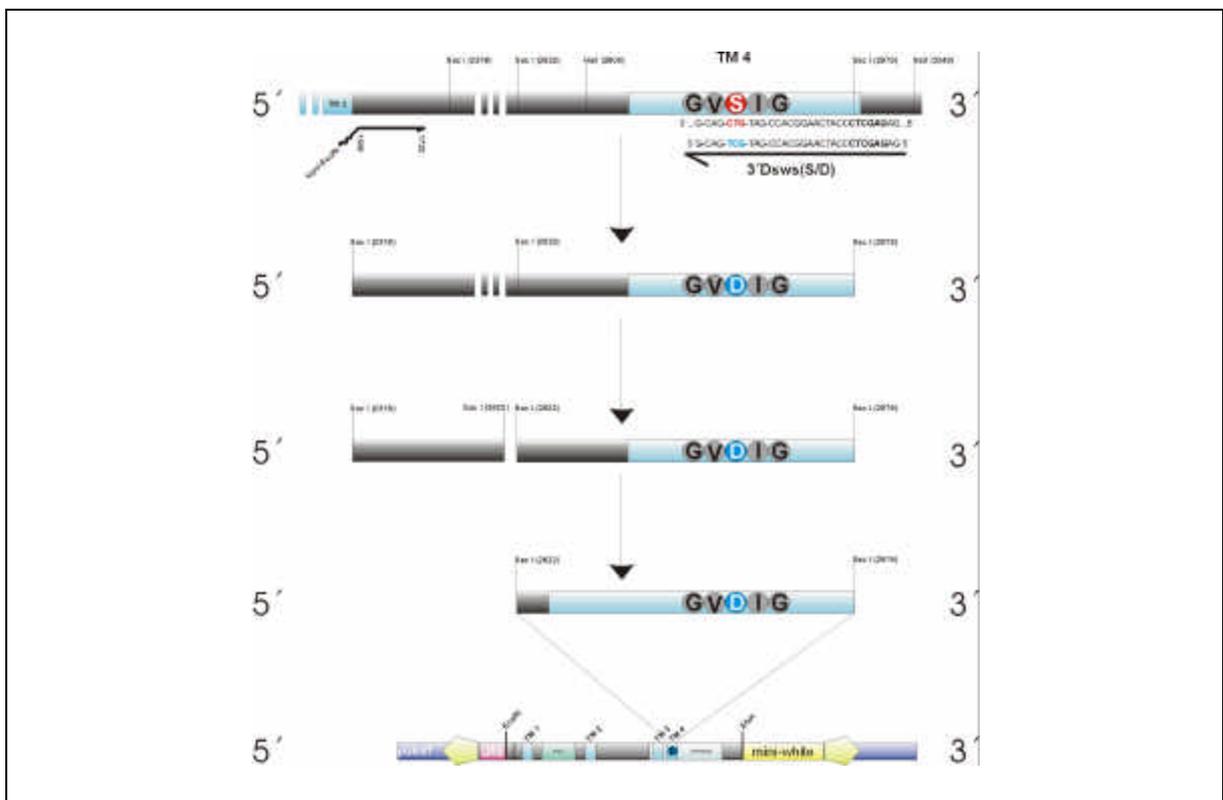


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Klonierung des *p{UAS-sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}*-Konstrukts. TM 1-4: Transmembrandomänen, D: Aspartat⁹⁸⁵, UPF0028: Konservierte katalytische Domäne

Die Bruchstücke wurden elektrophoretisch getrennt und die 357 bp lange Sequenz in pSK subkloniert. Die Sequenzierung bestätigte die korrekte Substitution des AGC-Triplets (Serin) gegen ein GAC-Triplet (Aspartat). Die 3' liegenden Anteile der cDNA wurden angefügt und aus der verlängerten Sequenz der das GAC-Triplet enthaltende Anteil als NsiI-Fragment in den pUAST-*{sws}* überführt. Der Basenaustausch wurde erneut überprüft, in dem das NsiI-Fragment alleine in den pSK subkloniert und dort sequenziert wurde.

Durch die Einführung eines neuen Basentriplets haben sich in dem Bereich bp 2950 - bp 2955 drei neue Restriktionsstellen gebildet: TaqI, SalI und HincII. Es wurden nach p-Element-Transformation 7 unabhängige Linien isoliert.

2.5.7.5 Das wildtypische *Drosophila melanogaster* sws Konstrukt in Schneider-Zellen: *pMT-GH ORF-V5*

Alle verwendeten Vektoren und Antikörper stammen aus dem *Drosophila Expression System Kit* von Invitrogen (DES). Die wildtypische *Drosophila melanogaster* cDNA wurde 5' EcoRI und 3' XhoI *in frame* in den Expressionsvektor *pMT/V5-HIS^A* kloniert. Dieser Vektor erlaubt rekombinante Expression in *Drosophila* Schneider-Zellen (S2-Zellen) durch Induktion eines Metallothionein-Promotors (Bunch et al., 1988; Maroni et al., 1986). Die Fusion am 3' Ende mit dem ORF eines viralen V5- und eines Polyhistidin-Signalpeptides ermöglichte die Detektion mittels spezifischer Antikörper (Southern et al., 1991), sowie die mögliche Reinigung des rekombinant exprimierten Proteines über eine Affinitätschromatographie (Lindner et al., 1997).

Die im Kit vorhandenen Sequenzier-Primer waren für eine 5' und 3' Ansequenzierung zur Überprüfung der korrekten Fusion der cDNA mit der 5' Promotorregion und den 3' gelegenen Signalpeptiden ungeeignet, da für die Sequenzierung mit dem ALF-Sequenziersystem fluoreszierende Primer nötig sind. Daher wurde das cDNA-Fragment mit den 5' und 3' Anteilen aus dem fertig konstruierten Vektor ausgeschnitten, in einen pSK-Vektor re-inseriert und ansequenziert. Mit dem derart überprüften Expressionsvektor wurden nach Anleitung des DES-Manuals transiente Transfektionen vorgenommen.

2.5.7.6 Das *Drosophila melanogaster* sws Konstrukt ohne erste Transmembrandomäne in Schneider-Zellen: *pGH-ORF(-TM)-V5*

Analog zu dem unter 2.5.7.5 beschriebenen Verfahren wurde auch die modifizierte cDNA ohne erste Transmembrandomäne in den S2-Expressionsvektor *pMT/V5-His* inseriert und mit diesem Vektor transient S2-Zellen transfiziert.

2.5.7.7 SWS/NTE-Aktivitätsbestimmung (PV-Aktivität)

Die Aktivitätsbestimmungen wurden an der University of Leicester von Dr. Paul Glynn nach der von Johnson (1977) etablierten Methode durchgeführt. Hierbei wurde die gegenüber Paraoxon resistente, aber gegenüber Mipafos sensitive Fähigkeit zur Hydrolyse des *in vitro* Substrates Phenyl-Valerat (PV-Aktivität) gemessen. Da das *in vivo* Substrat unbekannt ist, stellt die Spezifität des Enzymes für das *in vitro* Substrat eine operationelle Definition der Enzymaktivität dar (Johnson und Richardson, 1983).

Es wurden von dem zu untersuchenden Genotyp ca. 400 Individuen gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Versendung erfolgte auf Trockeneis und die Proben wurden nach Erhalt so bald wie möglich weiter verarbeitet. Homogenisierte Fliegen werden bei 30°C 30 min. mit 160 µM Paraoxon inkubiert. Durch Verdünnung mit TE und Zentrifugation (100.000g, 60 min. 4°C) wurde die Reaktion abgestoppt. Das pelletierte Material wurde in TE resuspendiert. Nach Inkubation mit 50 µM Mipafos wurde Phenyl-Valerat addiert und nach einer weiteren Inkubation von 27 min bei 37°C die Enzymaktivität durch kolorimetrische Messung bestimmt (Atkins und Glynn, 2000).

Als wildtypische Kontrolle der Aktivitätsmessungen der induzierten Expression von UAS-cDNA-Konstrukten dienten Fliegen des Stammes w^{1118} (w), die auch den genetischen Hintergrund aller p-Element-Insertionen darstellten.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Der immunologische Nachweis des SWS-Proteins

Der immunhistochemische Nachweis des SWS-Proteins durch einen Antikörper ist ein wesentlicher Schritt zur Aufklärung der räumlichen und zeitlichen Verteilung, sowie ein zentrales Werkzeug zur funktionellen Charakterisierung des Proteins. Es wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um einen gegen das SWS-Protein gerichteten Antikörper zu erhalten: Da es bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht gelungen war das Protein in ausreichenden Mengen rekombinant herzustellen und damit eine herkömmliche Immunisierung gegen das Antigen nicht möglich war, wurden DNA-Immunisierungen an Mäusen (siehe Kapitel 2.5.1.1) vorgenommen. Des Weiteren wurden kommerzielle Angebote genutzt, bei denen aufgrund der bekannten Proteinsequenz *in vitro* Peptide produziert und damit eine herkömmliche Immunisierung an Spendertieren vorgenommen werden konnte.

3.1.1 DNA-Immunisierung

Die Überstände der aus der Subklonierung der Maus-Hybridoma-Zelllinien hervorgegangenen, polyklonalen Zellfraktionen wurden gegen das *E.coli* *pQE31-HIS-SWS-I*-Zellysat (siehe Kapitel 2.5.3) getestet. Zellüberstände, die eine Proteinbande in der Größenordnung des exprimierten *HIS-SWS-I*-Fusionsproteins (60kDa) erkannten, wurden einer Überprüfung ihrer Antigenizität an Western-Blots mit Kopfhomogenaten aus den *Drosophila melanogaster* Stämmen *Canton^S* und *sws^I* unterzogen.

Im Falle einer Antigen-Antikörper-Interaktion sollten in dem Western-Blot die Größenunterschiede des wildtypischen SWS-Proteins und des durch ein Stop-Codon stark verkürzten *SWS^I*-Proteins deutlich werden. Sollte sich bis hier der Verdacht einer Identität zwischen dem durch den aktiven Hybridoma-Überstand detektierten Protein und dem SWS-Protein erhärten, wird im Folgenden der aktive Zellüberstand auf Kryostatschnitten von *Drosophila*-Gehirnen und damit auf seine histologische Verwendbarkeit hin überprüft. Da die bereits durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen das *sws*-Transkript im gesamten Kortex des Gehirns lokalisierten (Kretzschmar et al., 1997), wurde eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung auch in diesem Bereich erwartet.

Von den 100 überprüften Hybridomaüberständen zeigten vier Überstände Immunoreaktivität mit dem *E.coli* *pQE31-HIS-SWS-I*-Zellysat. Keiner dieser Hybridomaüberstände zeigte jedoch Immunoreaktivität auf Western-Blots mit *Drosophila*-Kopf-Homogenaten, die auf eine Detektion des *sws*-Proteins hätten schließen lassen. Die Überprüfung der mit dem Hybridoma-Überstand im Western-Blot des *E. coli*-Lysats detektierten Banden durch einen *anti-HIS*-Antikörper konnte die

Identität des erkannten Antigens und des rekombinant exprimierten SWS-Proteins nicht bestätigen. Von den vier im Western-Blot reaktiven polyklonalen Überständen zeigte der Überstand des Klons

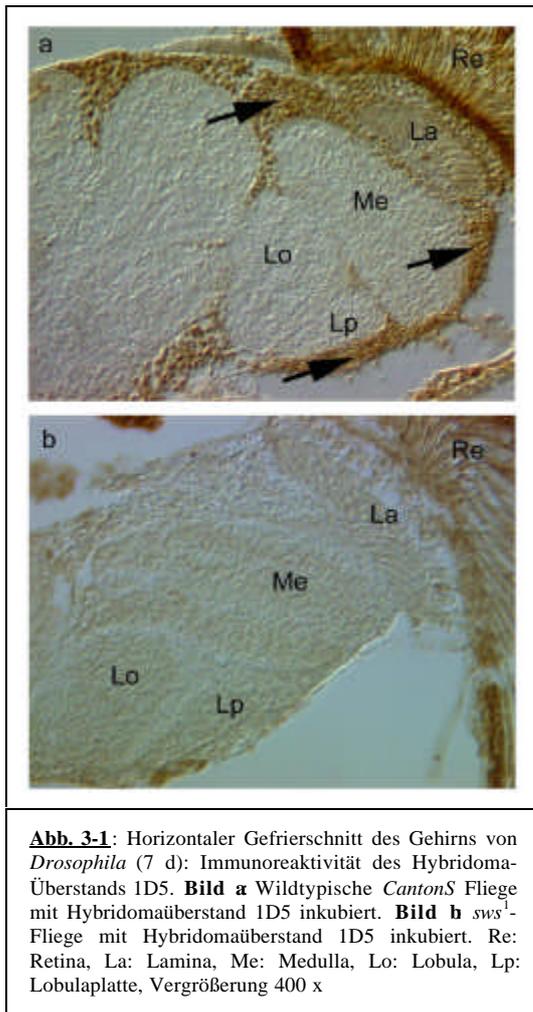


Abb. 3-1: Horizontaler Gefrierschnitt des Gehirns von *Drosophila* (7 d): Immunoreaktivität des Hybridoma-Überstands 1D5. **Bild a** Wildtypische *CantonS* Fliege mit Hybridomaüberstand 1D5 inkubiert. **Bild b** *sws*¹-Fliege mit Hybridomaüberstand 1D5 inkubiert. Re: Retina, La: Lamina, Me: Medulla, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte, Vergrößerung 400 x

1D5 als einziger deutliche Antigenizität auf Kryostatschnitten von *Drosophila*-Köpfen (Abb. 3-1, a: ➡). Kryostatschnitte der Linie *sws*¹ zeigten keine Immunoreaktivität (Abb. 3-1, b). Die Immunoreaktivität des Klons 1D5 ging im Folgenden bei dem Versuch, durch Vereinzeln eine monoklonale Zelllinie zu erzeugen, verloren und konnte auch aus in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Aliquots eben dieser Zellfraktion nicht wieder ermittelt werden. Es besteht die Möglichkeit, daß diese Zelllinie eine sogenannte *feeder-culture* benötigte, also eine Zelllinie die Vital-Faktoren in das Medium abgibt, welche die Antikörper produzierende Zelllinie selbst nicht mehr herstellen kann. In Folge der Vereinzeln können Antikörper produzierende Klone von den notwendigen Begleit-Kulturen getrennt werden und eingehen. Nach der eingehenden Überprüfung aller Fraktionen des Zellüberstands konnte bei keiner eine zweifelsfreie Affinität für das SWS-Protein festgestellt werden.

3.1.2 Peptidimmunisierung

Nach einer bereits erfolglosen Peptidimmunisierung am CalTech (USA) wurde im Verlauf dieser Arbeit der *Pineda-Antikörper-Service* beauftragt, eine Immunisierung mit synthetischen Peptiden durchzuführen, die aufgrund der Sequenzinformationen des SWS-Proteins neu erstellt wurden. Es wurden zwei Oligopeptide als Antigene ausgewählt, die keine der vier in dem SWS-Protein vorhergesagten Transmembrandomänen beinhalten. Das erste Peptid umfasste den Bereich V⁷⁴-K⁸⁸ (Val Thr Asn Ser Ser Gly Asp Met Arg Gly Leu Arg Phe Arg Lys), der zweite ausgewählte Bereich die Aminosäuren T³⁹⁴ bis G⁴⁰⁸ (Thr Leu Ser Asp Pro Asn Pro Asn Pro Asp Gly Ser Phe His Gly). Die Überprüfung der produzierten Seren ergab jedoch keine positive Reaktion auf Western-Blots mit rekombinant exprimiertem SWS oder auf Kryostatschnitten von wildtypischen und *sws*¹- Fliegen.

3.1.3 Produktion eines SWS-Fusionsproteins in Zellkulturen

Um, trotz der bislang erfolglosen Versuche der Antikörperproduktion gegen das SWS-Protein, ein immunologisches Nachweisverfahren zu etablieren, wurde mit dem Vektor *pMTV5-His* des *DES*-Expressionssystems der Firma *Invitrogen* eine Möglichkeit genutzt, die *sws*-cDNA mit dem viralen V5-Signalpeptid zu fusionieren und damit gleichzeitig ein Expressionssystem für Schneider-Zelllinien (*S2*-Linien) zu erstellen. Die korrekte Klonierung wurde durch 3'- und 5'-Ansequenzierung überprüft. Nach Transfektion von *S2*-Zellen und CuSO_4 -Induktion wurden ohne nähere Bestimmung des Proteingehalts Zellextrakte für den Nachweis des exprimierten Proteins mit einem anti-V5-Antikörper durch Western-Blot erstellt. Der Proteinextrakt wurde in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 in dem Western-Blot eingesetzt. Die Immunodetektion wurde mit dem Antikörper gegen das virale V5- und dem gegen das Polyhistidin-Signalpeptid durchgeführt. Es konnte trotz mehrfacher Versuche mit keinem der Antikörper eine dem SWS-Protein zuzuordnende Proteinbande detektiert werden. Der Versuch, das *Drosophila*-Konstrukt ohne erste Transmembrandomäne auf gleiche Art und Weise in *S2*-Zellen zu exprimieren, zeigte gleichfalls kein positives Resultat. Auch hier konnte in der Immunodetektion kein Signal dem SWS-TM-Protein zugeordnet werden.

Die Probleme bei der Etablierung eines funktionstüchtigen Zellkultursystemes können auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen ist es bekannt, dass Transmembranproteine in Expressionssystemen *in vivo* Probleme aufwerfen können, weil sie die physikalische oder biochemische Beschaffenheit von Membranen ändert. Die möglichen Veränderung der Zellmembran einer *sws*-transfizierten Zelle reichen von einer möglichen Modifikation der Leitungsfähigkeiten der Membran, bis hin zur Akkumulation unphysiologischer Mengen des rekombinant exprimierten Proteins. Diese Akkumulation kann durch eine übermäßige Expression, oder durch die Unfähigkeit der Zelle, das Protein zu degradieren, einen negativen Einfluss auf die Zelle haben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine übermäßige Produktion des SWS-Proteins auf manche Zellpopulationen einen stark schädigenden Einfluss hat (siehe Kapitel 3.2.1.2 und 3.2.2.2). Darüber hinaus gilt es auch zu bedenken, dass Schneider-Zellen keine neuronale Zellkulturlinie darstellen und damit der physiologische Kontext für eine fehlerfreie Integration des rekombinant exprimierten Proteins nicht gewährleistet sein könnte. Eine Verwendung von neuronalen Zellkulturlinien aus *Drosophila* könnte hier wertvolle Hinweise auf eine gewebespezifische Verträglichkeit der *sws*-cDNA geben.

3.2 Funktionelle Untersuchung des *Drosophila*-*sws*-Konstrukts

3.2.1 Untersuchung der Expression der *Drosophila*-cDNA (*p{UAS-sw}*) im *sws*¹-Hintergrund

Der Beweis für den kausalen Zusammenhang zwischen der Mutation innerhalb eines Gens und einem auftretenden Phänotyp im engeren Sinne stellt die induzierte Expression des Gens im mutanten Hintergrund dar (*Rescue*). Im Falle der *sws*-Mutation konnte durch Expression eines *genomischen* Fragments im mutanten Hintergrund eine Revertierung des mutanten Phänotyps gezeigt werden (Kretzschmar et al., 1997). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß diese Veränderung auf noch nicht bekannte Gene innerhalb der in dem genomischen Konstrukt vorhandenen Introns zurückzuführen ist. Die Expression der cDNA im mutanten Hintergrund stellt somit eine abschließende Verifizierung der Urhebererschaft des pathologischen Phänotyps durch das mutierte *SWS*-Protein dar.

Als mutanter Hintergrund wurde das Allel *sws*¹ verwendet. Hier entsteht aufgrund einer *nonsense*-Mutation aus dem Ser³⁷⁵ ein *amber*-Stop-Codon und damit ein verkürztes Protein, das kein bisher bekanntes aktives Zentrum enthält und damit hinsichtlich seiner enzymatischen Aktivität als „Nullmutation“ betrachtet wird.

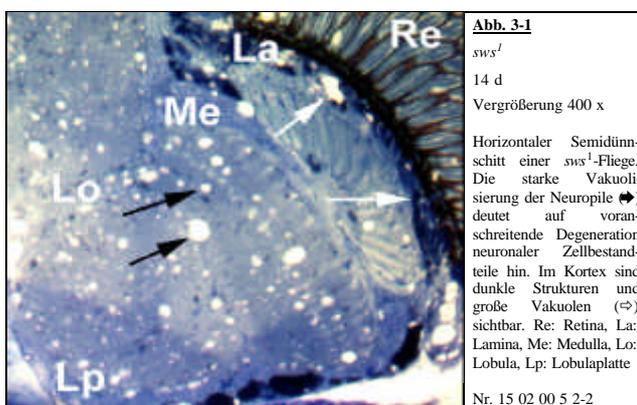
Es wurden Fliegenstämme etabliert, die sowohl die *sws*¹-Mutation, als auch das p-Element mit wildtypischer *sws*-cDNA (*p{UAS-sw}*^{5/10}) homozygot oder heterozygot über einem Balancer trugen. Die verwendeten p-Element-Linien, zum Beispiel *p{UAS-sw}*⁵, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit verkürzt als *p{sw}*⁵ bezeichnet. Da es sich bei *sws* um ein x-chromosomales Gen handelt, wurden Jungfrauen dieser Stämme mit Männchen der *GAL4*-Stämme gekreuzt. So erhält man zum Beispiel aus der Kreuzung

$$sws^1; p\{sw\}^5 \quad X \quad w; elav-GAL4/TM3Sb$$

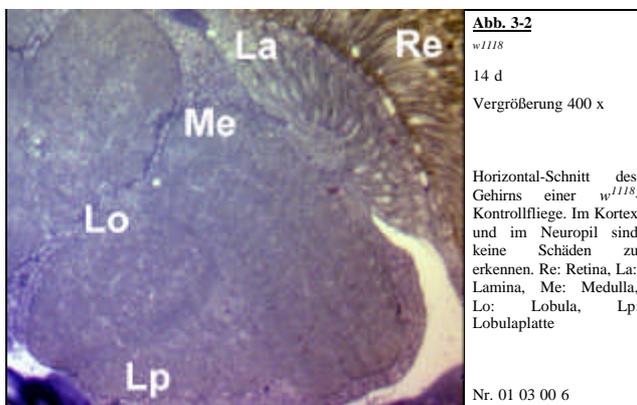
Männchen der Filialgeneration mit dem Genotyp *sws*¹/*y*; *p{sw}*⁵/*elav-GAL4*. Sie wurden nach einem, sieben und vierzehn Tagen für die weitere Verwendung in Semi- und Ultradünnschnitten fixiert und eingebettet. Als Treiber der cDNA dienen *elav-Gal4*-Stämme für die Steuerung neuronaler Expression und *loco-Gal4*-Stämme zur Aktivierung glialer Expression. Für die Expression des UAS-Konstruktes in allen Körperzellen, wurde der *actin-GAL4*-Treiber verwendet.

3.2.1.1 Untersuchung der *elav*-getriebenen Expression der wildtypischen *Drosophila*-*sws*-cDNA im *sws*¹-Hintergrund: *sws*¹; *p{sws}*⁵/*elav*

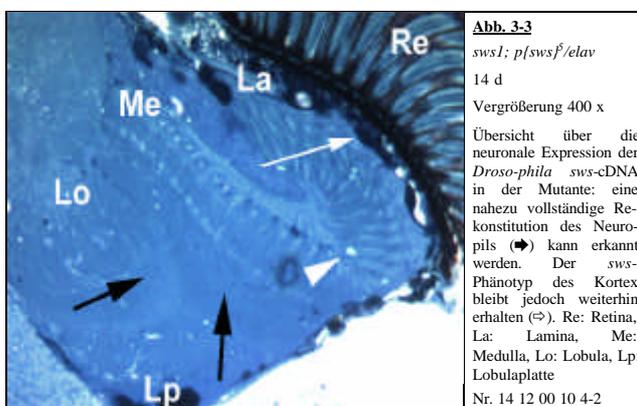
Zur Überprüfung der Funktion des Konstrukts wurde zuerst die Enzymaktivität gemessen. Die Phenyl-Valerat-Esteraseaktivität (PV-Aktivität) ergab für den Genotyp *sws*¹; *p{sws}*⁵/*elav* einen Wert von 54 nmol/min/mg Protein. Verglichen mit dem Aktivitätswert des *w*¹¹¹⁸-Stammes von 56 nmol/min/mg Protein und demjenigen der *sws*¹-Mutante von 5 nmol/min/mg Protein ergibt sich, unter der Grundannahme, daß die PV-Aktivität auch der *in vivo*-Aktivität entspricht, durch die Expression der *Drosophila*-cDNA eine Wiederherstellung der normalen Enzymaktivität.



Die Expression der *sws*-cDNA unter *elav*-Kontrolle beeinflusst den Phänotyp der *sws*¹-Mutation deutlich. In einem horizontalen Schnitt durch das Gehirn einer 14 Tage alten *sws*¹-Fliege (Abb. 3-1) sind als charakteristische Merkmale die im Neuropil auftretenden Vakuolen sichtbar (◀). Darüber hinaus zeigen sich große Löcher im Gewebe zwischen Retina und Lamina und dunkle Strukturen verteilt im gesamten Kortex des Gehirns (⇒).



Das Gewebe einer *w*¹¹¹⁸-Kontrollfliege (Abb. 3-2) zeigt im Alter von 14 Tagen eine homogene Struktur der Neuropile und des Kortex.

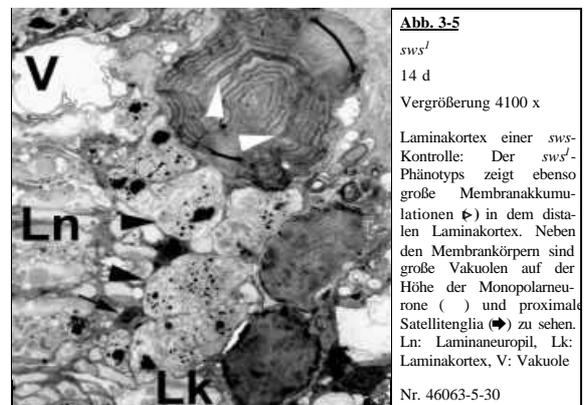
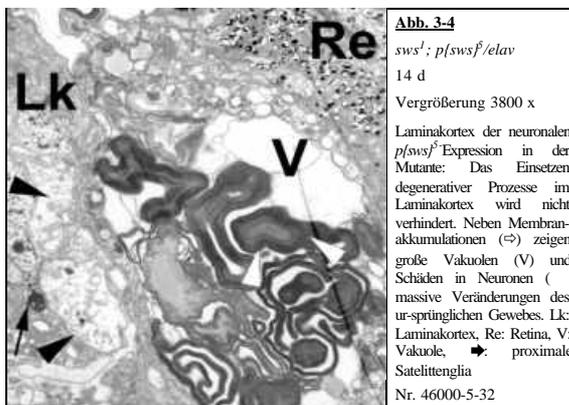


Im Vergleich zu diesen beiden Phänotypen erzeugt die induzierte Expression der *Drosophila*-cDNA unter Kontrolle des neuronalen *elav*-Treibers einen histologischen Mischtyp: Die Bereiche des Neuropils einer 14 Tage alten Fliege des Genotypes *sws*¹; *p{sws}*⁵/*elav* (Abb. 3-3) erscheinen, verglichen mit der Erhaltung des Gewebes einer Kontrolle (Abb. 3-2), weitgehend wildtypisch (▶). Ver-

einzelte Gewebestörungen (▷) können auch Fixierungsartefakte sein und sind nicht zwingend auf den *sws*¹-Hintergrund zurückzuführen. Damit konnte zumindest für die Neuropil-Region gezeigt werden,

daß das *p{UAS-sws}*-Konstrukt zu einer Rettung des *sws*-Phänotyps führt. Anders erscheint die Situation hingegen im Kortex der *sws¹; p{sws⁵}/elav*-Fliege (Abb. 3-3). Im Medulla- und im Laminakortex finden sich, wie in der *sws¹*-Mutante (Abb. 3-1), dunkle Materialansammlungen (Abb. 3-3, ⇨). Ob es sich dabei tatsächlich um vergleichbare Strukturen handelt, kann erst durch den Vergleich der Ultrastruktur belegt werden. Darüber hinaus ist das Gewebe des Medulla- und Laminakortex in *sws¹; p{sws⁵}/elav*-Individuen vielfach von unregelmäßigen Vakuolen unterbrochen, ein Phänotyp, der neben den Materialakkumulationen für die *sws¹*-Mutation charakteristisch ist (Abb. 3-1).

Inwieweit die induzierte Expression der *Drosophila*-cDNA die im Kortex liegenden Zellkörper der Neurone und die in diesem Bereich lokalisierten Gliazellpopulationen beeinflusst, wird anhand elektronenmikroskopischer Präparate untersucht. Als Vergleichsbasis dient in diesem Fall der Laminakortex zwischen Laminaneuropil und Retina.



Es besteht eine deutliche Übereinstimmung zwischen den im *sws¹; p{sws⁵}/elav*-Genotyp und in *sws¹*-Mutanten beobachteten Gewebeveränderungen des Laminakortex. Trotz der Expression der *Drosophila*-cDNA in Mutanten treten im distalen Kortex Strukturen auf, die vermutlich den Materialansammlungen entsprechen, die im Semidünnschnitt auffällig sind (Abb. 3-1, Abb. 3-3). Es handelt sich hierbei um vielfach gewickelte, konzentrische Membranakkumulation (Abb. 3-4, Abb. 3-5, ⇨). Diese Strukturen bilden sich schon in der späten Puppe (Kretschmar et al., 1997) und sind vermutlich auf Pseudocartridge- und Fensterglia zurückzuführen, deren Zytoplasma durch Membranablagerung vollständig verdrängt wurde. Ähnliche Strukturen sind in der Neuropathologie bislang nicht beschrieben worden. Die Feinstruktur der Membrankörper zeigt zwei deutlich zu unterscheidende Membranperiodizitäten. Es existieren kompakte und lockere Packungen von Membranstapeln (Abb. 3-5, ⇨). Die Periodizität der lockeren Variante beträgt 50-60 nm, die der dichten Variante 23-33 nm. Letztere entspricht damit in etwa der in Ultrastrukturstudien bestimmten Membranperiodizität der lockeren Variante des Myelins, dem sogenannten *split-Myelin* (Geren, 1954). Es besitzt eine 1,5 bis 3 mal so lange Membranperiodizität wie normales Myelin und ist im Zusammenhang mit verschiedenen Encephalopathien (Aleu et al., 1963) oder dem Guillan-Barré-Syndrom (Hirano et al., 1971) beschrieben worden.

Daneben kommt es im Kortex von diesen Tiere zur Bildung großer Vakuolen (Abb. 3-4, V), die ebenso charakteristisch für die *sws¹*-Mutation sind (Abb. 3-5, V). Ob sich hierbei das Membranmaterial aus dem Gewebe im Zuge der Präparationen herausgelöst hat, oder die Vakuolen durch eine „Schrumpfung“ des ursprünglich vorhandenen Gewebes entstanden sind, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Es hat aber den Anschein, daß die Vakuolen der *sws¹; p{sws⁵}/elav*-Fliege (Abb. 3-4) durch die Umwandlung des ursprünglich vorhandenen Gewebes in die konzentrischen Membrankörper entstanden sein könnten. Die Zellkörper der Monopolarneurone zeigen ebenfalls noch deutliche Degenerationserscheinungen (Abb. 3-4,). Die neuronale Expression von *SWS* durch *elav-GAL4* vermag in diesem Falle die Degeneration der Monopolarneurone nicht zu verhindern.

Die Frage ob die Membranakkumulationen auf die Degeneration eines spezifischen Gliazelltypes zurückzuführen sind, kann nur anhand anatomischer Abwägungen diskutiert werden. Die gliale Herkunft der Strukturen vorausgesetzt (Kretzschmar et al., 1997), verbleiben in dieser Region lediglich die proximale und distale Satellitenglia, die Fensterglia und die Pseudocartridgeglia als mögliche Ursprünge für derartige Strukturen. Sowohl in *sws¹; p{sws⁵}/elav*-Fliegen, als auch in *sws¹*-Mutanten sind zumindest vereinzelt Zellen der proximalen Satellitenglia zu erkennen (Abb. 3-4, Abb. 3-5, ➔). In keinem der untersuchten Präparate konnten jedoch Fenster- und/oder Pseudocartridgeglia in nennenswertem Umfang nachgewiesen werden. Es besteht der begründete Verdacht, daß die beobachteten konzentrischen Membranstrukturen in beiden Genotypen auf veränderte Fenster- und Pseudocartridgegliazellen zurückgeführt werden können. Beide Gliapopulationen gewährleisten durch eine aufwendige Faltung und Ausgestaltung ihrer Zelloberfläche Separations- und Transportfunktionen der Retina und der Lamina (Saint Marie und Carlson, 1983). Der hochaktive Membranmetabolismus dieser beiden Gliatypen unterliegt möglicherweise einem sensiblen Steuerungsmechanismus, der durch das Fehlen des *SWS*-Proteins besonders leicht gestört werden kann. Andere, nicht an einem intensiven Membranmetabolismus teilhabende Gliapopulationen scheinen auch gegenüber dem Fehlen des *SWS*-Proteins nicht derartig empfindlich zu sein. So treten in den Stämmen *sws¹; p{sws⁵}/elav* und *sws¹* außerhalb des Laminakortex derartige Membranakkumulationen nur sporadisch auf und die Vielzahl der Gliazellen erscheint nicht beeinträchtigt.

Damit könnte die Degeneration der Monopolarneurone nicht nur auf eine intrinsische Fehlfunktion zurückzuführen sein, sondern sekundär durch das Absterben der sie umgebenden Gliazellen induziert werden. Die Rettung des glialen Anteils des *sws*-Phänotyps durch ein geeignetes Expressionssystem könnte diesbezüglich Auskunft erteilen (siehe Kapitel 3.2.1.2. und 3.2.2.2).

Im Gegensatz zum weiterhin bestehenden *sws*-Phänotyp im Laminakortex, ergibt sich im Medullaneuropil und in den zentralen Gehirnbereichen, bedingt durch die neuronale Expression der *Drosophila*-cDNA, eine deutliche Änderung des histologischen Erscheinungsbildes.

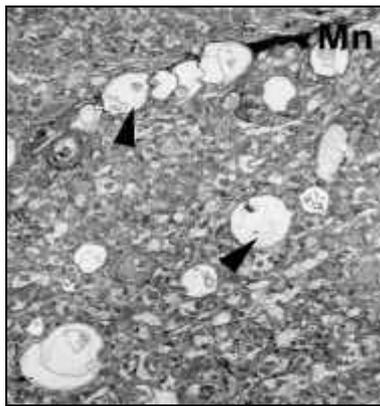


Abb. 3-6 *sws*¹ 14 d
Medullaneuropil (Mn) einer *sws*¹-Fliege: Kennzeichen axonaler Degeneration sind die durch die *sws*¹-Mutation hervorgerufenen Vakuolen der Neuropile ().
Vergrößerung 4000 x Nr. 46067-5-13

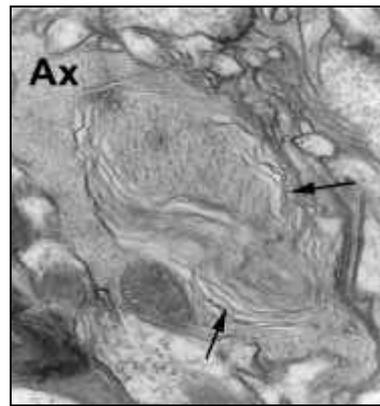


Abb. 3-7 *sws*¹ 14 d
Medullaneuropil einer *sws*¹-Fliege: Die multilamellaren Strukturen () in Axonen (Ax) des Neuropils sind ein weiteres charakteristisches Merkmal der axonalen Degeneration.
Vergrößerung 91000 x Nr. 46056-5-14

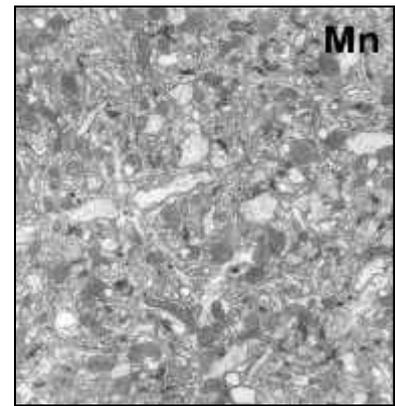


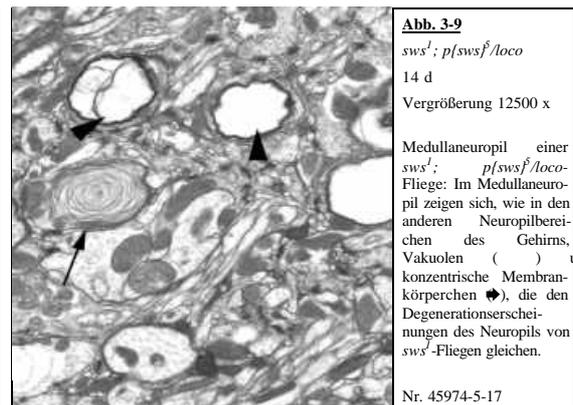
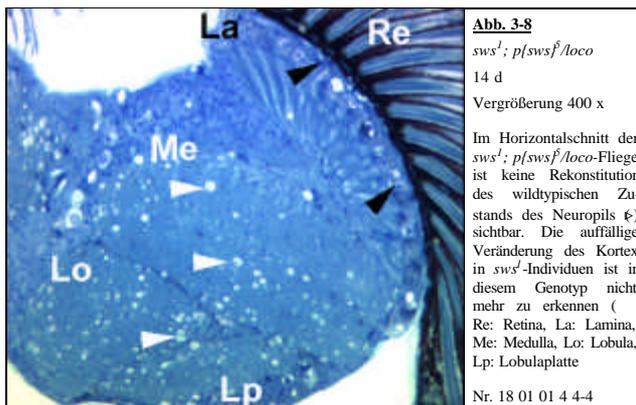
Abb. 3-8 *sws*¹; *p{sws}⁵/elav* 14 d
Medullaneuropil (Mn) einer *sws*¹-Fliege: Durch die neuronale Expression der *Drosophila-cDNA* wird im *sws*-Hintergrund der wildtypische Zustand des Neuropils wieder hergestellt.
Vergrößerung 4500 x Nr. 45992-5-49

Der durch das Fehlen des *SWS*-Proteins verursachte, neuronale Phänotyp (Abb. 3-6), konnte durch die Expression der *Drosophila-cDNA* unter Kontrolle des *elav*-Promotors wieder in den wildtypischen Zustand überführt werden: Im Medullaneuropil von 14 Tage alten *sws*¹; *p{sws}⁵/elav*-Individuen (Abb. 3-8) können die für die *sws*¹-Mutante typischen Vakuolen (Abb. 3-6,) nicht mehr entdeckt werden. Ein weiteres, für den *sws*-Phänotyp charakteristisches Merkmal, konnte durch die neuronale Expression der *sws-cDNA* beseitigt werden: In *sws*-Individuen bilden lockere, konzentrische Membranen in Zellkörpern und in den axonalen Ausläufern (Abb. 3-7,) von Neuronen multilamellare Strukturen („whorls“). Diese *whorls* treten in *sws*-Individuen in allen neuronalen Kompartimenten als pleomorphe Strukturen auf. Ihre Gestalt erstreckt sich von mehrfachen, lockeren Umhüllungen zytoplasmatischer Bestandteile bis hin zu kompakten, konzentrischen Sphäroiden in Axonen. Derartige Strukturen konnten in *sws*¹; *p{sws}⁵/elav*-Individuen nicht mehr nachgewiesen werden.

Die neuronale Expression der *Drosophila-sws-cDNA* im mutanten Hintergrund führt somit allem Anschein nach zu einer Wiederherstellung wildtypischer Verhältnisse der axonalen Bestandteile des Gehirns, vermag aber nicht die Degeneration von kortikalen Gliazellen und die möglicherweise damit verbundene Degeneration der Monopolarneurone aufzuheben.

3.2.1.2 *loco*-getriebene Expression der wildtypischen *sws*-cDNA im *sws*¹-Hintergrund: *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco*

Als nächstes wurde versucht, das *Drosophila*-Gen spezifisch in Gliazellen zu exprimieren. Dafür eignet sich vor allem der *loco*-*GAL4*-Treiber-Stamm. Erstaunlicherweise führt *loco*-getriebene *sws*-Expression in Mutanten zu einer hohen Letalität: Obwohl ausreichend Individuen für die histologischen Untersuchungen erzeugt werden konnten, wurde die für die Aktivitätsmessungen benötigte Menge jedoch weit unterschritten. Daher wird die PV-Aktivität des Genotyps *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco* theoretisch bestimmt: Aus der Aktivitäts-Differenz der *loco*-getriebenen Expression im wildtypischen Hintergrund (*w*; *p{sws}*¹⁰/*loco* = 990 nmol/min/mg Protein) und derjenigen der Kontrolle (*w*¹¹¹⁸ = 56 nmol/min/mg Protein) ergibt sich ein extrapoliertes Wert der PV-Aktivität des Genotyps *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco* von ~940 nmol/min/mg Protein. Hiermit liegt ein Aktivitätswert vor, der trotz des mutanten *sws*¹-Hintergrundes funktionell eine massive Überexpression darstellt. Die Folgen dieses veränderten Expressionsprofils des Genotyps *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco* wird nun im Folgenden dargelegt.



Der Prozess, welcher zu der Vakuolisierung des Neuropils in *sws*¹-Fliegen führt, konnte in keinem der untersuchten Individuen des Genotyps *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco* durch die ektopische Glia-Expression der *Drosophila*-*sws*-cDNA aufgehalten werden. Im Semidünnschnitt sind in den optischen Loben und in den zentralen Bereichen des Gehirns weit verstreut Vakuolen sichtbar (Abb. 3-8, ⊖). Die in der *sws*¹-Mutation (Abb. 3-1) und in der *sws*¹; *p{sws}*⁵/*elav*-Linie (Abb. 3-3) deutlich sichtbaren Membranakkumulationen an der Grenze zwischen Retina und Lamina sind jedoch im lichtmikroskopischen Präparat von *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco*-Individuen nicht zu erkennen (Abb. 3-8, ⊖).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen diese Diagnose nur zum Teil. Die in den lichtmikroskopischen Präparaten erkennbare Vakuolenbildung im Bereich des Neuropils zeigt sich gleichfalls in der ultrastrukturellen Analyse (Abb. 3-9, ⊖). Neben den Vakuolen sind im Bereich der Neuropile häufig Membransphäroide zu erkennen (Abb. 3-9, ⬛). Damit zeigen die axonalen Bestandteile der Neuropile die beiden Hauptcharakteristika des *sws*-Phänotyps. Die gliale Expression der *sws*-cDNA hat demnach keinerlei sichtbaren Einfluss auf die Degeneration des Neuropils.

Die lichtmikroskopische Analyse des Genotyps *sws¹; p{sws⁵/loco* (Abb. 3-8) lässt, im Vergleich zu dem *sws*-Phänotyp, eine Verbesserung des kortikalen Gewebezustands vermuten. Die Ultrastrukturanalyse der *sws¹; p{sws⁵/loco*-Linie deckt demgegenüber jedoch erhebliche Schäden innerhalb des Kortex und des Neuropils auf.

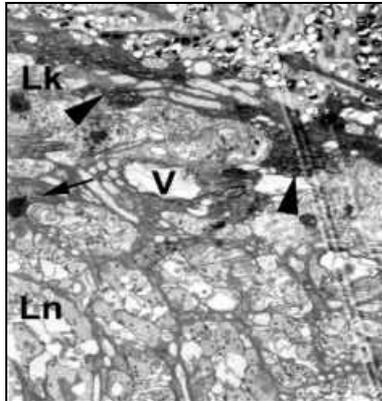


Abb. 3-10 *sws¹; p{sws⁵/loco* 14 d
Übersicht über den Laminakortex: Die *loco*-gesteuerte Expression der *sws*-cDNA führt zu massivem Auftreten zytosolischer Vesikel in Fenster- und Pseudocartridgeglia (). Lk: Laminakortex, Ln Laminaneuropil.
Vergrößerung 3500 x Nr.45967-4-5

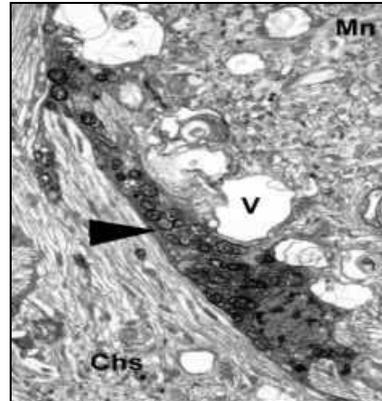


Abb. 3-11 *sws¹; p{sws⁵/loco* 14 d
Übersicht über das äußere Chiasma: Außerhalb des Kortex tritt dieser Degenerationsphänotyp () auch in den Zellen der Riesenglia am äußeren Chiasma (Chs) auf. Im Medullaneuropil (Mn) sieht man die für die *sws¹*-Mutante typischen Vakuolen (V).
Vergrößerung 3000 x Nr. 45977-5-57

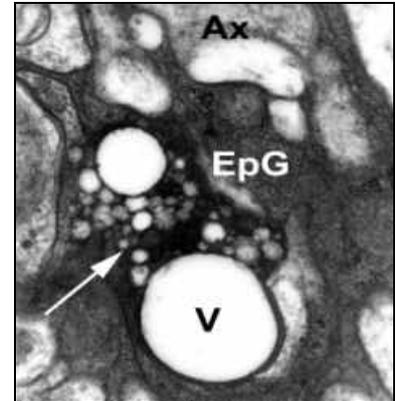


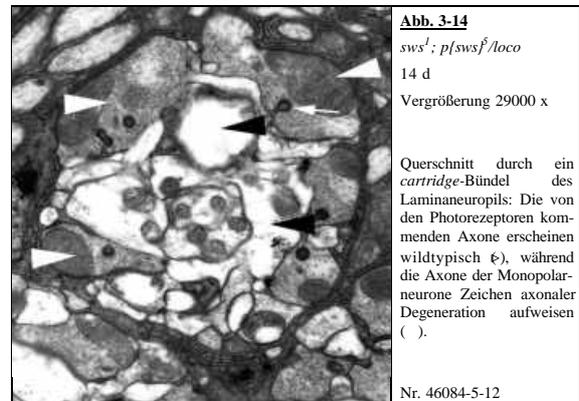
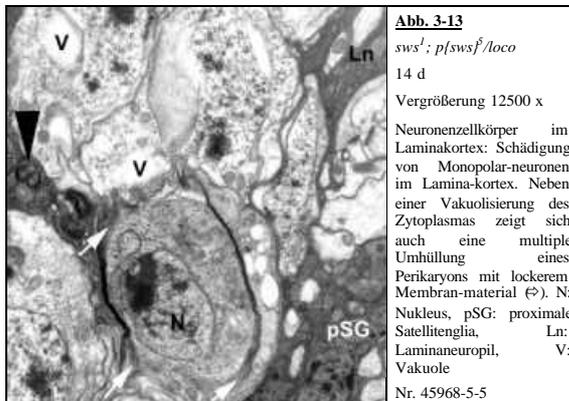
Abb. 3-12 *sws¹; p{sws⁵/loco* 14 d
Schädigung der Epithelialglia: In Fliegen des *sws¹; p{sws⁵/loco*-Genotyps treten lysosomale Vesikel (⇨) in Zellen der Epithelialglia (EpG) des Laminaneuropils auf. Ax: Axon.
Vergrößerung 110000 x Nr. 46074-5-40

Besonders auffällig ist die, im Lichtmikroskop nicht zu erkennende Veränderung von Gliazellen, deren Zytoplasma in *sws¹; p{sws⁵/loco*-Individuen nahezu vollständig mit Vesikeln aufgefüllt sind. Davon betroffen sind neben der Pseudocartridge- und Fensterglia (Abb. 3-10,) auch die Riesenglia des äußeren Chiasmas (Abb. 3-11,) und die Epithelialglia des Laminaneuropils (Abb. 3-12). Es handelt sich hierbei um heterogene, lysosomale Vesikel, die teils mit homogenem Material von unterschiedlicher Elektronendichte, teils mit konzentrischen, lockeren Membranknäuel gefüllt sind. Entgegen der weitreichenden Degeneration der, den Monopolarneuronen distal gelegenen, Gliazellen, erscheinen die Zellkörper der proximalen Satellitenglia weitgehend normal (Abb. 3-10, ►).

Im Falle homogener Einschlüsse könnte es sich um zytoplasmatische oder fettige Einschlüsse handeln. Lipideinschlüsse können je nach Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und Präparationsmethoden im elektronenmikroskopischen Bild als helle, transluzente bis hin zu schwarzen elektronendichten Strukturen erscheinen (Metha und Ghadially, 1973). Derartige Einschlüsse sind besonders deutlich in Epithelialglia zu sehen (Abb. 3-12, ⇨). *sws¹; p{sws⁵/loco* ist der einzige Genotyp, in dem eine eindeutige Veränderung der Epithelialglia beobachtet werden kann und darüber hinaus vermutlich der einzige gesicherte *ektopische* Expressionsphänotyp: Die *in situ*-Hybridisierungen (Abb. 2-3) zeigen, daß in den Epithelialglia mit größter Wahrscheinlichkeit keine natürliche *sws*-Expression stattfindet und die *loco*-getriebene Expression der *Drosophila*-cDNA in der Epithelialglia daher eine *zusätzliche* Expression darstellt.

Die Zellkörper der Neurone zeigen in *sws¹; p{sws⁵/loco*-Individuen, insbesondere im Laminakortex, deutliche Degenerationsmerkmale. Die in Abb. 3-13 gezeigte Gruppe von Monopolarneuronen weist neben fleckiger Aufhellung und vereinzelt Vakuolen (V) auch eine multiple Umhüllung des

Perikaryons auf (\Rightarrow). Die distal der Monopolarzellen gelegenen Gliazellen zeigen den weiter oben beschriebenen vesikulären Phänotyp (). Proximal der Monopolarzellen sind phänotypisch normale Satellitenglia zu sehen (pSG).



Die Degeneration der Monopolarneurone zeigt sich auch im Erscheinungsbild ihrer Axone im Laminaneuropil. Zusammen mit acht Axonen der Photorezeptoren durchspannen die, zu einer *cartridge*, einem axo-glialen Bündel, verbundenen Axone von fünf Monopolarzellen die Lamina. Die Abbildung 3-14 zeigt den Querschnitt einer solchen *cartridge* mit den Querschnitten der Axone von Monopolarzellen () und den Querschnitten der Axone der Photorezeptorzellen (\blacktriangleright). Letztere sind anhand ihrer spezifischen axo-glialen Zellkontakte mit der Epithelialglia, den *capitate junctions* (Abb. 3-14, \Rightarrow), leicht zu identifizieren. Während die Axone der Photorezeptoren wildtypisch erscheinen, ist eine Abweichung der Monopolarzellaxone vom wildtypischen Status an ihrem fleckig aufgehellten Lumen mit Restbestandteilen des axonalen Zytoskeletts deutlich zu erkennen.

3.2.1.3 Zusammenfassung: Analyse der induzierten Expression der *Drosophila*-*sws*-cDNA im *sws*¹-Hintergrund

Die partielle Wiederherstellung wildtypischer Gewebeerhältnisse im *sws*¹-Hintergrund durch die Expression der *Drosophila*-cDNA unter Kontrolle des *elav*-Treibers beweist hinreichend die Verantwortlichkeit des SWS-Proteins für den beschriebenen Phänotyp der *sws*-Mutation in *Drosophila* (Kretzschmar et al., 1997).

Aufgrund der *elav*-getriebenen Expression der wildtypischen cDNA konnte die Vakuolenbildung im Neuropil von *sws*¹-Fliegen verhindert werden. Die neuronale Produktion des SWS-Proteins stellt somit eine obligatorische Grundvoraussetzung für ein funktionierendes Nervengewebe dar. Die mangelnde Fähigkeit, den glialen Anteil des *sws*-Phänotyps durch *elav*-gesteuerte Expression der *sws*-cDNA in den wildtypischen Zustand zu überführen, legt eine eigenständige Expression des *sws*-Gens in Gliazellen nahe, die nicht durch die benachbarte Expression in Neuronen ersetzt werden kann.

Eine Rettung des glialen Anteils des *sws*-Phänotyps durch Expression der *Drosophila*-cDNA unter Kontrolle des *loco*-Treibers im *sws*¹-Hintergrund würde eine eigenständige Funktion des SWS-Proteins

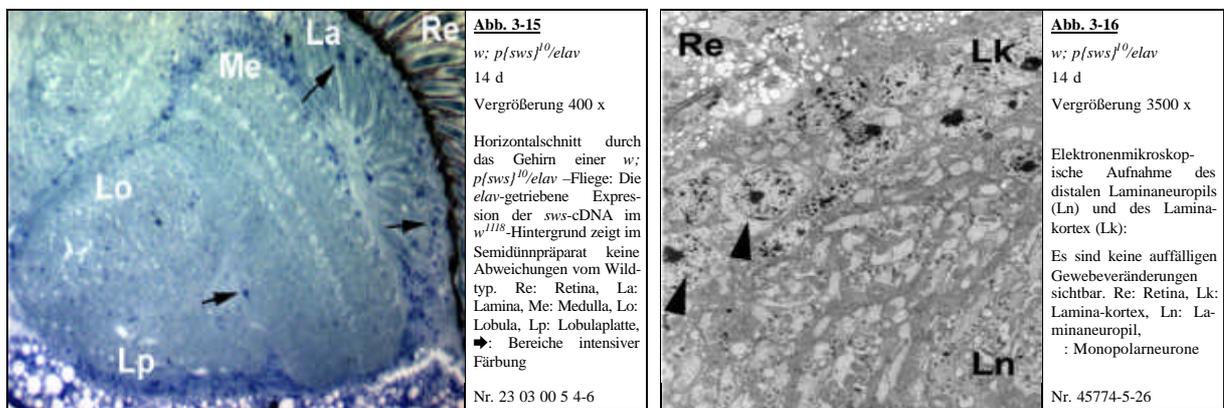
in Gliazellen unterstreichen, scheidet aber an der Stärke des glialen *loco*-Treibers. Die *in vitro* Aktivität des *sws*-Genprodukts unter *loco*-Kontrolle liegt im *sws*¹-Hintergrund um das achtzehnfache über dem Wert der wildtypischen Aktivität. Daher stellt der in dem Genotyp *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco* zu beobachtende histologische Phänotyp der Gliazellen eine, bisher noch nicht beschriebene, Veränderung des Gewebes dar, die möglicherweise auf die Überexpression des SWS-Proteins in Gliazellen zurückgeführt werden kann. Da dieser Phänotyp aber auch durch synergistische Effekte des *sws*¹-Hintergrunds zusammen mit der glialen Expression verursacht werden kann, werden erst Überexpressionen im wildtypischen Hintergrund die Frage beantworten, ob es sich bei den beschriebenen Veränderungen um einen Überexpressionsphänotyp handelt (siehe 3.2.2.2).

Die gliale Produktion des SWS-Proteins in *sws*¹; *p{sws}*⁵/*loco*-Fliegen kann den Prozess, der nach dem Schlüpfen der Fliege zur Vakuolenbildung im Neuropilbereich des gesamten Gehirns führt, nicht aufhalten. Die Überexpression der *sws*-cDNA in Gliazellen einer *sws*¹-Fliege hat darüber hinaus aber auch keinen sichtbaren, verstärkenden Einfluss auf die neuronalen Strukturen des Gehirns. Bezüglich der Degeneration der Monopolarneurone kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob sie aufgrund des *sws*¹-Hintergrunds, oder möglicherweise sekundär als Folge der Degeneration der Gliazellen durch die unnatürlich hohe *sws*-Produktion Schaden erleiden.

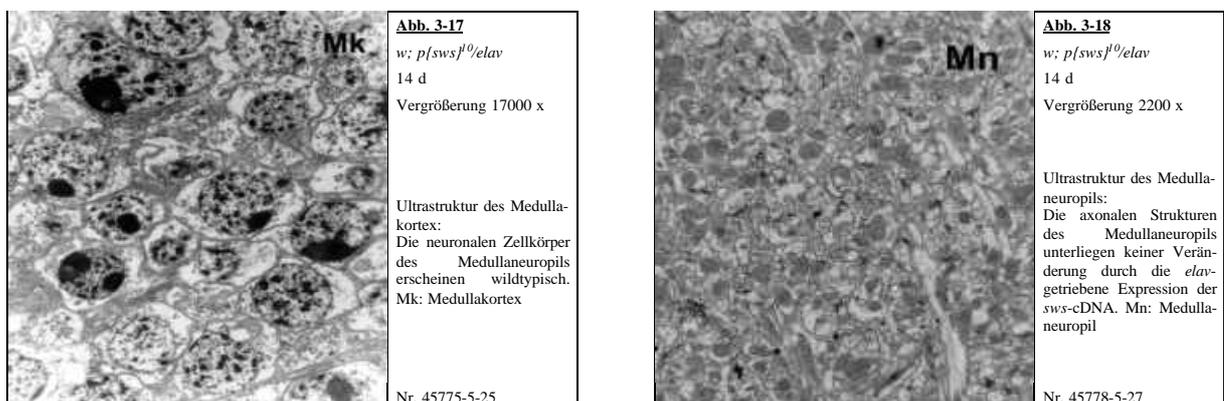
3.2.2 Untersuchung der Überexpression der *Drosophila*-cDNA im wildtypischen Hintergrund

3.2.2.1 Untersuchung der *elav*-getriebenen Expression der *Drosophila*-cDNA im wildtypischen Hintergrund: $w; p\{sws\}^{10}/elav$

In der nun folgenden Analyse ist, zusätzlich zu der normalen *in vivo*-Aktivität das p-Element $p\{sws\}^{10}$ mittels des *elav*-Treibers in allen Neuronen aktiv. Die Enzymaktivität des SWS-Proteins des Genotyps $w; p\{sws\}^{10}/elav$ wurde mit 160 nmol/min/mg Protein bestimmt. Dies stellt im Vergleich zur Aktivität der Kontrolle w^{1118} mit 56 nmol/min/mg Protein rund eine Verdreifachung des wildtypischen Wertes dar.



Die Überexpression der *Drosophila*-*sws*-cDNA durch die p-Element-Linie $p\{sws\}^{10}$ unter *elav*-Kontrolle zeigt keine auffälligen Veränderungen des Gewebes. Die in den Semidünnschnitten sichtbaren, vereinzelt dunkelblauen Zellkernanfärbungen stellen keine Färbungen dar, die im Sinne einer Apoptose gedeutet werden können (Abb. 3-15, \blacktriangleright), sondern stellen Färbeartefakte dar. Die elektronenmikroskopischen Präparate zeigen diesen Befund noch deutlicher. Der Überblick über die Grenzregion zwischen Retina und Lamina (Abb. 3-16) zeigt keine auffälligen Degenerationserscheinungen. Die Monopolarzellkörper () sehen weitgehend wildtypisch aus.



Auch in dem angrenzenden Bereich des Laminaneuropils (Ln) sind keine Abweichungen vom Wildtyp zu erkennen. Die Zellkörper des Medullakortex (Abb. 3-17) lassen, ebenso wie die axonalen Strukturen des Medullaneuropils (Abb. 3-18) keine Schäden, die auf eine Überexpression der *sws*-cDNA zurückzuführen wären, erkennen.

Eine neuronale Expression der *sws*-cDNA, die zu einer Verdreifachung der *in vitro*-Aktivität des SWS-Proteins führt, hat keine histologischen Veränderungen zur Folge. Ob neuronales Gewebe gegenüber einer noch weiter gesteigerten SWS-Produktion ebenso unempfindlich wäre, kann in diesem Zusammenhang nicht beantwortet werden, da hierzu eine quantitative Steigerung der *elav*-gesteuerten *GAL4*-Produktion notwendig wäre. Weitere Nachforschungen mit anderen neuronalen Treibern, wie zum Beispiel mit dem *Appl-Gal4*-Stamm, könnten jedoch Aufschluss darüber geben, ob es einen neuronalen Überexpressionsphänotyp der *sws*-cDNA in *Drosophila* gibt.

3.2.2.2 Untersuchung der *loco*-getriebenen Expression der *Drosophila*-cDNA im wildtypischen Hintergrund: $w; p\{sws\}^{10}/loco$

Die in allen Gliazellen mittels des *loco*-Treibers erzeugte *in vitro*-Aktivität des SWS-Proteins liegt bei 990 nmol/min/mg Protein und damit um den Faktor ~20 höher als die wildtypische Aktivität der w^{1118} -Kontrolle mit 56 nmol/min/mg Protein. Dieser Aktivitätszuwachs erscheint erheblich in Anbetracht der Tatsache, daß die geschätzte Anzahl der Gliazellen in Dipteren nur ungefähr ein Achtel der Anzahl der Neurone beträgt (Saint Marie und Carlson, 1984). Die Aktivitätssteigerung des gesamten Kopfgewebes beträgt den Faktor 20. Eine prozentuale Gleichverteilung der SWS-Aktivität zwischen Neuronen und Gliazellen im Wildtyp vorausgesetzt, ergäbe das für die Gliazellen im Gehirn von *Drosophila* eine Steigerung um den Faktor 130. Obwohl man sich vergegenwärtigen sollte, daß derartige Rechenexempel der Komplexität des natürlichen Geschehen selten Rechnung tragen, so verdeutlicht es doch, daß die *loco*-getriebene Expression der *sws*-cDNA eine erhebliche Veränderung des physiologischen Kontextes einer Zelle bedeutet.

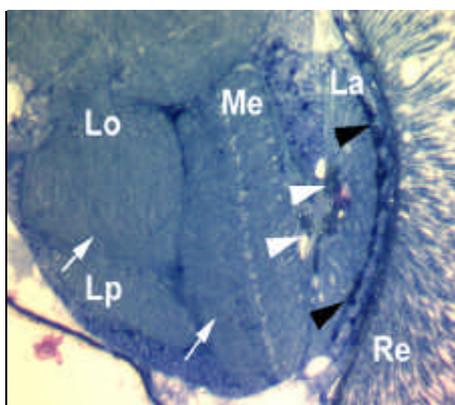


Abb. 3-19
 $w; p\{sws\}^{10}/loco$
 14 d
 Vergrößerung 400 x
 Lichtmikroskopische Übersicht einer $w; p\{sws\}^{10}/loco$ -Fliege: Die Expression der cDNA hinterläßt mit Toluidinblau anfärbare Bereiche in dem Laminakortex () und am Chiasma (→). Hier sind auch Vakuolen (↖) zu sehen. Die Neurofilamente erscheinen wildtypisch (↔). Re: Retina, La: Lamina, Me: Medulla, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte
 Nr. 01 03 00 4 4-8

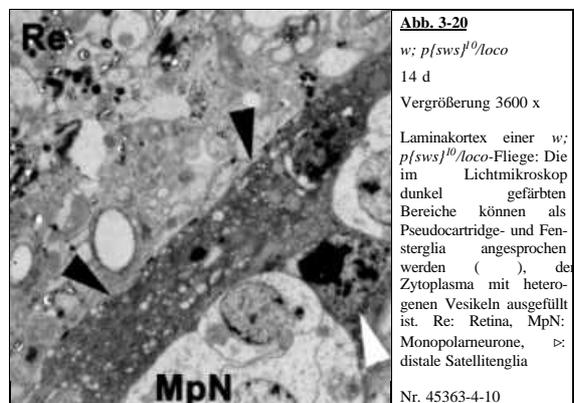


Abb. 3-20
 $w; p\{sws\}^{10}/loco$
 14 d
 Vergrößerung 3600 x
 Laminakortex einer $w; p\{sws\}^{10}/loco$ -Fliege: Die im Lichtmikroskop dunkel gefärbten Bereiche können als Pseudocartridge- und Fenesterglia angesprochen werden (), das Zytoplasma mit heterogenen Vesikeln ausgefüllt ist. Re: Retina, MpN: Monopolarnearone, ↖: distale Satellitenglia
 Nr. 45363-4-10

Wie in dem Semidünnschnitt Abb. 3-19 zu sehen ist, zeigt sich im Genotyp $w; p\{sws\}^{10}/loco$ eine deutliche, histologische Veränderung in der Lamina. Intensiv mit Toluidinblau gefärbte Bereiche ()

zeigen sich im Laminakortex und deuten auf degenerative Prozesse hin. Der proximale Anteil des Laminaneuropils weist insbesondere in näherer Umgebung des Chiasmas große Vakuolen auf (\triangleright). Die Neuropilanteile der Medulla (Me), der Lobula (Lo) und der Lobulaplatte (Lp) erscheinen wildtypisch. Diese schon im lichtmikroskopischen Bild erkennbaren Veränderungen werden durch die elektronenmikroskopische Analyse bestätigt.

Im elektronenmikroskopischen Präparat sieht man deutlich die pathologischen Veränderungen innerhalb der Gliazellen. Das Zytoplasma ist vollständig mit lysosomalen Vesikeln und spiralisierten Membranablagerungen (*whorls*) aufgefüllt. Von dieser Veränderung sind insbesondere die distal der Satellitenglia gelegenen Pseudocartridge- und Fensterglia-Schichten (Abb. 3-20, \triangleright), sowie die Riesengliazellen in der Umgebung des Chiasmas (Abb. 3-22, \triangleright) betroffen. Wie auch schon in der Beschreibung der vorhergegangenen Genotypen (Kapitel 3.2.1.1, Abb. 3-4, 3-5, Kapitel 3.2.1.2, Abb. 3-10) können vereinzelt wildtypisch erscheinende Zellen der proximalen Satellitenglia aufgefunden werden (Abb. 3-20, \triangleright), die offensichtlich von den Prozessen, die zur Veränderung der Gliazellen zwischen Monopolarneuronen (MpN) und Retina (Re) führen, nicht betroffen sind.

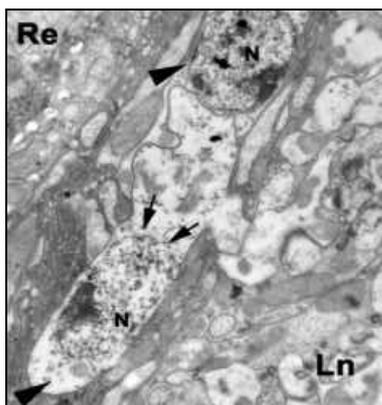


Abb. 3-21 *w; p[sws]⁰/loco* 14 d
Laminakortex einer *w; p[sws]⁰/loco*-Fliege: Hier sind degenerierende Monopolarneurone (○) an fleckiger Aufhellung des Zytoplasmas und beginnender Kariolyse (➡) zu erkennen. Re: Retina, Ln: Laminaneuropil.
Vergrößerung 12500 x Nr. 45961-4-11

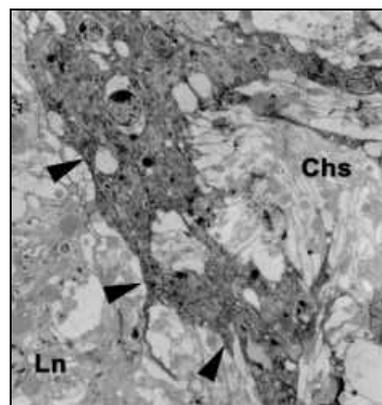


Abb. 3-22 *w; p[sws]⁰/loco* 14 d
Chiasma einer *w; p[sws]⁰/loco*-Fliege: Die Riesengliazellen des Chiasmas zeigen zytoplasmatische Vesikel in allen Bereichen des Zellkörpers (○). Chs: Chiasma, Ln: Laminaneuropil.
Vergrößerung 4000 x Nr. 45902-5-36

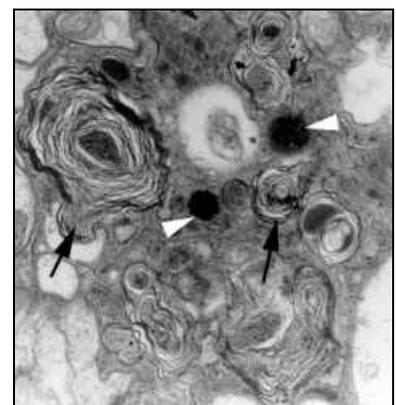


Abb. 3-23 *w; p[sws]⁰/loco* 14 d
Die Detailaufnahme einer Riesengliazelle veranschaulicht die heterogene Morphologie der Zelleinschlüsse.
Vergrößerung 36250 x Nr. 45371-5-38

Neben der Degeneration der Gliazellen kann man auch pathologische Veränderungen der neuronalen Zellkörper erkennen. Der in Abbildung 3-21 gezeigte Zellkörper eines Monopolarneurons (○) unterliegt der Kariolyse, daß heißt der Auflösung seiner Kernmembran und der Freisetzung des Chromatins in das Zytoplasma (➡). Das unklar strukturierte Plasma der Axone von Monopolarneuronen im Laminaneuropil (Ln) lässt gleichfalls auf eine Schädigung des Zellkörpers schließen.

Eine Detailaufnahme des Zytoplasmas einer Gliazelle des äußeren Chiasmas (Abb. 3-23) spiegelt die Heterogenität der Einschlüsse wieder: Im Zytoplasma finden sich elektronendichte Partikel (Abb. 3-23, \triangleright), die eine granuläre Konsistenz besitzen und in ihrer Erscheinung an *Lipofuscin* oder *Residualkörper* erinnern. Diese unverdauten Reste lysosomaler Hydrolyse akkumulieren im Menschen mit dem Alterungsprozess (Barden, 1969) in verschiedenen Geweben und sind neben Vertebraten

auch in Insekten beschrieben worden (Hodge, 1894). Eine ähnliche Morphologie weisen jedoch auch manche Glykogeneinschlüsse auf, die in dieser Form als *Glykogenrosetten* bezeichnet werden.

Auffällig sind jene Einschlüsse, die aus vielen konzentrischen Membranen bestehen (Abb.: 3-23, ➡). Das Erscheinungsbild dieser *whorls* in den hier untersuchten Gliazellen entspricht den, in Neuronen im *sws¹*-Hintergrund (Abb. 3-7, ➡) und in dem Genotyp *sws¹; p{sws⁵/loco* (Abb. 3-9, ➡) beschriebenen Strukturen. Diese myelinoiden *whorls* sind hinsichtlich ihrer heterogenen Gestalt und ihrer Größe nicht mit den großen Membranakkumulationen (Kapitel 3.2.1.1 Abb. 3-4, 3-5) im *sws¹*-Hintergrund zu vergleichen.

Ihr Durchmesser beträgt zwischen 0,5 und 1,5 µm, ihre Membranperiodizität beträgt zirka 30 nm. In manchen Fällen schließen sie granuläre Materie oder ein degenerierendes Mitochondrium mit ein. Vergleichbare Strukturen sind als Myelinosomen (oder *MCBs: membranous cellular bodies*) im Menschen beschrieben worden. Sie treten insbesondere in Zellen eines alveolaren Karzinoms und in Zellen, die Erythrozyten oder ihre Abbauprodukte phagozytiert haben, auf (Ghadially, 1979). Ein weiterer Entstehungsmechanismus von Myelinosomen wird als *drug-induced-phospholipidosis* bezeichnet: In diesem Falle verändern Pharmaka (*Amiodarone*) die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Bestandteilen der Zellmembranen und erzeugen dadurch Myelinosomen, die wiederum klinische Phänomene von der Leberdysfunktion (Poucell et al., 1984) bis hin zu Neuropathien (Butany et al., 1983) induzieren. In solchen oder ähnlichen Fällen spricht man in der Literatur von „myelinoiden“ Strukturen.

Manche Insekten, insbesondere solche, die schnelle Fluchtreaktionen aufgrund eines gestiegenen Beute-Drucks durch ihre Fressfeinde entwickeln mussten, haben Isolationshüllen ihrer Axone entwickelt, die alle electrophysiologischen Eigenschaften von Myelinscheiden besitzen (Lenz et al., 2000). In marinen Invertebraten konnten sogar die schnellsten Leitungsgeschwindigkeiten des gesamten Tierreichs gemessen werden (Xu et al., 1999). In *Drosophila melanogaster* ist hingegen noch kein zum Myelin der Vertebraten verwandtes Gen gefunden worden. Doch auch die im Menschen beschriebenen „myelinoiden“ Figuren sind aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen zusammengesetzt und müssen nicht zwingender Weise auf einen Defekt des Myelinmetabolismus hindeuten.

Erst die Bestimmung der Komponenten, aus denen diese Partikel bestehen, lässt eine Einengung des ihnen zugrunde liegenden Systemdefekts zu. Somit sind den Interpretationen des lysosomalen Phänotyps in Gliazellen nach Überexpression der *sws*-cDNA Grenzen gesetzt, solange man noch nicht weiß, welche Substanzakkumulation zu den beobachteten Merkmalen führt. Es scheinen aber Signale die Zelle zu veranlassen, sich selbst zu verdauen oder andere Mechanismen führen zu einer übermäßigen Aufnahme von extrazellulärem Material, wie es zum Beispiel für die Aufnahme der Myelinscheidenreste nach Degeneration eines Nerven beschrieben ist (Schroder et al., 1999). Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß im Nerven die oben diskutierten Lysosomen nur eine Vorstufe von Myelinosomen sind. Untersuchungen der Ultrastruktur eines Femur-Nerven der Ratte während

Waller'scher Degeneration ergaben, daß 10-14 Tage nach der Sektion des Nerven unstrukturierte Fettröpfchen als Einschlüsse auftraten, während in den späteren Phasen der Degeneration die Lipideinschlüsse lamellaren Membrankörpern gewichen sind (Lassmann et al., 1978).

All diese Strukturen ähneln deutlich denen, die im Kapitel 3.2.1.2 als Folgen einer *loco*-gesteuerten Überexpression der *sws*-cDNA im *sws¹*-Hintergrund beschrieben worden sind. Es spricht somit viel dafür, daß der veränderte Phänotyp von Gliazellen in den Genotypen *sws¹*; *p{sws⁵/loco* und *w*; *p{sws¹⁰/loco* einen Überexpressionsphänotyp darstellt, der aber ebenso wie in den Genotypen *sws¹*; *p{sws⁵/elav* und *sws¹* in den Membranmetabolismus von Gliazellen eingreift. Anders als in den Genotypen *sws¹* und *sws¹*; *p{sws⁵/elav* sind in der Überexpression aber neben den Pseudocartridge- und Fensterglia auch die das äußere Chiasma umgebende Riesenglia in die phänotypische Veränderung einbezogen.

3.2.2.3 Zusammenfassung der Resultate der *sws*-cDNA-Expression im wildtypischen Hintergrund

Die *elav*-gesteuerte Überexpression der *sws*-cDNA in den Neuronen des Gehirns von *Drosophila*, welche in einer Verdreifachung der *in vitro*-Aktivität resultiert, hat keinerlei histologische Veränderungen zu Folge. Neuronen scheinen somit auf einen Mangel des *SWS*-Proteins mit einem deutlichen und charakteristischen *sws*-Phänotyp zu reagieren, während sie aufgrund der Überproduktion des *SWS*-Proteins keine signifikanten *morphologischen* Änderungen zeigen. Da Fliegen des Genotypes *w*; *p{sws¹⁰/elav* auch keine auffälligen Abweichungen ihres Verhaltens an den Tag legen, ist des weiteren, nach bisherigem Kenntnisstand, davon auszugehen, daß die Überexpression der *sws*-cDNA in Neuronen keine Änderungen der *neurologischen* Funktion zur Folge hat.

Dem gegenüber zeigt die *loco*-getriebene Expression der *sws*-cDNA im wildtypischen Hintergrund einen deutlichen pathologischen Phänotyp. Entgegen den großen und durch konzentrisch-parallele Ablagerung gebildeten Membrankörpern, die anstelle der Pseudocartridge- und Fensterglia im *sws¹*- und *sws¹*; *p{sws⁵/elav*-Genotyp gebildet werden, reagieren die Zellen der Pseudocartridge- und Fensterglia auf die Überexpression der *sws*-cDNA mit Bildung vielgestaltiger, zytoplasmatischer Vesikel. Diese vesikulären Strukturen gleichen den zytoplasmatischen Bildungen der Pseudocartridge- und Fensterglia in dem Genotyp *sws¹*; *p{sws⁵/loco* und stellen daher aller Wahrscheinlichkeit nach einen Überexpressionsphänotyp dar, der ebenso wie die *sws¹*-Mutation den Membranmetabolismus spezifischer Gliazell-Populationen stört.

3.3 Funktionelle Untersuchung des *sws*-Orthologen der Maus: *m-nte*

Um zu überprüfen, ob neben den starken strukturellen Homologien zwischen dem *Drosophila melanogaster*-SWS und dem NTE der Maus, die induzierte Expression der Maus-cDNA (*m-nte*) vergleichbare histologische Phänotypen erzeugt, wurde die wildtypische Maus cDNA unter Kontrolle der UAS-Sequenz mit denselben Treibern wie das *sws*-Gen von *Drosophila melanogaster* im wildtypischen und im mutanten Hintergrund exprimiert und die histologischen Veränderungen verglichen. Wenn die induzierte Expression vergleichbare histologische Veränderungen hervorruft, kann neben der Übereinstimmung der Sequenzdaten eine funktionelle Identität des *Vertebraten*- und *Invertebraten*-Proteins angenommen werden.

3.3.1 Untersuchung der *elav*-getriebenen Expression der *Maus-nte*-cDNA im *sws*¹-Hintergrund: *sws*¹; *p{m-nte}*¹³/*II*; *elav*/*III*

Um die *in vitro*-Aktivität des NTE-Proteins der Maus mit dem Protein von *Drosophila* vergleichen zu können, wurde auch hier versucht, die PV-Aktivität der neuronalen Expression zu ermitteln. Da von dem Stamm *sws*¹; *p{m-nte}*¹³/*II*; *elav*/*III* nicht genügend Individuen für eine Messung der PV-Aktivität erhalten werden konnten, wird auch hier, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, auf eine Extrapolation der PV-Aktivität zurückgegriffen. Die aus den *in vitro* ermittelten PV-Aktivitäten der Stämme *w*¹¹¹⁸ (56 nmol/min/mg Protein) und *w*, *p{m-nte}*¹³/*II*; *elav*/*III* (518 nmol/min/mg Protein) resultierende Aktivität des Stammes *sws*¹; *p{m-nte}*¹³/*II*; *elav*/*III* liegt mit 462 nmol/min/mg Protein um ein Achtfaches höher als der wildtypische Wert. Damit stellt dieser Stamm seitens seiner *in vitro*-Aktivität eine neuronale Überexpression dar, deren Aktivität sogar noch höher liegt als die *elav*-getriebene Überexpression der *Drosophila*-cDNA im wildtypischen Hintergrund (160 nmol/min/mg Protein).

Die histologische Untersuchung des Stammes *sws*¹; *p{m-nte}*¹³/*II*; *elav*/*III* zeigt einen mit den Ergebnissen in Kapitel 3.2.1.1 (*sws*¹; *p{sws}*⁵/*elav*) vergleichbaren, histologischen Mischphänotyp:

Im lichtmikroskopischen Bild erscheinen die Neuropilanteile wildtypisch (Abb. 3-24, ►). Damit scheint es sich zu bestätigen, daß die *elav*-getriebene Expression der *Drosophila sws*-cDNA und der Maus *nte*-cDNA den Phänotyp der Neuropil-Bereiche in der *sws*¹-Mutation vollständig revertiert. Im Laminakortex hingegen, zeigen membranöse Ablagerungen und Vakuolisierung, wie sie auch in den Genotypen *sws*¹ und *sws*¹; *p{sws}*⁵/*elav* zu beobachten sind (Abb.: 3-1, 3-3), eine erhebliche funktionelle Störung der Zellverbände. Die Analyse der Ultrastruktur untermauert diese Ergebnisse.

Im Medullaneuropil (Mn) sind, stellvertretend für alle anderen Bereiche axonaler Verschaltung, keine Vakuolen oder andere abnormale Zellstrukturen (Abb.: 3-26) zu sehen. Sie sind mit dem wildtypischen Gewebe vergleichbar. Die im Lichtmikroskop deutlich zu erkennende Schädigung des

Laminakortex spiegelt sich ebenso in elektronenmikroskopischen Aufnahmen wieder. Die Gliazellen der Lamina, insbesondere die Pseudocartridgeglia und Fensterglia sind nahezu vollständig von membranartigen Strukturen ausgefüllt (Abb.: 3-25, \triangleright). Bei diesen Membranstrukturen handelt es sich um, schon anhand der Genotypen *sws¹* und *sws¹; p{sws⁵/elav* (Kapitel 3.2.1.1) beschriebene, große Membrankörper, die ein charakteristisches Merkmal für die *Abwesenheit* des SWS-Proteins in Zellen der Pseudocartridge- und Fensterglia sind. Die in diesen Genotypen beobachtete Degeneration der Monopolarneurone (Kapitel 3.2.1.1, Abb. 3-4) konnte in der Linie *sws¹; p{m-nte¹³/II; elav/III* nicht in diesem Ausmaß bestätigt werden (Abb. 3-25, MpN): Die Neurone zeigen zwar stark kondensierte Nukleoli und ein leicht aufgehelltes Zytoplasma, darüber hinaus sind jedoch keine fortgeschrittenen Merkmale neuronaler Degeneration zu erkennen.

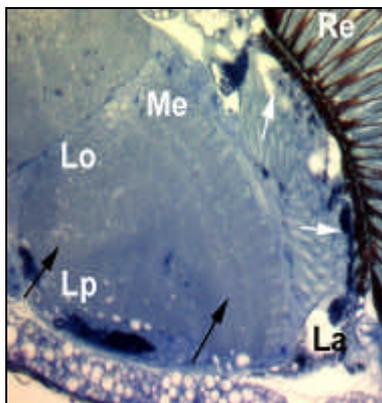


Abb. 3-24 *sws¹; p{m-nte¹³/II; elav/III* 14 d
Horizontaler Semidünnschnitt des Gehirns von *Drosophila*: Durch die neuronale Expression der Maus-*sws*-cDNA findet eine phänotypische Rettung der Neuropilbereiche des Gehirns statt (➔). Re: Retina, La: Lamina, Me: Medulla, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte
Vergrößerung 400 x Nr. 9 02 00 7 4-12

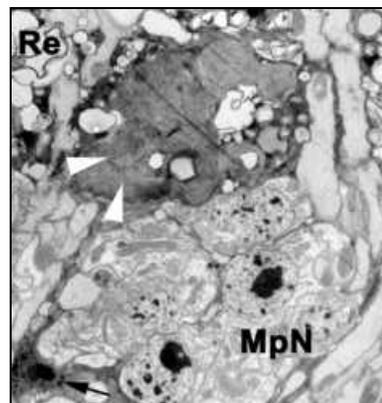


Abb. 3-25 *sws¹; p{m-nte¹³/II; elav/III* 14 d
Membranakkumulation im Laminakortex: Die neuronale Expression der Maus-cDNA kann die Störung des Membranmetabolismus der Pseudocartridge- und Fensterglia (\triangleright) nicht beseitigen. Re: Retina, MpN: Monopolarneurone
Vergrößerung 6000 x Nr. 45525-4-14

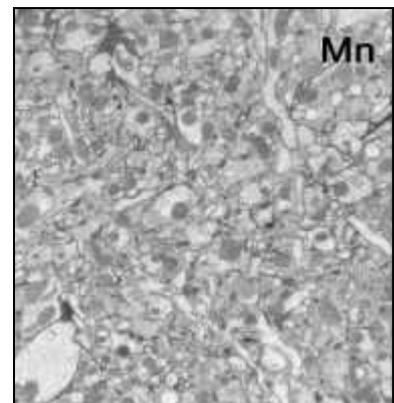


Abb. 3-26 *sws¹; p{m-nte¹³/II; elav/III* 14 d
Medullaneuropil einer *sws¹; p{m-nte¹³/II; elav/III*-Fliege: Im Gegensatz zu den kortikalen Geweben erscheinen im Genotyp *sws¹; p{m-nte¹³/II; elav/III* die Bereiche des Neuropils wildtypisch. Mn: Medullaneuropil
Vergrößerung 2200 x Nr. 45843-5-21

Bezüglich der Fähigkeit, den neuronalen Phänotyp zu retten, vermag das *nte*-Gen der Maus Gleiches zu leisten, wie das artspezifische *sws*-Gen und veranschaulicht damit seine funktionelle Vergleichbarkeit mit dem Orthologen der Invertebraten.

3.3.2 Untersuchung der *loco*-getriebenen Expression der Maus-*nte*-cDNA im *sws*¹-Hintergrund: *sws*¹; *p{m-sw}*¹³/*II*; *loco*/*III*

Ob die gliale Expression des Maus-Gens den selben Phänotyp wie die Expression des Gens der Fliege erzeugt (Kapitel 3.2.1.2), soll in der folgenden Analyse untersucht werden. Da auch hier bislang keine Aktivitätsmessung der ektopischen Expression der Maus-cDNA im mutanten Hintergrund möglich war (*sws*¹; *p{m-nte}*¹³/*II*; *loco*/*III*), kann man einen Näherungswert durch Subtraktion der wildtypischen Aktivität (*w*¹¹¹⁸ 56 nmol/min/mg Protein) von der Aktivität der jeweiligen Überexpressionsmessung (*w*; *p{m-nte}*¹³/*II*; *loco*/*III*: 3706 nmol/min/mg Protein, siehe Kapitel 3.3.4) erlangen. Aus diesen Werten ergibt sich, daß, ebenso wie die *loco*-getriebene Expression der *Drosophila*-cDNA im *sws*¹-Hintergrund, die Expression der Maus-cDNA mit einer *in vitro*-Aktivität von 3650 nmol/min/mg Protein, trotz des mutanten Hintergrundes, eine zirka 50-fache Überexpression darstellt.

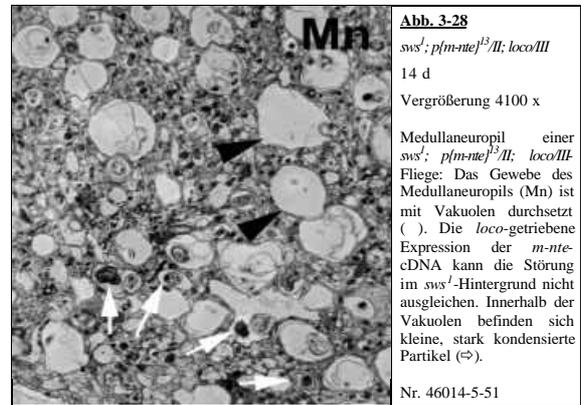
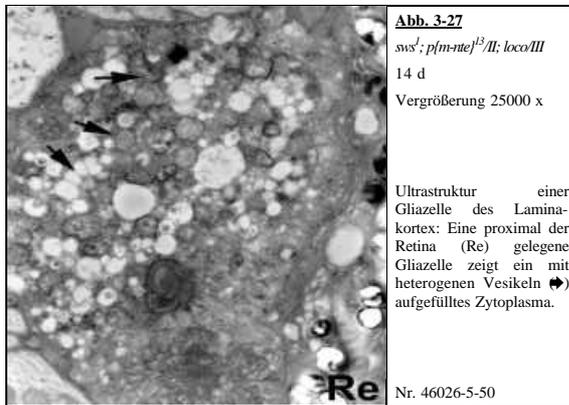


Im lichtmikroskopischen Bild (Abb. 3-25) erkennt man die für den *sws*¹-Phänotyp charakteristische Vakuolisierung des Medullaneuropils (●) und der zentralen Gehirnbereiche (nicht gezeigt). Die gleichfalls die *sws*¹-Mutation kennzeichnenden Membranakkumulationen im distalen Laminakortex fehlen jedoch. Es sind dennoch distal des Laminaneuropils dunkler gefärbte Bereiche zu erkennen (⇔), die jedoch keinen auffälligen pathologischen Status signalisieren. Aufgrund der lichtmikroskopischen Analyse kann man keine eindeutige Aussage bezüglich der Rettung des *sws*¹-Phänotypes innerhalb des Kortex machen. Der in Gestalt der Vakuolen weiterhin bestehende neuronale Phänotyp korreliert mit den Ergebnissen der Analyse der glialen Expression der *Drosophila*-cDNA in der Mutante (Kapitel 3.2.1.2).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Laminakortex bestätigen die lichtmikroskopischen Annahmen. Die *loco*-getriebene Expression der Maus-*sws*-cDNA im *sws*¹-Hintergrund führt zu einer vollständigen Reduktion der *sws*¹-Membrankörper zwischen Laminakortex und Retina (Abb. 3-26). Darüber hinaus sind aber auch Monopolarzellen zu sehen, die klassische Merkmale der Apoptose, wie pyknotische Zellkerne zeigen (). In einem benachbarten Zellkörper sind auch die für den *sws*-

Phänotyp charakteristischen, multiplen Membranlamellen (➡) und Vakuolen (⇔) im Zytoplasma des Perikaryons sichtbar.

Analog zu den Genotypen *sws¹; p{sws⁵/loco*, der trotz des *sws¹*-Hintergrundes eine Überexpression darstellt, und *w; p{sws¹⁰/loco* kommt es auch in dem hier untersuchten Fall zu einem Überexpressions-Phänotyp innerhalb der Gliazellen (3-27).

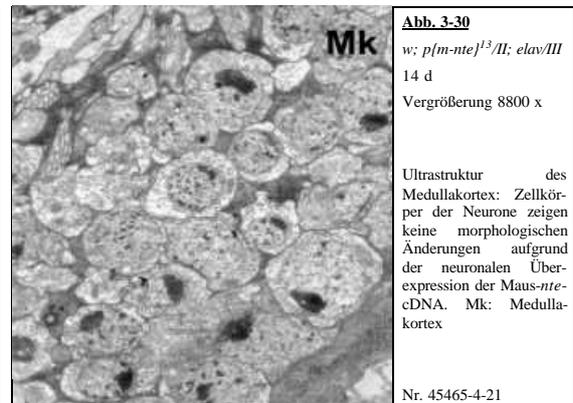
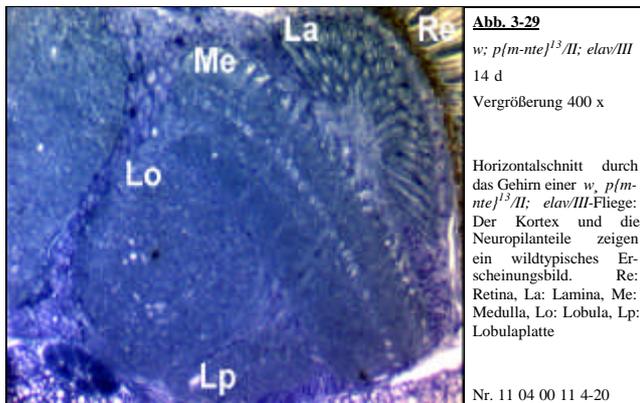


Die histologischen Folgen dieser Überexpression zeigen sich, wie in den vorangegangenen glialen Überexpressionen, in Form von vielfältigen Vesikeln, die das gesamte Lumen des Zytoplasmas einnehmen (➡). Zieht man in Betracht, daß die *in vitro*-Aktivität des Maus-Orthologen unter Kontrolle des *loco*-Treibers jedoch mehr als dreimal so hoch ist, wie die entsprechende Aktivität der *Drosophila*-cDNA, so erscheinen die Folgen der Überexpression des Maus-Gens als verhältnismäßig mild.

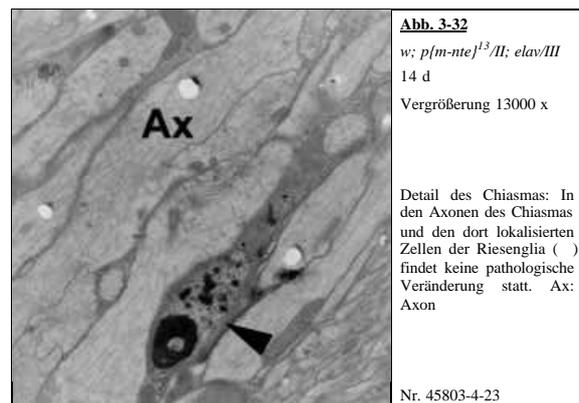
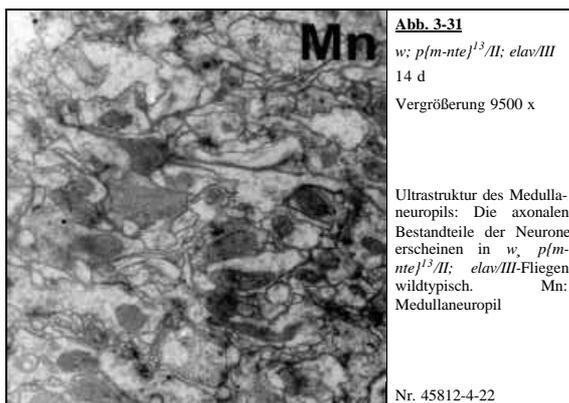
Die durchgehende Vakuolisierung des Medullaneuropils entspricht den bereits analysierten Genotypen *sws¹; p{sws⁵/loco* und *sws¹* (Kapitel 3.2.1.1 & 3.2.1.2). Die gliale Expression des *sws*-Gens vermag den durch die *sws¹*-Mutation verursachten neuronalen Phänotyp nicht aufzuheben (Abb. 3-28). In den Neuropilen, hier im Medullaneuropil, treten große, scheinbar „leere“ Vakuolen () neben stark kondensierten, zirkulären Membrankörperchen (⇔) auf. Dieser Phänotyp erstreckt sich, wie in der *sws¹*-Linie (Abb. 3-6) über den Neuropilanteil des gesamten Gehirns.

3.3.3 Untersuchung der *elav*-getriebenen Expression der *m-nte*-cDNA im wildtypischen Hintergrund: *w; p{m-nte}¹³/II; elav/III*

Im Folgenden Kapitel wird untersucht, ob die neuronale Expression des Maus-Gens zusätzlich zu der natürlichen Expression in *Drosophila* Folgen zeigt. Die gemessene *in vitro*-Aktivität der unter dem neuronalen *elav*-Treiber stehenden Expression der Maus-cDNA beträgt 518 nmol/min/mg Protein. Sie ist damit um ein Dreifaches höher als die Enzymaktivität der *elav*-getriebenen Expression der *Drosophila*-cDNA (*w; p{sws}¹⁰/elav*) und liegt um ein neunfaches über der SWS-Enzymaktivität der *w¹¹¹⁸*-Kontrolle (*w¹¹¹⁸* 56 nmol/min/mg Protein).



Trotz der signifikanten Erhöhung der Enzymaktivität hat die Überexpression der Maus-cDNA keine augenfälligen Veränderungen innerhalb des Neuropils oder des Kortex zur Folge. In allen untersuchten Semidünnschnitten (Abb. 3-29) zeigen sich keine Abweichungen vom Wildtyp.



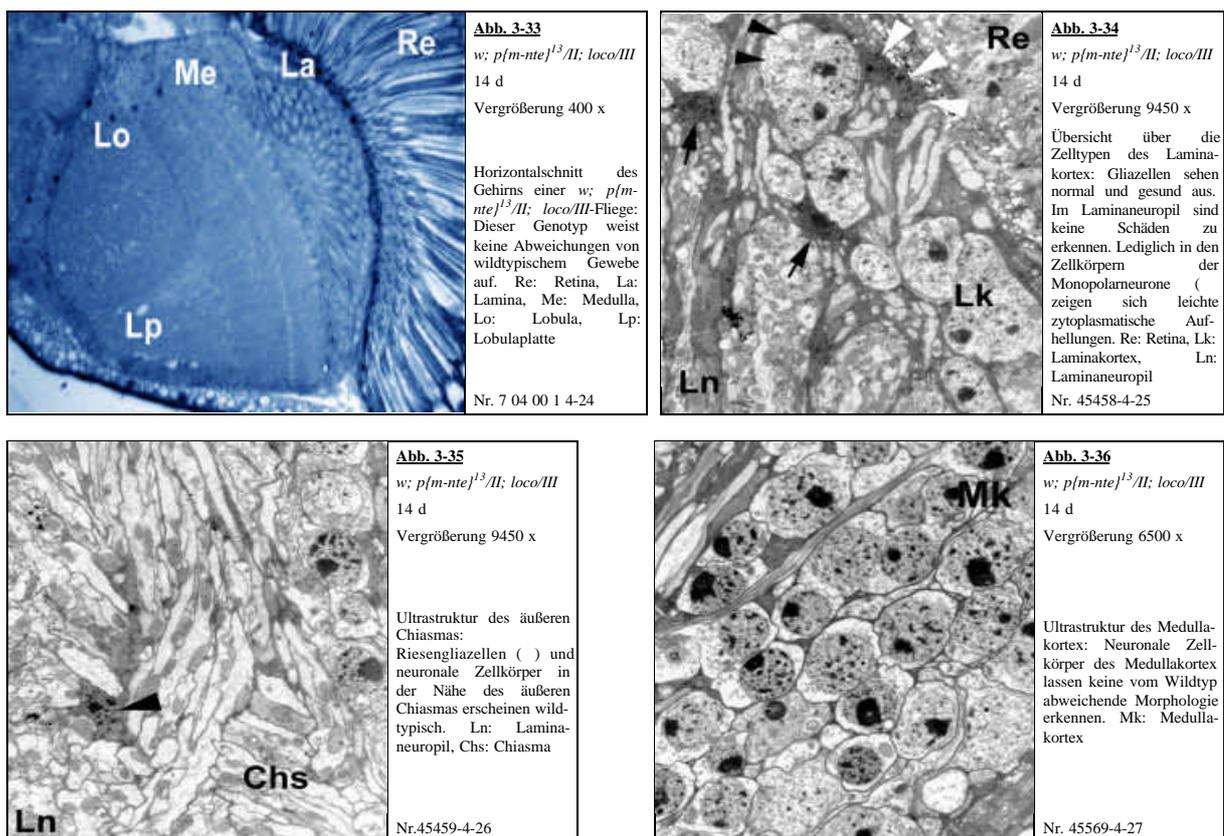
Anhand der Analyse der Ultrastruktur konnte ermittelt werden, daß weder die Zellkörper der Neurone (Abb. 3-30), noch die axonalen Strukturen des Neuropils (Abb. 3-31, Abb. 3-32) sichtbare Veränderungen ausweisen. Genauso konnten keine Abweichungen vom Wildtyp in Gliazellen (Abb. 3-32,) festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen der neuronalen Überexpression der *Drosophila*-cDNA im wildtypischen Hintergrund (Kapitel 3.2.2.1). Dort konnten keine Veränderungen durch die neuronale Expression der *sws*-cDNA induziert werden. Diese Resultate zusammengenommen, legen den Schluss nahe, daß Neurone gegen die Überexpression der

sws-cDNA und möglicherweise gegen ein hohes zelluläres Aufkommen des *SWS*-Proteins relativ unempfindlich sind.

3.3.4 Untersuchung der *loco*-getriebenen Expression der *m-nte*-cDNA im wildtypischen Hintergrund: *w; p{m-nte}¹³/II; loco/III*

Wie in Kapitel 3.2.2.2 das Gen aus *Drosophila*, wird hier mit dem *loco*-Treiber das *nte*-Gen der Maus in Gliazellen, zusätzlich zu dem natürlichen Aufkommen, produziert. Die *in vitro*-Enzymaktivität des Stammes *w; p{m-nte}¹³/II; loco/III* war mit 3706 nmol/min/mg Protein die höchste ermittelte PV-Aktivität aller untersuchter Genotypen. Die Enzymaktivität der Expression der Maus-*sws*-cDNA liegt damit um ein 66-faches über der Aktivität der *w¹¹¹⁸*-Kontrolle mit 56 nmol/min/mg Protein.

Entgegen allen Erwartungen zeigte die gliale Expression der Maus-*sws*-cDNA, anders als die Expression des *Drosophila*-Gens in Gliazellen (*w; p{sws}¹⁰/loco*), keinen histologisch erkennbaren Phänotyp.



Sowohl in licht- als auch in elektronenmikroskopischen Präparaten können keine Veränderungen des Gewebes entdeckt werden, die mit denen des Stammes *w; p{sws}¹⁰/loco* (Kapitel 3.2.2.2) vergleichbar wären. Übersichtsaufnahmen des Laminakortex (Abb. 3-34) zeigen wildtypisch erscheinende Pseudocartridge- oder Fensterglia (▷). Diese Gliazellen reagieren hochsensibel auf die Überexpression des *Drosophila*-*sws*-Konstrukts mit dem im Kapitel 3.2.2.2 beschriebenen Phänotyp. Die proximale Satellitenglia (➔) ist durch die Überexpression der Maus-*sws*-cDNA auch keiner Schädigung

ausgesetzt. Die Monopolarneurone zeigen in ihrem Zytoplasma kleine, aufgehellte Bereiche (), die aber noch keine ernsthafte Schädigung signalisieren. Eine weitere, von der Überexpression der *Drosophila-sws*-cDNA stark beeinflusste Gliazellpopulation, die Riesengliazellen, zeigen in der Linie *w; p{m-nte}¹³/II; loco/III* keinerlei Schädigungen (Abb. 3-35,) oder Abnormalitäten. Die gliale Expression der *Drosophila*-cDNA erzeugt in dieser Zellpopulation hingegen erhebliche Abweichungen vom Wildtyp (Abb. 3-22). Die Zellkörper der Neurone des Medullakortex sehen gleichfalls wildtypisch aus (Abb. 3-36).

3.3.5 Zusammenfassung der Expressionsanalysen der Maus-sws-cDNA

Neben der starken Übereinstimmung der Sequenzdaten zeigen das *Drosophila-SWS* und das Maus-*NTE* eine erheblich funktionelle Übereinstimmung.

Dieses wird besonders dadurch deutlich, daß beide Proteine eine spezifische, neuronale Funktion erfüllen, die in der *elav*-getriebenen Expression im *sws¹*-mutanten Hintergrund selektiv rekonstituiert wird. Hierbei besitzt das *NTE*-Enzym der Vertebraten die selbe physiologische Potenz wie sein artspezifisches Protein aus *Drosophila* (Kapitel 3.2.1.1) und untermauert damit eindrucksvoll die funktionelle Äquivalenz zweier evolutiv so weit von einander entfernten Modellorganismen, wie *Drosophila* und der Maus.

Die *loco*-getriebenen Expressionsexperimente offenbarten jedoch einen erstaunlichen Unterschied zwischen *Drosophila-SWS* und Maus-*NTE* hinsichtlich ihrer Wirksamkeit *in vivo*:

In allen bisher durchgeführten Experimenten konnte beobachtet werden, daß Expressionssysteme mit dem Maus Orthologen eine stärkere *in vitro*-Aktivität aufweisen, als das vergleichbare Expressionssystem des *Drosophila* Orthologen. So besitzt zum Beispiel die *loco* getriebene Überexpression der Maus cDNA im wildtypischen Hintergrund (*w; p{m-nte}¹³/II; loco/III*, Kapitel 3.3.4) eine PV-Aktivität von 3706 nmol/min/mg Protein, während aufgrund der Expression der *Drosophila*-cDNA (*w; p{sws}¹⁰/loco*, Kapitel 3.2.2.2) eine *in vitro*-Aktivität von 990 nmol/min/mg Protein ermittelt wurde. Die durch die *Drosophila* cDNA-Expression erzeugte zusätzliche Enzymaktivität beträgt rund 26 % der in *w; p{m-nte}¹³/II; loco/III* ermittelten Aktivität.

In gleichem Maße geringer ist die *in vitro* Aktivität der neuronalen Expression der *Drosophila*-cDNA. Hier beträgt der in *w; p{sws}¹⁰/elav* gemessene Wert mit 160 nmol/min/mg Protein 30 % (Kapitel 3.2.2.1) des Wertes der neuronalen Expression der Maus cDNA (518 nmol/min/mg Protein, Kapitel 3.3.3). Damit kann gezeigt werden, daß, gliale Expression und gleiche Stabilität des *Drosophila*- und Maus-Proteins vorausgesetzt, das Maus-Protein generell eine 3 fach stärkere *in vitro*-Aktivität zeigt. Um so erstaunlicher ist die Tatsache, daß die histologischen Ausprägungen der ektopischen Expression der *Drosophila*-cDNA stärker erscheinen, wie die der Maus-cDNA. So ist in den Ultrastrukturuntersuchungen des Stammes *sws¹; p{sws}⁵/loco* ein glialer Überexpressions-Phänotyp zu

erkennen, der hinsichtlich seiner pathologischen Ausprägung die histologischen Veränderungen der Linie *sws¹; p{m-nte}¹³/II; loco/III* deutlich übertrifft.

Die Präparate des Stamms *sws¹; p{m-nte}¹³/II; loco/III* zeigen in Gliazellen des distalen Laminakortex *vereinzelt* eine Anhäufung lysosomaler Vesikel, wie sie in Überexpressionen des *Drosophila*-Orthologen gleichfalls zu beobachten sind (Abb. 3-27). Diese Degenerationserscheinungen sind aber nicht in allen Gewebeanteilen gleich stark ausgeprägt. Ein Großteil der in diesen Stämmen dokumentierten Gliazellen erscheint wildtypisch. Der vergleichbare *Drosophila*-Stamm *sws¹; p{sws}⁵/loco* zeigt in allen Präparaten einen ausgeprägten lysosomalen Phänotyp der Gliazellen. Die Vesikel erscheinen in diesen Fliegen zahlreicher und kondensierter, sie füllen das gesamte Zytoplasma der Pseudocartridge- und Fenster- Glia (Abb. 3-10), sowie das der Riesenglia und der Epithelialglia (Abb. 3-11, 3-12).

Eine Erklärungen für einen derartigen Unterschied der *in vivo*-Wirkung könnte eine möglicherweise verringerte intrazelluläre Transportfähigkeit des Maus-Orthologen in *Drosophila melanogaster* darstellen. Ein Sequenzvergleich der N-terminalen Region zwischen den SWS-Orthologen vielzelliger Organismen zeigt eine zusätzliche N-terminale Sequenz des SWS-Proteins von *Drosophila melanogaster*.

Maus	1	-----MEAP---LQTGMVLGVMIGAGVAVLVTAVLILLV---31
Human	1	-----MEAP---LQTGMVLGVMIGAGVAVVVTAVLILLV---31
<i>Drosophila</i>	1	MDVLEMLRASASGSYNTTFSDAWCOYVSKQ ---ITATVYMYFALVMSLLFIAWFLYFKR---57
<i>C. Elegans</i>	1	-----MSFFYSLFAPLIFLVTFIYNHVVLLILFTVCIIGAAFFVS---40

Abb. 3-37: Alingement der N-terminalen Proteinsequenzen von Maus, Mensch, *Drosophila* und *C. elegans*, Rot: Erste Transmembrandomäne

Eine Psi-BLAST-Suche ergab zu diesem 30 Aminosäure langen Peptid keine Analogien. Es könnte sich um eine *Drosophila melanogaster*-spezifische Signalsequenz handeln, die für eine korrekte Lokalisation in einer Zielmembran von *Drosophila* notwendig ist. Das Fehlen dieser Signalsequenz in der *w; p{m-nte}¹³/II; loco/III*- und *sws¹; p{m-nte}¹³/II; loco/III*-Linie könnte zu einer Fehllokalisierung des Proteins führen, so daß, trotz erheblicher *in vitro*-Aktivität, die physiologische Wirkung hinter der arteigenen cDNA zurückbleibt.

Darüber hinaus könnte eine fehlerhafte Endlokalisierung des SWS/NTE-Enzyms zu einer Anhäufung des Proteins in den Mikrosomen des Zytoplasmas des Lumens der Axone führen, die (physiologisch inaktiv) geringe histologische Wirkung zeigen, aber einen erheblichen Beitrag zur *in vitro* ermittelten Aktivität leisten. Die beachtlich höhere *in vitro*-Aktivität des Maus-Proteins könnte darüber hinaus aber auch auf das in der PV-Aktivitätsmessung verwendete Substrat S9B zurückgeführt werden. Da es sich hierbei um ein artifizielles Substrat handelt und über das natürliche Substrat nichts bekannt ist, liegt es im Bereich des Möglichen, daß die Katalyserate des Maus-NTE nur gegenüber diesem künstlichen Substrat um ein dreifaches über der Aktivität des *Drosophila*-Proteins liegt. Das natürliche

Substrat könnte von beiden Enzymen trotz der vorliegenden Daten mit gleicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

3.4 Expressionsanalysen der *Drosophila*-cDNA ohne erste Transmembrandomäne: $p\{sws-TM\}^{17}$

Die Assoziation des *SWS/NTE*-Proteins mit mikrosomalen Membranen zeigte sich seit den ersten Isolierungsversuchen als notwendige Voraussetzung für eine unverminderte Phenyl-Valerat-Esterase-Aktivität (Davis und Richardson, 1987; Pope und Padilla, 1989). Durch rekombinante Expression eines verkürzten human-NTE in *E. coli*, wurde festgestellt, dass die Abwesenheit der ersten der vier Transmembrandomänen die PV-Aktivität nicht vermindert (Glynn, 2000).

Von den vier mutmaßlichen Transmembrandomänen des *SWS*-Proteins wird nur die erste (TM1: Val³⁵-Phe⁵⁵) von allen verwendeten Suchprogrammen identifiziert und dient daher der Überprüfung, ob ein ähnlicher Mechanismus die Aktivität des *SWS*-Proteins in *Drosophila melanogaster* beeinflusst. Es wurde ein cDNA-Konstrukt hergestellt, das erst mit dem M¹ beginnt und daher die erste amino-terminale Transmembrandomäne (Val³⁵-Phe⁵⁵) nicht besitzt. Mit dieser cDNA wurden durch p-Element-Transformation transgene Linien hergestellt, die im Weiteren analysiert wurden.

Die Expression des ursprünglich zur Analyse herangezogenen Kontrukts $p\{sws-TM\}^{19}$ war unter Kontrolle des *elav*- und des *loco*-Treibers embryonal letal. Aus der Kreuzung

$$w; p\{sws-TM\}^{19} \quad x \quad w; p\{loco-GAL4\}/Tb$$

konnten jedoch Larven des Genotyps $w; p\{sws-TM\}^{19}/loco-GAL4$ erhalten werden. Diese Larven starben vor der zweiten Larvalhäutung. Da die Larven die erste Larvalhäutung vollzogen haben, ist eine Beteiligung häutungsspezifischer Genprodukte in Wechselwirkung mit dem $p\{sws-TM\}^{19}$ -Konstrukt unwahrscheinlich. Die lichtmikroskopische Untersuchung der embryonalen Entwicklung zeigte ebenfalls keine augenfälligen Schädigungen. Ein akkumulativer Schädigungsprozess, der die Individuen bis zur zweiten Larvalhäutung entscheidend geschwächt hat, erscheint wahrscheinlich, bedarf aber noch einer weitergehenden Untersuchung. Da die beabsichtigten Untersuchungen sich auf die Folgen der induzierten Expression im adulten Tier konzentrieren sollten, wurde nach einer p-Element-Linie der cDNA ohne erste Transmembrandomäne gesucht, die nicht embryonal letal ist.

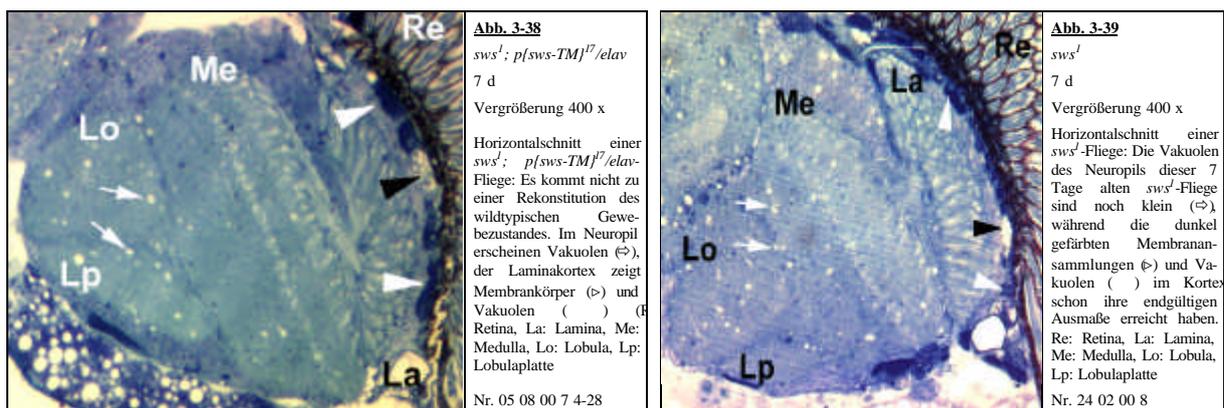
Die im weiteren verwendete UAS-Linie $p\{sws-TM\}^{17}$ erwies sich als adult lebensfähig. Dass die ektopische Expression dieses Kontrukts unter dem glialen *loco*-Promotor im *sws*¹-Hintergrund dennoch letal war, ist ein Hinweis auf eine hohe Empfindlichkeit der Gliazellen gegenüber einer veränderten *sws*-Expression und auf eine möglicherweise dominant negative Interaktion dieser modifizierten cDNA.

3.4.1 Analyse der neuronalen Expression im *sws*¹-Hintergrund unter Kontrolle des *elav*-Treibers: *sws*¹; *p{UAS-*sws-TM*}¹⁷/*elav**

Der Einfluss eines N-terminal verkürzten *SWS*-Proteins auf die Struktur und Funktionalität der Neuronen wird durch die neuronale Expression in Mutanten unter Kontrolle des *elav*-Treibers ermittelt. Die PV-Aktivitätsmessung des Stammes *sws*¹; *p{sws-TM}*¹⁷/*elav* ergab einen Wert von 4 nmol/min/mg Protein und liegt damit genau so niedrig wie die der *sws*¹-Mutante (~5 nmol/min/mg Protein). Die Ablation der N-terminalen Aminosäuresequenz M¹-D⁸⁰ scheint somit die PV-Aktivität des cDNA-Konstrukts aufzuheben.

Da die Ablation dieser N-terminalen Sequenz der *Drosophila*-cDNA einen dominant negativen Effekt besitzt, der über die bloße Beseitigung der Enzymaktivität hinausgeht, kann unter anderem aus der Tatsache geschlossen werden, daß es nicht gelungen ist, 14 Tage alte Fliegen des Stammes *sws*¹; *p{sws-TM}*¹⁷/*elav* zu erhalten. Diese Fliegen wurden nur ~7 Tage alt, was eine bedeutende Verringerung der durchschnittlichen Lebensdauer im Vergleich zu *sws*¹-Fliegen darstellt (~ 10 Tage).

Die neuronale Expression des *p{sws-TM}*¹⁷-Konstrukts im mutanten Hintergrund äußert sich darüber hinaus jedoch nicht in einer ausgeprägten histologischen Verstärkung des *sws*¹-Phänotyps.



Sieben Tage alte Fliegen zeigen im Lichtmikroskop massive histologische Veränderungen (Abb. 3-38), die denen der *sws*¹-Mutante (Abb. 3-39) gleichen. Im distalen Laminakortex entwickeln sich auffällig große, aus membranähnlichem Material bestehende Ablagerungen, die sich entlang des gesamten Ganglions anstelle der Fenster- und Pseudocartridgeglia erstrecken (▷). Diese Strukturen ähneln in ihrer Konsistenz den im *sws*¹-Hintergrund beobachteten Membranakkumulationen, erscheinen aber in ihrem Ausmaß größer. Im Laminakortex sind neben den dunkel gefärbten Ablagerungen auch unregelmäßige Löcher im Gewebe sichtbar (). Das Ausmaß der Vakuolenbildung scheint im Neuropil (⇔) der *sws*¹; *p{sws-TM}*¹⁷/*elav*-Fliege geringfügig schwächer zu sein, wie in der *sws*¹-Kontrolle. Es ist jedoch zu bedenken, daß abgesehen von der individuellen Schwankung des Phänotyps, es sich hier auch um ein 7 Tage altes Individuum handelt und somit die Degeneration der Axone noch nicht so weit fortgeschritten ist. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigen die proximal der Ablagerungen (Abb. 3-39, ▷) angesiedelten Monopolarneurone auch

Schädigungen. Auffällig sind hier die im Zytoplasma erkennbaren, angeschwollenen Mitochondrien (Abb. 3-40, ➔). Diese abnormalen Organellen lassen sich auch noch in den axonalen Ausläufern des Laminaneuropils erkennen (Abb. 3-40, ➔). Die Akkumulationen des Laminakortex bestehen aus dicht gepacktem Membranmaterial und enthalten Einschlüsse, die mit ihrem lichten Hof an Lipideinschlüsse (L) oder an sogenannte *zebra bodies* (⇔) erinnern. Letztere Partikel sind in Fällen der Mucopolysaccharidose-IIIB (Hunter syndrome) in Nervenzellen und Gliazellen beschrieben wurden (Oda et al., 1988). Das *neuronale* Auftreten dieser Körperchen, die aus parallelen Stapeln fusionierter osmiophiler Membranen bestehen, wurde bisher in Fällen der Tay-Sachs-Krankheit (Terry und Weiß 1963) und einer Fülle weiterer Stoffwechsel- und Speicherkrankheiten dokumentiert.

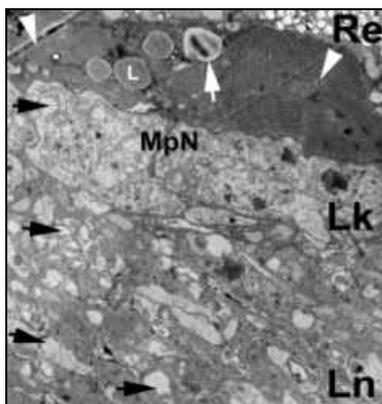


Abb. 3-40 *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/elav* 7 d
 Ultrastruktur des Laminakortex: Große Membranakkumulationen (➔) sind zwischen Retina und Lamina, sowie lysierende Mitochondrien im Laminaneuropil (➔) zu sehen. Re: Retina, MpN: Monopolareurone, Lk: Laminakortex, Ln: Laminaneuropil, L: Lipidtröpfchen, ⇔: *zebra bodies*
 Vergrößerung 3000 x Nr. 45881-4-29

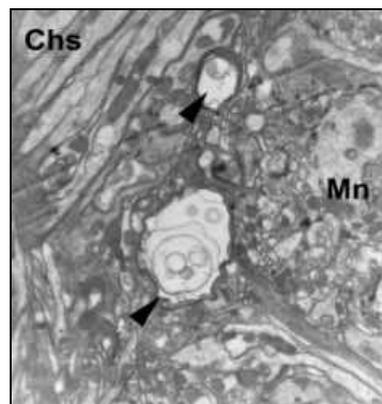


Abb. 3-41 *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/elav* 7 d
 Ultrastruktur des Chiasmata: Im Gewebe rund um das Chiasma deuten Vakuolen () auf axonale Degeneration oder auf die Schädigung der in diesem Bereich lokalisierten Riesengliazellen hin. Chs: Chiasma, Mn: Medullaneuropil
 Vergrößerung 17500 x Nr. 45885-4-30

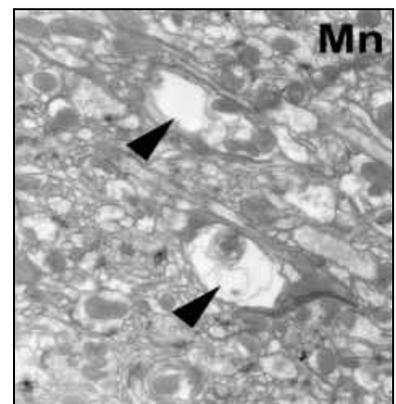


Abb. 3-42 *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/elav* 7 d
 Ultrastruktur des Medullaneuropils: Die im Medullaneuropil weiterhin bestehenden Vakuolen () gleichen denen in der *sws¹*-Mutante. Mn: Medullaneuropil
 Vergrößerung 11000 x Nr. 45886-4-31

Die Vakuolen in der Umgebung des äußeren Chiasmata (Abb. 3-41) sind bezüglich ihrer histologischen Herkunft nicht eindeutig zu bestimmen, aufgrund ihrer Lokalisation könnte es sich hierbei jedoch um ehemalige Riesengliazellen handeln (). Ebenso wie das Laminaneuropil ist auch das Medullaneuropil von pathologischen Veränderungen betroffen. Wie schon im lichtmikroskopischen Präparat zu erkennen ist, treten im axonalen Anteil des Ganglions Vakuolen in Erscheinung, die mit jenen der *sws¹*-Mutanten gleichzusetzen sind (Abb. 3-42,).

Die Beurteilung des Ausmaßes derjenigen Veränderungen, die *durch* die induzierte Expression des *p{sws-TM}¹⁷*-Konstruktes zustande kommen, ist vor dem *sws¹*-Hintergrund nicht einfach. Als weiterer Hinweis für einen dominant negativen Einfluss der veränderten cDNA kann, neben der verkürzten Lebensdauer von *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/elav*-Fliegen, die Letalität der glialen Expression im *sws¹*-Hintergrund gelten. Aus der Kreuzung der Linien



konnten keine Fliegen mit dem Genotyp *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/loco*, sondern ausschließlich Kontrollen des Genotypes *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/TM3Sb* erhalten werden.

3.4.2 Untersuchung der Überexpression des cDNA-Konstrukts ohne erste Transmembrandomäne im wildtypischen Hintergrund

3.4.2.1 Analyse der neuronalen Expression im wildtypischen Hintergrund unter Kontrolle des *elav*-Treibers: *w; p{sws-TM}¹⁷/elav*

Ob das verkürzte Protein zusätzlich zu den wildtypischen Kopien einen histologisch erkennbaren Einfluss in Neuronen hat, wird durch die neuronale Expression unter *elav*-Kontrolle untersucht. Obwohl die PV-Aktivitätswerte des Stammes *w; p{sws-TM}¹⁷/elav* mit 86 nmol/min/mg Protein eine leichte Erhöhung der SWS-Enzymaktivität nahe legen, so kann jedoch, die Streuung der Einzelmessungen mit in Betracht gezogen, hier keine signifikante Aktivitätssteigerung festgestellt werden. Die Einzelergebnisse der Messungen schwanken um bis zu 30% um einen Mittelwert. Unterstützt wird diese Bewertung auch durch die im vorangegangenen Kapitel aufgeführte Messungen der induzierten Expression im mutanten Hintergrund, die keine zusätzliche PV-Aktivität durch die *elav*-gesteuerte Expression des *p{sws-TM}¹⁷*-Konstruktes zeigte.

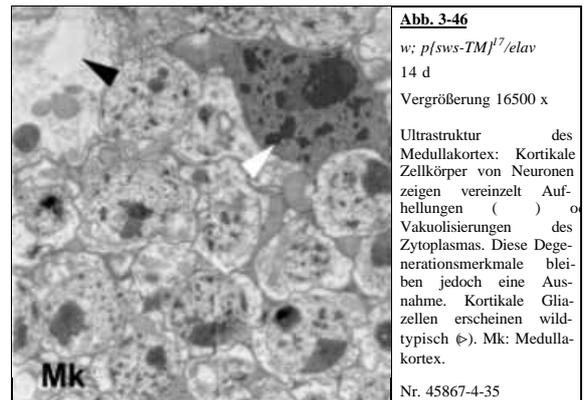
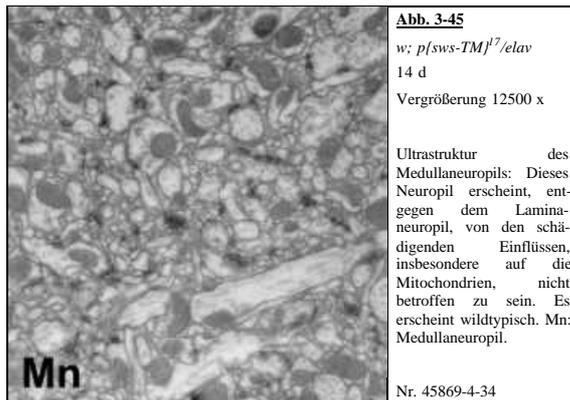


Im lichtmikroskopischen Bild (Abb. 3-43) sind keine deutlichen, durch die ektopische Expression des cDNA-Konstrukts ohne erste Transmembrandomäne verursachten, Schädigungen zu erkennen. Die Zellen des Kortex (\blacktriangleright) und die der Neuropile (\Rightarrow) zeigen keine auffälligen Degenerationserscheinungen. Eine punktuell intensivere Färbung mit Toluidinblau lässt den Verdacht auf apoptotische Prozesse zu, konnte aber in den Analysen der Ultrastruktur nicht bestätigt werden.

In einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 3-44) können im Laminaneuropil pathologisch vergrößerte und teilweise lysierende Mitochondrien deutlich gesehen werden (\blacktriangleright). Diese Schädigung der Mitochondrien kann im Medullaneuropil nicht mehr entdeckt werden. Hier erscheinen die in den Axonen vorhandenen Mitochondrien normal und ohne deutliche pathologische Merkmale (Abb.: 3-45). Diese Tatsache unterstützt den Verdacht, daß es sich hierbei um eine Folge der *elav* getriebenen *p{sws-TM}¹⁷*-Expression und nicht um ein Fixierungsartefakt handelt. Im Falle eines

Fixierungsartefaktes würde man eine gleichmäßige Schädigung in allen Bereichen des Präparates erwarten.

Die Zellkörper der kortikalen Bereiche scheinen keiner ausgeprägten Schädigung zu unterliegen (Abb. 3-46). Die Somata des Medullakortex zeigen manche zytosolische Vakuolen () und verhältnismäßig stark kondensierte Nukleoli, aber darüber hinaus keine alarmierenden Anzeichen zellulärer Degeneration. Gliazellen sind von der Expression des $p\{sws-TM\}^{17}$ -Konstrukts nicht sichtbar betroffen (Abb.: 3-46, ▷).

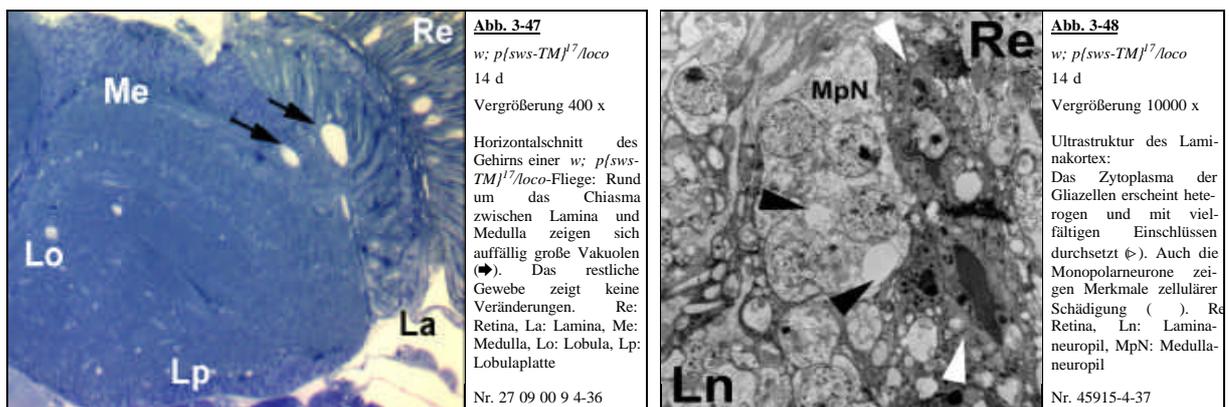


Es scheinen somit die von der $p\{sws-TM\}^{17}$ -Expression betroffenen und stoffwechselaktiven Neurone direkt auf die Überexpression zu reagieren ohne die benachbarten Gliazellen sichtbar in Mitleidenschaft zu ziehen. Die verkürzte Form des Proteins wirkt sich innerhalb der Neurone möglicherweise verändernd auf den mitochondrialen Metabolismus oder ihren Transport innerhalb des Axons aus. Es ist jedoch auch möglich, daß die Mitochondrien nur auf zelluläre Schädigungen als erste reagieren und somit ein mitochondrialer Phänotyp zeitlich vor einer Degeneration der Zellkörper auftritt. Die Zellkörper der Monopolarneuronen zeigen keine auffälligen Degenerationserscheinungen. Daraus ließe sich ableiten, daß die Degeneration der Mitochondrien kein sekundäres Phänomen zu sein scheint, daß heißt auf einen ungenügenden Metabolit-Nachschub seitens des Zellkörpers, sondern direkt auf die Expression des verkürzten *SWS*-Proteins zurück zu führen ist.

In der neuronalen Überexpression des $p\{sws-TM\}^{17}$ -Konstrukts sind keine Veränderungen der Gliazellen und der axonalen Strukturen des Neuropils, so wie sie im *sws¹*-Hintergrund zu beobachten sind, festzustellen. Eine neue Qualität liegt aber in den, sowohl im *sws¹*-Hintergrund (Kapitel 3.4.1) als auch in dem hier besprochenen Wildtyp, auftretenden Veränderungen der Mitochondrien, der durch die neuronale Expression induziert zu sein scheint.

3.4.2.2 Analyse der glialen Expression im wildtypischen Hintergrund unter Kontrolle des *loco*-Treibers: *w; p{sws-TM}¹⁷/loco*

Die *loco*-getriebene Expression des *SWS*-Proteins hat in den bisherigen Experimenten eine höhere Empfindlichkeit der Gliazellen gegenüber Veränderungen der *SWS*-Expression an den Tag gebracht. Ob dies auch für die modifizierte Form des Proteins ohne erste Transmembrandomäne zutrifft, soll in dem folgenden Experimenten einer Überprüfung unterzogen werden. Auch die Messung der durch die gliale Expression gesteuerten zusätzlichen PV-Aktivität bestätigte die in Kapitel 3.4.1 und Kapitel 3.4.2.1 gezeigten Resultate. Mit 62 nmol/min/mg Protein liegt der Messwert des Stammes *w; p{sws-TM}¹⁷/loco* im Bereich der wildtypischen Aktivität. Die Entfernung der ersten achtzig Aminosäuren mit der in ihr enthaltenen Transmembrandomäne blockiert über einen bislang unbekanntem Mechanismus die katalytische Aktivität des Aktiven Zentrums der Serinesterase *SWS* oder sie verhindert durch unkorrekte Membraninsertion eine funktionelle Tertiärstruktur.



Die gliale Expression der cDNA ohne erste Transmembrandomäne hat weitreichende Schäden in glialen und neuronalen Zellpopulationen zur Folge. Das ist zum Teil schon auf lichtmikroskopischer Ebene zu sehen (Abb. 3-47, ➡). Auffällig sind hier die Vakuolen rund um das äußere Chiasma, die in Kapitel 3.2.2.2 schon die Degeneration der Riesenglia lichtmikroskopisch angezeigt hat. Die Bereiche des Neuropils hingegen zeigen im Semidünnschnitt noch keine erkennbaren Schäden.

Einen detaillierteren Aufschluss über die Beteiligung der verschiedenen Gewebe an dem induzierten Phänotyp geben die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Hier zeigt sich, daß auch in diesem Genotyp der Laminakortex deutlich auf die Veränderung der Genexpression reagiert. Besonders dominant sind die vielgestaltigen Einschlüsse der Pseudocartridge- und Fensterglia (Abb.: 4-48, ▷). Ob es sich hier um Vakuolen oder autophagische Merkmale handelt, kann nicht entschieden werden. Ihr Erscheinungsbild ist zu vielgestaltig und ihre Größe zu heterogen, als daß sie sich eindeutig klassifizieren ließen. Derartige Einschlüsse werden in der Literatur ohne besondere Rücksicht auf ihre eigentliche Natur als *lysosomale Vesikel* bezeichnet. Die große, elektronendichte Struktur innerhalb der Gliazelle kann nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ähnelt jedoch Strukturen, die in der Histopathologie als Polyglucosankörper (Robitaille et al., 1980) bereits beschrieben wurden.

Die Monopolarneurone sind im untersuchten Genotyp nicht so auffällig betroffen wie in vorangegangenen glialen Überexpressionen. In dem hier dargestellten Ausschnitt sind lediglich lokal begrenzte, lakunenartige Aufhellungen zu sehen (Abb. 3-48,).

Ebenso wie in *w; p{sws-TM}¹⁷/elav*-Fliegen sind in dem hier untersuchten Genotyp *w; p{sws-TM}¹⁷/loco* die axonalen Bestandteile des Laminaneuropils verändert (Abb. 3-49).

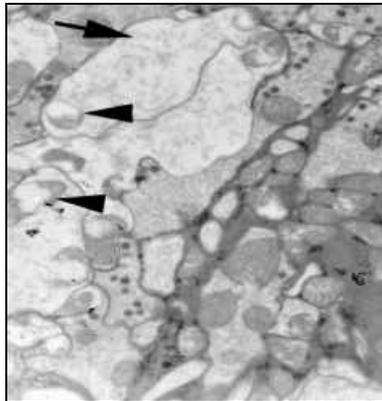


Abb. 3-49 *w; p{sws-TM}¹⁷/loco* 14 d
Aberrante Strukturen im Laminaneuropil: Dilatationen der mitochondrialen Matrix () und axonale Schwellung (➡) treten insbesondere in den Axonen der Monopolarneurone auf.
Vergrößerung 12500 x Nr. 45918-4-38

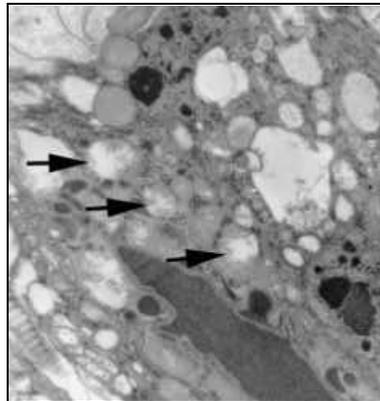


Abb. 3-50 *w; p{sws-TM}¹⁷/loco* 14 d
Gliazellen des Laminakortex: Ebenso wie im Laminaneuropil werden durch die gliale Expression die Mitochondrien der Gliazellen des Laminakortex in Mitleidenschaft gezogen (➡).
Vergrößerung 12000 x Nr. 45916-4-51

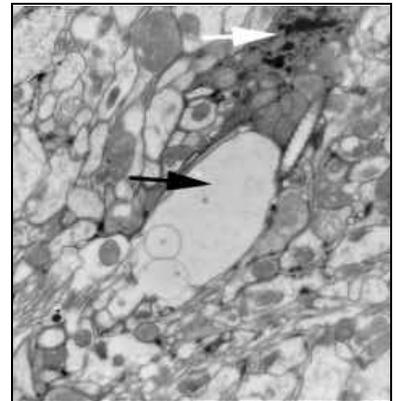


Abb. 3-51 *w; p{sws-TM}¹⁷/loco* 14 d
Ultrastruktur des äußeren Chiasmas: Vakuolen in der Nähe des Chiasmas (➡) entstehen durch axonale Degeneration oder durch das Absterben von Gliazellen.
Vergrößerung 14000 x Nr. 45919-4-39

Die pathologischen Veränderungen manifestieren sich in einer ausgeprägten Lyse der axonalen Mitochondrien () und einer offenkundigen Schwellung der Axone (➡). Die Epithelialglia zwischen den Axonen zeigt keine hervorstechenden Unterschiede zum Wildtyp. Interessant erscheint, daß die gliale Expression der cDNA ohne Transmembrandomäne auch in den Gliazellen zu der vorher schon in Neuronen beobachteten Schwellung und Lyse von Mitochondrien kommt (Abb. 3-50). Neben den Gliazellpopulationen des Laminakortex finden sich in der Nähe des Chiasmas ausgedehnte Vakuolen (Abb. 3-51). Ob diese Bildungen auf Gliazellen oder auf neuronale Strukturen zurückzuführen sind, kann nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Neben der Vakuole (➡) findet sich eine Gliazelle des äußeren Chiasmas, die von der Überexpression des modifizierten cDNA-Konstrukts keinerlei sichtbare Schäden davonträgt (⇔).

3.4.3 Zusammenfassende Diskussion der Expressionsanalysen des *p{sws-TM}¹⁷-Konstruktes*

Die Untersuchungen der Überexpressionen konnten zeigen, daß im Gegensatz zur ermittelten *in vitro*-Aktivität, die *loco*- und *elav*- getriebene *Drosophila* cDNA ohne erste Transmembrandomäne eine erhebliche biologische Wirksamkeit besitzt.

Die deutlich verkürzte Lebensspanne der *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/elav*-Fliegen und die ausnahmslose Letalität des Stammes *sws¹; p{sws-TM}¹⁷/loco* belegt deutlich, daß das SWS-Protein ohne die erste Transmembrandomäne seine natürliche Funktion nicht wahrnehmen kann und darüber hinaus einen dominant negativen Einfluß auf den Organismus haben muss. Die Überexpression dieses Konstrukts

zeigt in allen untersuchten genetischen Hintergründen eine auffällige Schädigung der Mitochondrien. Obwohl lysierende Mitochondrien zu den Bestandteilen einer Zelle gehören, die als erstes auf eine Veränderung des zellulären Milieus, auf falsche Präparationsmethoden oder Fixative, mit dem beobachteten Phänotyp reagieren, so ist die Konsistenz dieser Erscheinung im Zusammenhang mit der Verwendung des *p{sws-TM}*¹⁷-Konstruktes doch ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion. Eine derartige Schädigung der Mitochondrien könnte auch der Grund für den dominant negativen Charakter dieser modifizierten cDNA sein.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der *in vitro*-Verlust der PV-Aktivität aller untersuchten Genotypen. Obwohl das aktive Zentrum des Enzyms von der Modifikation nicht direkt betroffen ist, sinkt der PV-Aktivitätswert auf das Niveau der *sws*¹-Mutante. Diese Ergebnisse wurden inzwischen auch durch Studien an dem humanen Orthologen, bestätigt, obwohl eine Untersuchung zur notwendigen, minimalen Proteinsequenz eines funktionellen *NTE*-Proteins im ersten Augenblick Ergebnisse zeigte, die den hier ermittelten Daten zu widersprechen schienen:

Durch partielle Deletion der Aminosäuresequenz wurde ermittelt, daß ein stark verkürztes, humanes *NTE*-Protein (*NEST*), beginnend mit L⁷³³ und endend mit E¹²¹⁶, rekombinant exprimiert in *E.coli*, gleichwertige PV-Aktivität im Vergleich zur wildtypischen cDNA besitzt. Auch dieses Konstrukt besitzt die erste Transmembrandomäne nicht mehr. In dieser Untersuchung ist die PV-Esterase-Aktivität von der Anwesenheit der zweiten Transmembrandomäne TM2 (L⁷³³-L⁷⁵³) abhängig. Ablatiert man diese, ist keine *in vitro*-Aktivität mehr zu ermitteln (Atkins und Glynn, 2000).

Die Anwesenheit der ersten Transmembrandomäne TM1 (L¹¹-V³²) und der cNMP-bindenden Domänen (H¹⁶²-E²⁶², S⁴⁷⁸-S⁵⁷³, A⁵⁹⁶-Q⁶⁸⁹) schien für die *in vitro*-Aktivität nicht nötig zu sein. Wenn man jedoch *NEST* in *eukaryontischen* Zellsystemem (*cos*-Zellen) exprimiert, resultiert die Ablation der N-terminlen Aminosäuren M¹-S⁷³² in einem vollständigen *in vitro* Aktivitätsverlust des Proteins (P. Glynn, persönliche Mitteilung). In Eukaryonten stellt die erste Transmembrandomäne oder mit ihrer Anwesenheit interagierende Systeme somit eine notwendige Komponente für die Funktion des Enzyms dar. Der Aktivitätsverlust in eukaryontischen Systemen könnte dadurch erklärt werden, daß *NTE/SWS* in eukaryontischen Expressionssystemen einen weiteren Faktor zur Gewährleistung seiner Aktivität benötigt und dieser Faktor aufgrund der sterischen Veränderung mit dem *SWS/NTE*-Protein nicht mehr wechselwirken kann. Eine *notwendige* Wechselwirkung dieses Partners mit dem Bereich starker Homologien zu den cNMP-Bindungsstellen würde erklären, warum das in *cos*-Zellen exprimierte *NEST* (N⁷³³-E¹²¹⁶) oder das Drosophila *p{sws-TM}*¹⁷-Konstrukt keinerlei Aktivität zeigen.

Ähnliche Hypothesen wurden von Pope und Padilla aufgestellt, die vermuteten, daß der Aktivitätsverlust von *NTE* nach Isolation aus einer hydrophoben Umgebung auch durch den Verlust eines noch nicht identifizierten Aktivators verursacht wird (Pope und Padilla, 1989). Da die Esterase-Aktivität eine hydrolytische Spaltung beinhaltet, die nur in wässriger Umgebung stattfinden kann, wurde des weiteren eine Poren-Bildung von *SWS/NTE*-Oligomeren als Voraussetzung einer

funktionellen, katalytischen Aktivität diskutiert (Glynn, 1999). Durch die Abwesenheit der ersten Transmembrandomäne könnte die Porenbildung in Eukaryonten gestört sein und dadurch eine katalytische Aktivität ausbleiben.

Die Abwesenheit der ersten Transmembrandomäne kann jedoch noch weitere Konsequenzen nach sich ziehen, die in ihrer Folge zu der Verstärkung des Phänotyps, dem beobachteten *dominant negativen Effekt*, führen könnten.

Die Abwesenheit der ersten Transmembrandomäne resultiert unter Umständen darin, daß die cNMP-bindenden Domänen und ihre regulatorische Funktion in einem Zellkompartiment zu liegen kommen, in dem ihre Funktion einen negativen Einfluß hat und somit die Zelle schädigt. Darüber hinaus kann die Veränderung der Membrantopologie auch zur unkorrekten Endlokalisation des Proteins führen, das sich so möglicherweise ansammelt und zu Defekten in der Zelle führt. Eine weitere Erklärung für die dominant negativen Eigenschaften des $p\{sws-TM\}^{17}$ -Konstruktes, liegt in der Hypothese, das SWS-Protein forme als Oligomer eine Pore (Glynn, 1999). Der Prozess der Oligomerisierung könnte im wildtypischen Hintergrund durch die abberanten Kopien gestört oder blockiert werden. Das $p\{sws-TM\}^{17}$ -Konstrukt würde somit eine „vergiftende“ Wirkung an den Tag legen und der Titer einer modifizierten Proteinform würde hinsichtlich der Ausprägung eines pathologischen Phänotyps eine entscheidende Rolle spielen.

Obwohl all diese Möglichkeiten spekulativ sind, so gibt es doch für die Hypothese, daß die erste Transmembrandomäne einen entscheidenden Einfluß auf die biologische Wirksamkeit und die katalytische Umsatzrate in Eukaryonten hat, inzwischen überzeugende Evidenzen.

Neben den diskutierten Implikationen der ersten Transmembrandomäne für die zelluläre und biochemische Aktivität des SWS-Proteins, stellen die drei weiteren Transmembrandomänen in gleichem Maße Regionen des Enzyms dar, deren Bedeutung für eine physiologisch adäquate Funktion des SWS-Proteins noch weitgehend unbekannt sind. Im folgenden Kapitel wird die zweite Transmembrandomäne einer detaillierten Betrachtung unterzogen und darauf basierend, ein topologisches Modell der Serinesterase SWS erstellt.

3.4.4 Die Stellung der zweiten Transmembrandomäne innerhalb des SWS-Proteins

Seit der Aufstellung der Hypothese, *NTE* könnte das Zielprotein für die Ausbildung des klinischen Bildes von OPIDN sein (Johnson, 1969), verstärkten sich die Hinweise, daß es sich bei dieser Esterase um ein membran-assoziiertes Protein handelt. Es konnte nachgewiesen werden, daß *NTE* sich in mikrosomalen Membranfraktionen von Gehirnpräparaten anreichern lässt (Richardson et al., 1979; Williams und Johnson, 1981; Davis, 1987) und seine *in vitro*-Aktivität verliert, sobald es aus einer hydrophoben Umgebung isoliert wird (Davis und Richardson, 1987). Die verlorengegangene Aktivität kann *in vitro* durch Zugabe von Phospholipiden wieder hergestellt werden (Pope und Padilla 1989). Ein Durchbruch gelang mit der Affinitätsreinigung von *NTE* mittels des hochaffinen, artifiziellen Substrats *Saligenin-cyclo-phospho-9-biotinyl-diamino-nonan* (S9B) (Glynn et al., 1994). Dieses Substrat reagiert hochspezifisch mit Gehirnmikrosomen und wurde zur Isolierung des Proteins herangezogen. Die Klonierung der humanen *NTE*-cDNA (Lush et al., 1998) und der *Drosophila* SWS-cDNA zeigte schließlich durch Transmembrananalysen die Anwesenheit von vier Transmembrandomänen.

Der Vergleich mehrerer vorhergesagter Proteine der *SWS/NTE*-Proteinfamilie durch *ClustalW*-Datenbankvergleich verdeutlicht den starken Konservierungsgrad der Transmembrandomänen.

Maus	1	-MEAP---LQTGMVLGVMIGAGVAVLVTA	VLILLVVRRLRVQKTPAP-----E-----	44		
Human	1	-MEAP---LQTGMVLGVMIGAGVAVVVT	AVLILLVVRRLRVPKTPAP-----DG-----	45		
<i>Drosophila</i>	16	YVSKQ---ITATVYMYFALVMMSLLF	IAWFLYFKRMARLRLRDEIARSISTVINSSGD-----	80		
<i>C.elegans</i>	5	SLFAPLIFLVTFIYNHVLILLFTVCI	IGAAAFVVSYYLFGYSNTPSS-----ASSSAT-----	58		
Maus	315	PVRGSKRVVSTSGTEDTSKETS	SGRPLDSIGAPLPGPAGDPVKPTSLEAPPAP-LLSR-----	370		
Human	315	PVRGSKRMVSTSATDEP-RET	PGRPPDPTGAPLPGPTGDPVKPTSLETPSAP-LLSR-----	369		
<i>Drosophila</i>	336	PINSQTSQSSRQAPNGP-PMV	ISQMNLMQSAVSGTGSSGVSIVTVTRPPSSPSRHSREEH-----	393		
<i>C.elegans</i>	295	ESDDAIYVAIDGELTVHIRHMEGKE	YLVKCI	PAGGSFFSLLSMLDILMD-FP-SIFR-----	349	
Maus	515	RMIDKAEVCLFVAQPGELVGLAVL	TGEPFLIFTLRAQRDCTFLRISKSHFYEIMRAQPSVVL	577		
Human	514	RMIDKAEDVCLFVAQPGELVGLAVL	TGEPFLIFTLRAQRDCTFLRISKSDFYEIMRAQPSVVL	576		
<i>Drosophila</i>	538	RAKQDKSDMLIH	FVHPGETVGGGLAMLTGEASAYTIRSR	SITRIAFIRRAAIYQIMRQPRIVL	600	
<i>C.elegans</i>	518	EENNEEDSAVIRVTARELVGGLQ	LITNEPSFYTIRAAVQTRVAIMKKKDFSAFLEAHPEIYL	570		
Maus	727	LTNPASN-LSTVAILPVCAEVP	MMAFTLELQHALQAIGPTLLNSDVIRALLGASALDSIQEF	788		
Human	727	LTNPASN-LATVAILPVCAEVP	MMAFTLELQHALQAIGPTLLNSDIIRARLGASALDSIQEF	788		
<i>Drosophila</i>	744	EANPVTHKYSTVALVPI	TDEVPMTPFTYELYHSLCAIGPVLHLS	SDVVRKQLGNSNIFEANEY	806	
<i>C.elegans</i>	716	PMSHIKN-LHTIAVVPASP	DVPLVPFTCELYHALSSNLRVLR	RLSSQKVAACLDPVLEKQADF	777	
Maus	918	DFSRLARVLTGNTIALVLGGG	GARGCSHIGVLKALEEA	GVPVDLVGGTSGSFIGALYAEERS	980	
Human	918	DFSRLARVLTGNTIALVLGGG	GARGCSHIGVLKALEEA	GVPVDLVGGTSGSFIGALYAEERS	980	
<i>Drosophila</i>	937	DFSRLARWLTGNSIGLVLGGG	GARGAAHIGMLKAIQE	AGIPVDMVGGVSGALMGALWC	SERN	999
<i>C.elegans</i>	925	DFSRLARILTGNAILGLVLGGG	GARGAAHVGLRALREE	GIPVDLVGGTSGSLIGGLYAE	TPD	988

Abb. 3-52: ClustalW Homologieanalyse der putativen Transmembrandomänen nach TMpred von Maus-, Mensch-, *C.elegans*- und *Drosophila*-SWS/*NTE* Farbcodierung: TM1, TM2, TM3, TM4

Das Analyseprogramm für Transmembrandomänen TMpred trifft anhand von Datenbankvergleichen Vorhersagen über die Stellung und die Orientierung von Transmembrandomänen. Aufgrund des Homologiegrads und der Trefferhäufigkeit werden sogenannte *scores* ermittelt, Werte deren Höhe die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage bemessen (Hofmann und Stoffel, 1993). Die erste

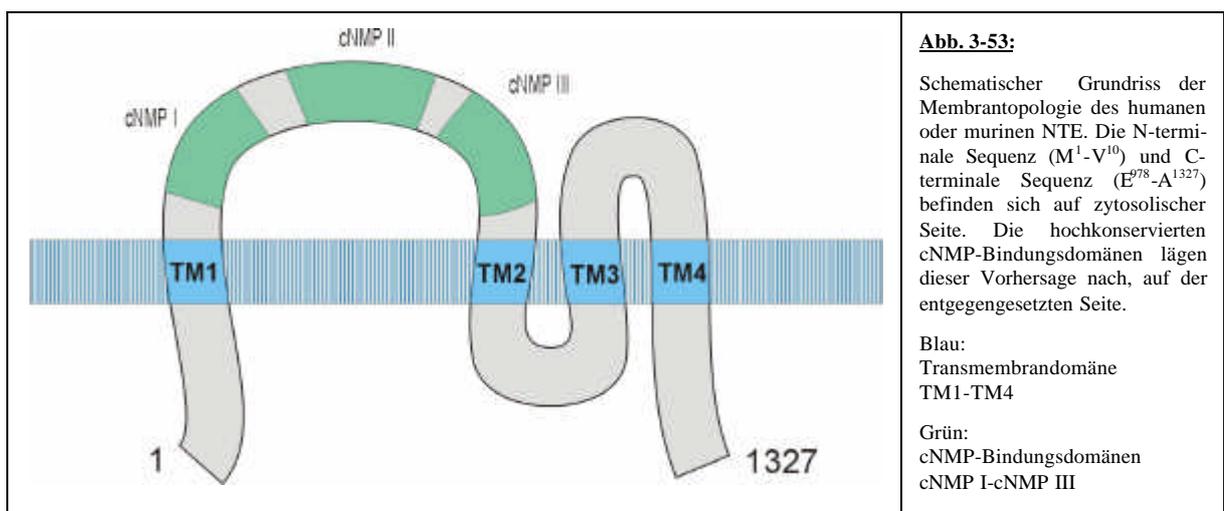
Transmembrandomäne nimmt in allen durchgeführten Analysen den Spitzenplatz ein und stellt damit den Sequenzbereich dar, der am deutlichsten die Charakteristika einer Transmembrandomäne zeigt.

	Polarität	<i>Drosophila</i>		<i>C.elegans</i>		Mensch		Maus	
		Stellung der TransMembrandomäne	score						
TM1	i-a	V ³⁵ -F ⁵⁵	2600	V ²² -Y ⁴¹	2939	L ¹¹ -L ³²	2375	L ¹¹ -L ³²	2444
TM2	a-i	F ⁵⁵⁰ -I ⁵⁷²	749	Y ³²⁰ -P ³⁴⁵	1092	L ⁷³⁴ -L ⁷⁵³	958	L ⁷³⁴ -L ⁷⁵³	802
TM3	i-a	W ⁹⁴⁴ -I ⁹⁶⁵	1045	I ⁹³² -V ⁹⁵³	1032	V ⁹²⁵ -C ⁹⁴³	1087	V ⁹²⁵ -C ⁹⁴³	1087
TM4	a-i	A ⁹⁷⁴ -C ⁹⁹⁵	1639	G ⁹⁶³ -E ⁹⁸³	1192	G ⁹⁵⁶ -E ⁹⁷⁶	1276	G ⁹⁵⁶ -E ⁹⁷⁶	1276

Tab. 3-1: Zusammenfassung der Positionen und Polaritäten der Transmembrandomänen ausgewählter Vertreter. i-a: Polarität von innen nach außen, a-i: Polarität von außen nach innen.

Eine derartig hohe Übereinstimmung der Stellung und der Sequenz der Transmembrandomänen unterstützt die Ergebnisse der Forschung der letzten dreißig Jahre eindrucksvoll. Obwohl Membranlokalisierung von *NTE/SWS* damit hinreichend bewiesen zu sein scheint, so besteht doch Unklarheit über die Bedeutung der einzelnen Transmembrandomänen für die Funktion des Enzyms im physiologischen Hintergrund.

Ein Vergleich der Proteinsequenzen aller vier ausgewählten Organismen durch TMpred Datenbankanalysen ergab einen übereinstimmenden Vorschlag zur Proteintopologie. Das bevorzugte Modell sagt einen zytoplasmatischen N-Terminus voraus. TM1 besitzt nach TMpred-Berechnungen eine Polarität von innen nach außen (i-a). Die durch *Pfam 5.5*-Datenbankvergleich postulierten, zwischen TM1 und TM2 liegenden, zu Bindungskassetten cyklischer Nukleosidmonophosphate der *cAMP-abhängigen Proteinkinase A* homologen Bereiche kommen damit an extrazellulärer Seite zu liegen.



Die vorhergesagte Stellung der Transmembrandomäne TM2 der beiden untersuchten Invertebraten weicht stark von derjenigen der beiden Vertreter der Vertebraten ab. Dies hat einschneidende Folgen

für die vorhergesagte Lokalisation der cNMP-Bindungskassetten und die Membrantopologie der Enzyme *SWS* (*Drosophila*) und *YOL4* (*C.elegans*):

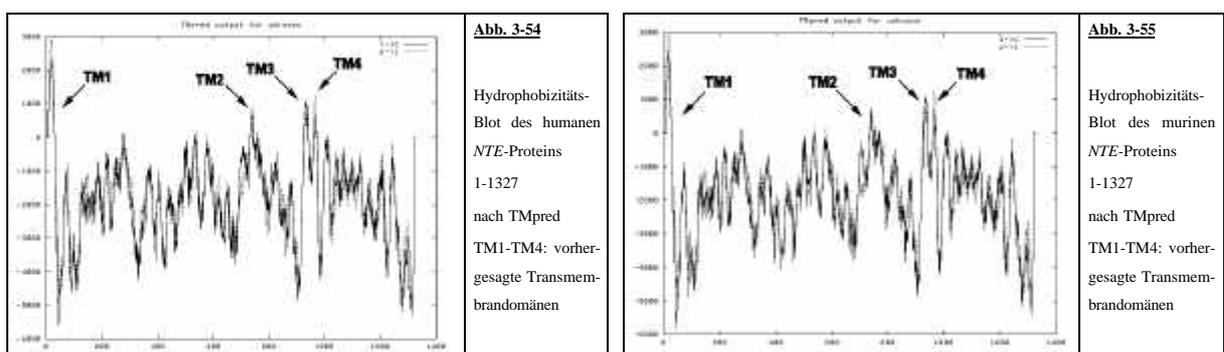
Genus	Stellung der cNMP-Domäne I	Stellung der cNMP-Domäne II	Stellung der cNMP-Domäne III	Stellung der von Tmpred favorisierten TM2
Mensch	162-262	478-573	596-689	734-753
Maus	162-262	479-574	597-690	734-753
<i>C.elegans</i>	278-378	468-567	590-678	320-345
<i>Drosophila</i>	189-289	496-597	620-713	550-572

Tab. 3-2: Vergleich der Position der cNMP-Bindungsdomänen zu der Stellung von TM2 bei ausgewählten Vertretern.

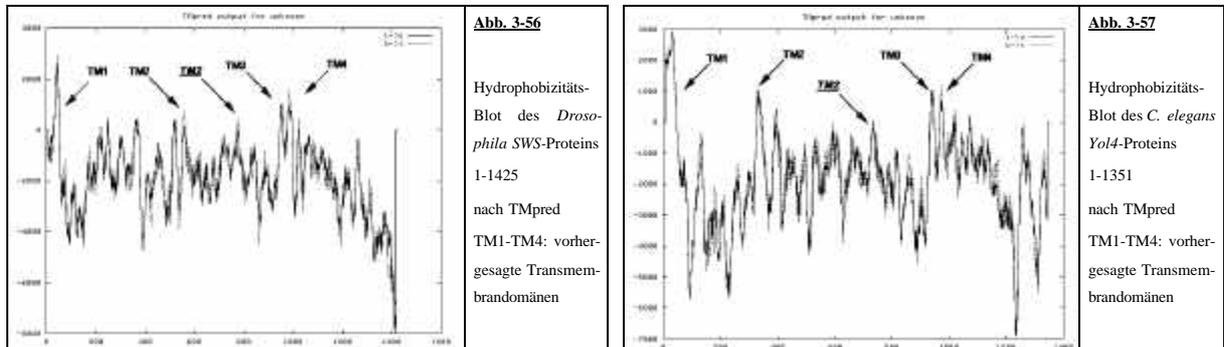
Die Stellung der Transmembrandomäne von *C. elegans* liegt mit den Aminosäuren Y²²⁰-P³⁴⁵ inmitten der ersten cNMP-bindenden Domäne (E²⁷⁸-E³⁷⁸) und legt damit die C-terminal folgenden cNMP-bindenden Domänen auf die zytoplasmatische Seite. Ähnliches gilt für *Drosophila SWS*, nur daß die zweite Transmembrandomäne hier mit den Aminosäuren F⁵⁵⁰-I⁵⁷² erst in der zweiten cNMP-bindenden Domäne liegt. Auch hier würde dadurch die C-terminal folgende cNMP-Domäne auf die zytoplasmatische Seite verlegt. Wenn die cNMP-bindenden Domänen auch sehr stark verwandt sind, so hätten doch extra- oder intrazellulären Anforderungen ausgesetzte Proteinanteile mit hoher Wahrscheinlichkeit Sequenzmotive mit deutlich anderen physikalisch-chemischen Eigenschaften entwickelt. Die starke Konservierung der cNMP-bindenden Domänen impliziert somit eine gleichfalls konservativ evolvierte Membrantopologie.

Dieses fordert in seiner Konsequenz die Suche nach Kandidaten für Transmembrandomänen, mit denen die konservativen, topologischen Anforderungen erfüllt werden können.

Der Vergleich der Hydrophobizitäts-Blots weist neben den vorhergesagten Bereichen noch weitere Transmembrandomänen aus, die im Sinne einer funktionellen Auswahl zumindest auch mit in Betracht gezogen werden sollten. Die Hydrophobizitäts-Blots von Mensch- und Maus-*NTE* zeigen für den Sequenzbereich L⁷³⁴-L⁷⁵³ einen Anstieg der Hydrophobizität über den von dem Programm Tmpred geforderten Schwellenwert hinaus und markieren somit die N- und C-terminalen Grenzen der TM2.



Bei dem Vergleich der Hydrophobizitäts-Blots von *C. elegans*-NTE und *Drosophila*-SWS mit den beiden in Abb. 3-69 und Abb. 3-70 gezeigten Graphen fällt auf, daß es für die Peaks des Menschen und der Maus, welche den Hydrophobizitäts-Anstieg der zweiten Transmembrandomäne markieren, in *Drosophila* und *C. elegans* analoge Sequenzen gibt. Es handelt sich hier um den Sequenzabschnitt F⁷⁶⁹-V⁷⁹¹ für *Drosophila* SWS und um den Abschnitt L⁷²³-L⁷⁴⁸ für YOLA aus *C. elegans*.



Diese beiden, mehr C-terminal gelegenen Bereiche (TM2) sind in ihrem hydrophoben Charakter weniger ausgeprägt, werden aber trotzdem von TMPred als mögliche Kandidaten aufgeführt. Die Verschiebung der zweiten Transmembrandomäne in *Drosophila* und *C. elegans* würde die Kontinuität der Membrantopologie eines innerhalb dieser Proteinfamilie hochkonservierten Sequenzabschnitts mit sich bringen. Die cNMP-Bindungsdomäne III von *Drosophila* und *C. elegans* würde damit auf der selben Seite der Membran zu liegen kommen, wie die entsprechenden Domänen von Maus und Mensch.

Maus	315	PVRGSKRVVSTSGTEDTSKETSGRPLDSIGAPLPGPGADPVKPTSLEAPPAP-LLSR-----	370
Human	315	PVRGSKRMVSTSATDEP-RETGRRPPDPTGAPLPGTGDVPKPTSLETFSAP-LLSR-----	369
<i>Drosophila</i>	336	PINSQTSQSSRQAPNGP-PMVISQMNLMQSAVSGTSSGVSVTVTRPPSSSRHSREEH---	393
<i>C. elegans</i>	295	ESDDAIYVAIDGELTVHIRHMEGK EYLVKCI PAGGSFF LLSMLDILMD-PP -SIFR-----	349
Maus	515	RMIDKAEVCLFVAQPGELVGLAVLTGEPLIFTLRAQRDCTFLRISKSHFYEIMRAQPSVVL	577
Human	514	RMIDKAEDVCLFVAQPGELVGLAVLTGEPLIFTLRAQRDCTFLRISKSDFYEIMRAQPSVVL	576
<i>Drosophila</i>	538	RAQDKSDMLHF VHPGEIVGGLAMLTGEASAYTI RSRSITRIAFIRRAAIYQIMRQRPRIVL	600
<i>C. elegans</i>	518	EENNEDESAVIRVTARELVGGLQILTNEPSFYTIRAAVQTRVAIMKKKDFSAFLEAHPEIYL	570
Maus	727	LTPASN- LSTVAILPVCAEVPMMAFTL ELQHALQAIPTLLNSDVIRALLGASALDSIQEF	788
Human	727	LTPASN- LATVAILPVCAEVPMMAFTL ELQHALQAIPTLLNSDIIRARLGASALDSIQEF	788
<i>Drosophila</i>	744	EANPVTHKYSTVALVPITDEVPMT FTYELYHSLCAIGPVLHLTSDVV RKQLGNSIFEANEY	806
<i>C. elegans</i>	716	PMSHIKN- LHTIAVVPASFDVPLVFPCTCELYHAL SSNLRVLRRLSSQKVAACLDPSVLEKQADF	777

Abb. 3-58
OHMEIOHMEI:
 Vorhergesagte TM2 in der cNMP-Domäne I (*C. elegans*) oder der cNMP-Domäne II (*Drosophila*).
IAJESSASNA:
 Vorhergesagte TM2 von TMPred C-terminal der cNMP-Domäne III (Maus und Mensch)
OJEGGALNA:
 Mögliche TM2 von *Drosophila* und *C. elegans* C-terminal der cNMP-Domäne III in funktionell analoger Lage zu den korrespondierenden Sequenzabschnitten von Maus und Mensch.

Es liegt damit im Bereich des Möglichen, daß die zweite Transmembrandomäne von *Drosophila* und *C. elegans* nicht zwischen den Aminosäuren F⁵⁵⁰-I⁵⁷² beziehungsweise Y³²⁰-P³⁴⁵ liegt, sondern in dem selben Bereich wie die zweiten Transmembrandomänen ihrer Vertebraten-Verebraten zu liegen kommt und aufgrund dieser Verschiebung die Proteine von *Drosophila* und *C. elegans* mit ihren Orthologen in einem funktionellen Kontext bleiben.

Die verwendeten Transmembrandomänen-Analyseprogramme weisen den Proteinen aller untersuchten Orthologen (Mensch, Maus, *Drosophila*, *C. elegans* und *Saccharomyces cerevisiae*) übereinstimmende Polaritäten ihrer Transmembrandomänen zu. Die N-terminale Sequenz, so die übereinstimmenden Berechnungen, liegt auf der zytosolischen Seite einer Membran. Die erste Transmembrandomäne weist von zytosolischer Seite nach außen, die zweite wieder zurück, mit der dritten verlässt das Protein wieder das Zytosol, um nach der vierten Transmembrandomäne mit dem C-terminalen Rest wieder im Zytosol zu liegen zu kommen. Die hochkonservierte Region der *cNMP-Bindungsdomänen* liegen bei allen untersuchten Vertretern (auch bei *Drosophila* und *C. elegans* unter den in dieser Arbeit gemachten Annahmen) zwischen der ersten und der zweiten Transmembrandomäne und damit auf der dem Zytosol abgewandten Seite der Membran. Diese Domänen stellen ein gemeinsames Merkmal einer Familie von Ionenkanälen dar, die direkt von zyklischen Nukleotiden reguliert werden (Yau, 1994). Die Homologie dieser cNMP bindenden Domänen zu ligandengesteuerten Ionenkanälen steht in Einklang mit einem zweiten, hochkonservierten Sequenzabschnitt der *SWS/NTE*-Proteinfamilie, der Domäne UPF0028, die nach aktuellen Forschungen, Eigenschaften einer Membranpore aufweist (Padilla, 1989; Thomas, 1990)

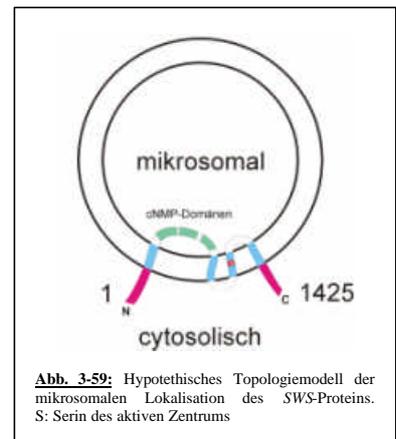
Schon seit längerem ist die Regulation zellulärer Prozesse durch zyklische Nukleotide Gegenstand intensiver Forschung (Levitan, 1994). Es handelt sich in den meisten Fällen jedoch um eine *indirekte Regulation*, bei der die Veränderung physiologischer Parameter durch die Phosphorylierung verschiedener Ziel-Enzyme bewirkt wird. Die zyklischen Nukleotide treten hierbei als Mediator eines meist G-Protein gekoppelten Außenimpulses auf. Die zyklischen Mononukleotide aktivieren Kinasen oder Phosphatasen und diese verändern die Permeabilität oder die Katalyserate des zu regulierenden Proteins durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung.

Die Entdeckung von Kanälen, die direkt durch zyklische Nukleotide reguliert werden, stellte somit eine Abweichung von dieser Regel dar. Prinzipiell wird auch dieser Signaltransduktionmechanismus durch die Aktivierung von G-Proteinen weitergeleitet. Im Gegensatz zu der *indirekten Regulation* wirkt das G-Protein hier jedoch auf eine Cyklase oder Phosphodiesterase, die in Folge ein direkt zu bindendes oder schon gebundenes zyklisches Mononukleotid umsetzen und damit zu einer Veränderung der Permeabilität des Kanals führen. So bewirkt die Spaltung von assoziiertem cGMP den Verschluss eines Na⁺-Kanals und damit die Hyperpolarisierung der retinalen Photorezeptormembran in Vertebraten (Yau und Baylor, 1998). Neben der visuellen Signaltransduktion werden in der olfaktorischen Signaltransduktion cAMP-gesteuerte Kanäle durch die Aktivierung einer Adenylatcyklase geöffnet, führen damit zu einer Depolarisation der Membran und zur Generierung eines Aktionspotentials (Reed, 1992). Inzwischen wurden derartige Membranproteine auch aus so unterschiedlichen Geweben wie der humanen Niere (Biel et al., 1994) oder der Pinealdrüse (Dryer und Henderson, 1991) isoliert und kloniert. Es ist anzunehmen, daß derartige Kanäle in vielfältigen physiologischen Prozessen involviert sind. Allen bislang untersuchten

Vertretern ist eine *zytosolische* Steuerung durch die Aktivierung einer Phosphodiesterase oder einer Nukleotid-Zyklase und eine darauf folgende Änderung des Bindungsstatus von zyklischen Mononukleotiden durch das Kanalprotein gemeinsam.

Dieser gemeinsame Regulationsmechanismus beinhaltet im Falle des *SWS/NTE*-Proteins gewisse Probleme. Wenn die Vorhersagen der Transmembrananalysen korrekt sind und sowohl das N-terminale, wie auch das C-terminale Ende des Proteins auf zytosolischer Seite liegen, muss man die cNMP-bindenden Domänen auf der entgegengesetzten Seite der Membran vermuten. Die Regulation von cNMP gesteuerten Proteinen durch diese Kofaktoren von extrazellulärer Seite her ist zwar prinzipiell möglich, erscheint aber aufgrund des schwerer zu kontrollierenden extrazellulären Milieus

unwahrscheinlich. Die von P. Glynn durchgeführten immunologischen Lokalisationsanalysen des *NTE*-Proteins im Gehirn des Huhns unterstützen die Hypothese, daß es sich bei *SWS/NTE* um ein mikrosomales Protein handelt (Kapitel 1.3.4, Abb. 1-13). Deswegen ist es denkbar, daß es sich bei *SWS/NTE* um einen von zyklischen Mononukleotiden gesteuerten Kanal handelt, dessen regulatorische Domänen auf der Lumenseite der mikrosomalen Membran liegen. Die Vorstellung, die funktionelle Konformation von *SWS/NTE* liegt in Form einer oligomeren Pore vor, deren regulatorische Anteile von cNMP's angesteuert werden, die die Konformation des Proteins verändern und dieser Zustand durch Autokatalyse des aktiven Esterase-Zentrums innerhalb der wässrigen Pore wieder aufgehoben wird, ist nach bisherigem Kenntnisstand zwar spekulativ, verdient aber eine vertiefende Betrachtung.



3.5 Die Rolle des Serins im aktiven Zentrum der Esterase

Der katalytische Mechanismus von Serinesterasen, ihre strukturellen und funktionellen Homologien, sind schon seit langem Gegenstand intensiver Forschung. Ihre starke Sequenzhomologie steht in gewissem Gegensatz zur Vielfalt ihrer Substrate, die von dem Neurotransmitter Acetylcholin bis zu dem Juvenilhormon der Insekten reicht (Krejci et al., 1991). Der hydrolytische Mechanismus unter Zuhilfenahme einer katalytischen Triade ist aus einer großen Anzahl von Vertretern dieser Enzymfamilie bis auf molekulare Details aufgeklärt (Aldridge et al., 1972). *NTE/SWS* weist sich aufgrund der in dieser Familie hoch konservierten Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums G-X-S-X-G als Serinesterase aus. Darüber hinaus konnten die Aminosäuren der katalytischen Triade identifiziert und ihr Mitwirken an einer Funktion des Enzyms nachgewiesen werden (Glynn, 2000). Obwohl die molekularen Vorgänge der *NTE*-Inhibition bis ins Detail beschrieben sind, so ist doch der Entstehungsmechanismus verzögerter Neuropathien (OPIDN) noch völlig unklar (Johnson, 1982).

Organophosphate sind schon seit langer Zeit als Inhibitoren von Serin-Esterasen und Serin-Proteasen verwendet worden. OPIDN wird nur von solchen Organophosphaten hervorgerufen, welche die Fähigkeit zur sogenannten „Alterung“ besitzen (Johnson, 1974). Diese *neuropathischen* Organophosphate hinterlassen durch Abspaltung eines Alkylrests eine negative Ladung im aktiven Zentrum von *NTE/SWS*. Erstaunlicherweise hat die bloße Inhibition des aktiven Zentrums mit einem *nicht-neuropathischen* Organophosphat, welches das aktive Zentrum ohne Hinterlassung einer negativen Ladung inhibiert, auch über einen Zeitraum von zwei Wochen keine schädigenden Folgen für den Organismus (Meredith et al., 1988). Die Kombination aus Inhibition der Esterasefunktion und einer negativen Ladung, die kovalent mit dem Serin des aktiven Zentrums verknüpft ist, scheint für die Ausbildung der klinischen Symptome von OPIDN notwendig zu sein (Johnson, 1990). Darüber hinaus kommt es nach der Abspaltung des Alkylrests bei manchen Organophosphaten zu einer intramolekularen Umlagerung. Der Alkylrest kann mit dem Asp¹⁰⁴⁴ kovalent verknüpft werden und dadurch möglicherweise eine Veränderung einer nicht-Esterase-Funktion bewirken, die ihrerseits den Anstoß zu der Entwicklung des klinischen Phänotyps OPIDN gibt (Glynn, 2000).

Durch die ektopische Expression einer *Drosophila* cDNA, in welcher das Serin des aktiven Zentrums durch ein Aspartat ausgetauscht wurde (*p{sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}*) kann Aufschluss darüber erlangt werden, ob eine negative Ladung im aktiven Zentrum des Enzyms alleine genügt, um ein pathologisches Erscheinungsbild in *Drosophila melanogaster* zu erzeugen und ob die Esterasefunktion für die pathologischen Erscheinungen der Überexpression wildtypischer cDNAs verantwortlich ist.

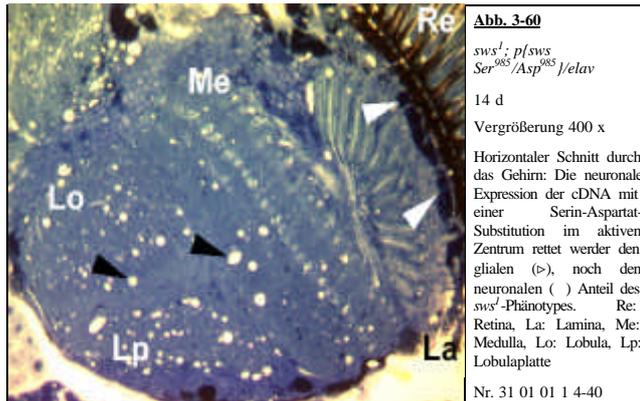
Entgegen allen vorangegangenen Expressionsexperimenten konnte das $p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukt auch unter Kontrolle des *actin*-Promotors aktiviert werden. Die Expression der vorangegangenen UAS-Konstrukte war unter der Kontrolle des *actin*-Promotors in jedem Fall letal. Aufgrund dieser Tatsache werden die histologischen Auswirkungen der induzierten Expression dieser cDNA unter Kontrolle der *elav*-, *loco*-, und *actin*-Treiber untersucht. Da die Untersuchungen der Expression des Konstrukts $p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}$ sehr einheitliche Ergebnisse zeigten, werden die induzierten Expressionen unter Kontrolle aller drei Treiber im wildtypischen Hintergrund, wie auch in den Mutanten, zusammengefasst.

3.5.1 Zusammenfassung der PV-Aktivitätsmessung der Expression des $p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukts

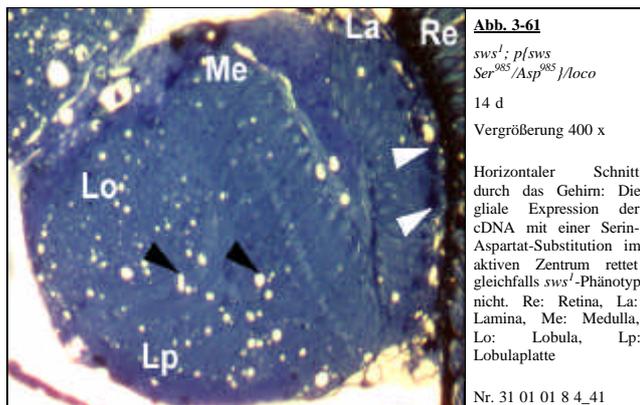
Die Aktivitätsmessungen der ektopischen Expression im mutanten Hintergrund sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt worden. Ebenso wie die Überexpression des $p\{sws-TM\}^{17}$ -Konstrukts, führt auch die Überexpression der cDNA mit einer Serin-Aspartat-Substitution im aktiven Zentrum zu keiner Erhöhung der PV-Esterase-Aktivität. Mit 55 nmol/min/mg Protein ($w; p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}/elav$), 64 nmol/min/mg Protein ($w; p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}/loco$) und 50 nmol/min/mg Protein ($w; p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}/actin$) liegen die PV-Aktivitäten aller drei verwendeten Expressionssysteme im Bereich der wildtypischen Aktivität. Dieses steht in Einklang mit den Erwartungen, da die vorgenommene Modifikation eine Inhibition des aktiven Zentrums auf Ebene der Primärstruktur darstellt und somit von einem derart veränderten Enzym kein Substrat umgesetzt werden kann.

3.5.2 Ektopische Expression des $p\{UAS-sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}$ Konstrukts unter Kontrolle der *elav*-, *loco*- und *actin*-Treiber im *sws*¹-Hintergrund

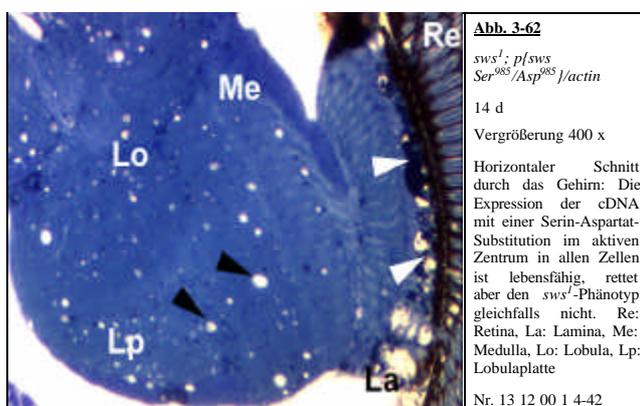
Der Aktivitätsverlust des $p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukts korrespondiert mit seiner physiologischen Wirkungslosigkeit. Die Expression im mutanten Hintergrund veränderte den histologischen Status der *sws*¹-Mutante in keiner Weise.



Die Expression des $p\{sws\ Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukts hat keinerlei Effekt auf den mutanten *sws*¹-Hintergrund. Der Vergleich zwischen Individuen, in denen die modifizierte cDNA unter *elav*-, *loco*- oder *actin*-Kontrolle induziert wurde, ergab keinen Hinweis auf eine Verbesserung oder Verschlechterung des *sws*¹-Phänotypes.



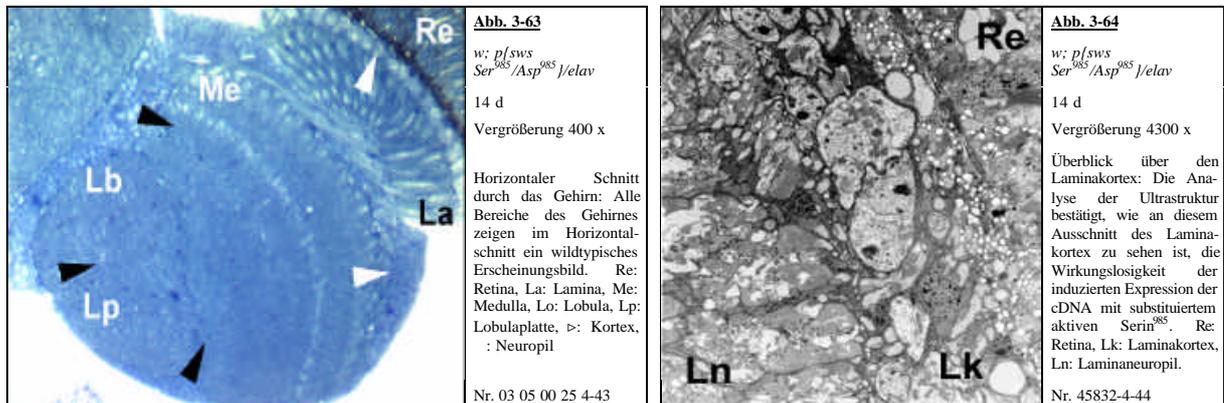
Die Schädigungen der kortikalen Zellschichten bleiben, ebenso wie die dunkel angefärbten Membranakkumulationen (▷ Abb. 3-60, 3-61, 3-62) in allen transgenen Fliegen erhalten. Die Vakuolen des Neuropils (◁ Abb. 3-60, 3-61, 3-62) sind ebenso keiner Veränderung durch die Expression der cDNA ausgesetzt. Diese Tiere unterschieden sich auch nicht bezüglich ihrer Lebensspanne von den Kontrollgruppen.



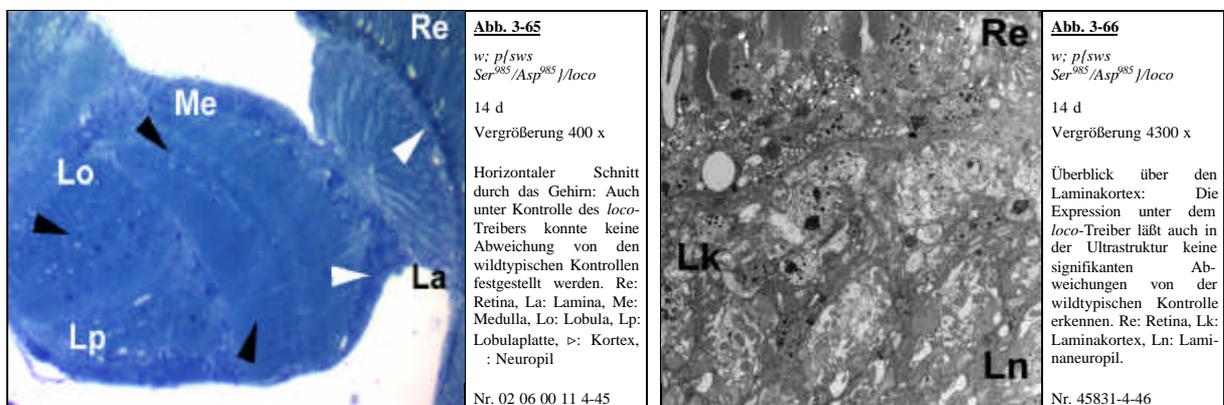
Da keiner der Genotypen eine sichtbare Revertierung oder Verschlechterung des *sws*¹-Phänotyps zeigte und die Inaktivität des Enzyms aufgrund der biochemischen Untersuchungen bekannt war, wurde auf eine weitergehende Analyse der Ultrastruktur verzichtet.

3.5.3 Ektopische Expression des $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}$ Konstrukts unter Kontrolle der *elav*-, *loco*- und *actin*-Treiber im wildtypischen Hintergrund

Auch die Überexpression im wildtypischen Hintergrund verursachte keinerlei histologische Änderungen im Vergleich zu w^{1118} oder wildtypischen Fliegen.

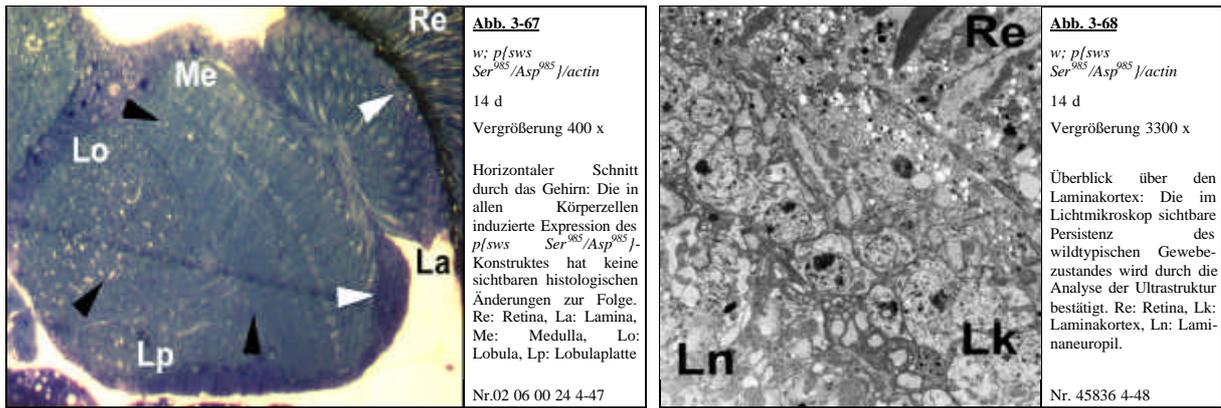


Die *elav*-gesteuerte Expression des $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukts zeigt auf lichtmikroskopischem Niveau keine abnormen histologischen Muster im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-63). Die Bereiche des Neuropils (\blacktriangleleft) und die Zellkörper der Neurone in den kortikalen Zonen (\blacktriangleright) sind unverändert. Dieser Befund wird von den elektronenmikroskopischen Analysen bestätigt (Abb. 3-64).



Die gliale Expression des $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukts unter Kontrolle des *loco*-Treibers zeigt gleichfalls keine Veränderungen auf lichtmikroskopischer Ebene im Neuropil (Abb. 3-65, \blacktriangleleft) und im Kortex (\blacktriangleright), sowie in der Analyse der Ultrastruktur (Abb. 3-66).

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang das phänotypisch wildtypische Gewebe des $w; p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}^2/actin$ -Stamms (Abb.: 5-76). Alle anderen im Laufe dieser Arbeit verwendeten UAS-Konstrukte ($p\{sws\}^{10}$, $p\{m-nte\}^{13}$, $p\{sws-TM\}^{17}$) waren unter Kontrolle des *actin*-Promotors letal. Die Expression des $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukts ist nicht nur uneingeschränkt lebensfähig, sondern zeigt darüber hinaus auch keinerlei histo-pathologische Folgen dieser induzierten Genexpression auf lichtmikroskopischer Ebene (Abb. 3-67) und auf elektronenmikroskopischer Ebene (Abb. 3-68).



Um zu überprüfen, ob die natürliche Überlebensrate der *actin*-getriebenen Expression auf eine genetische Inaktivität des $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}$ -Konstrukts zurückzuführen ist, wurden drei weitere unabhängige p-Element-Linien des gleichen UAS-Konstrukts ($p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}^6$, $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}^4$, $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}^7$) mit dem *actin-GAL4*-Treiber gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzung zeigten ebenfalls keine Letalität. Es liegt also nahe anzunehmen, daß der Inaktivität des $w; p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}^2$ -Konstrukts die Blockade des aktiven Zentrums und nicht eine heterochromatische Insertion des p-Elements zugrunde liegt.

Die mangelnde Fähigkeit des $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}^2$ -Konstruktes zur *Rettung* des mutanten *sws*¹-Phänotyps legt eine gewichtige Rolle des aktiven Zentrums bei der Entstehung des *sws*-Phänotyps nahe. Neben der korrekten Positionierung des Proteins in der Membran und der Aufrechterhaltung einer physiologisch notwendigen Membrantopologie, benötigt *SWS/NTE* eine unversehrte Esterasedomäne, um den mutanten Phänotyp revertieren zu können.

Es ist durch ektopische Expression dieses Konstrukts nicht gelungen, einen OPIDN ähnlichen Phänotyp auszulösen. Die im wildtypischen Hintergrund vorhandenen nativen *SWS*-Moleküle könnten die Entstehung von OPIDN verhindert haben. Wenn man die Aktivitätswerte der $p\{sws\}^{10}$ -Überexpression als Maßstab für die *loco*-getriebene Produktion des Enzyms nimmt, so ergibt sich unter *loco*-Kontrolle ein Anteil von 95% für das zelluläre Aufkommen des *SWS*-(*Ser*⁹⁸⁵/*Asp*⁹⁸⁵)-Proteins. Im Menschen geht man davon aus, daß die Entwicklung von OPIDN bei einer Inhibition von zirka 70% des *NTE*-Proteins einsetzt (Lotti, 1992). Dieser Anteil wäre in *Drosophila melanogaster* durch die *loco*-getriebene Expression von $p\{sws Ser^{985}/Asp^{985}\}^2$ bei weitem erreicht. Dieser inhibierte Anteil des *SWS/NTE*-Proteins spielt jedoch möglicherweise *zusätzlich* zu dem normalen zellulären *SWS*-Protein keine entscheidende Rolle. Darüber hinaus ist es nicht bekannt, ob *Drosophila melanogaster* auf die Inhibition von *NTE* generell eine histopathologische Entwicklung, die mit OPIDN vergleichbar wäre, vollziehen würde, da die Empfindlichkeit, mit der Organismen auf die Inhibition von *NTE* reagieren, mit sinkender Körpergröße immer geringer wird (Glynn, 2000).

Des Weiteren hat das von uns eingeführte *Aspartat*⁹⁸⁵ anstelle des *Serin*⁹⁸⁵ ausschließlich die Einführung eines negativ geladenen Restes im aktiven Zentrum zur Folge. Da bei der Entstehung von OPIDN neben der negativen Ladung im aktiven Zentrum auch die Abspaltung des Arylrestes von dem Organophosphat als induktives Ereignis diskutiert wird (Glynn, 2000), könnte das $p\{sws$

Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵-Konstrukt als Induktor eines neuropathischen Status wirkungslos bleiben. Der nach Expression des *Drosophila*- und Maus-Orthologen feststellbare Überexpressions-Phänotyp in Gliazellen, bleibt bei der *loco* getriebenen Überexpression des *p{sws Ser⁹⁸⁵/Asp⁹⁸⁵}*²-Konstrukts aus. Hier scheint das funktionelle, aktive Zentrum des *SWS/NTE*-Proteins durch eine Steigerung der *turn-over*-Rate des noch unbekanntes Substrats ursächlich an der Ausbildung und Akkumulation der lysosomalen Vesikel (Kapitel 3.2.2) beteiligt zu sein.

3.5.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß die *Serin-Aspartat*-Substitution im aktiven Zentrum des *SWS/NTE*-Proteins nicht nur die *in vitro* Aktivität des UAS-Konstrukts beseitigt. Sie führt auch zu einer völligen Funktionslosigkeit im physiologischen Hintergrund. Die Überexpression im wildtypischen Hintergrund hat, ebenso wie die Expression im *sws¹*-Hintergrund, keinerlei sichtbare Veränderungen der neuronalen oder glialen Gewebeanteile zur Folge. Diese physiologische Wirkungslosigkeit unterstützt die Hypothese, daß weder die bloße Inhibition des aktiven Zentrums des *SWS/NTE*-Proteins, noch die alleinige Anwesenheit einer negativen Ladung im aktiven Zentrum, zu den in der Literatur ausführlich beschriebenen neuropathologischen Phänotypen führt, sondern weitere bislang unbekannte Modifikatoren an der Entstehung von OPIDN beteiligt sein müssen.

3.6 Ergebnisse der Untersuchungen des Lipidhaushaltes von *swiss-cheese*-Fliegen: Spielt *sws* eine Rolle im Membranmetabolismus?

Die Suche nach einer möglichen Funktion des *SWS/NTE*-Proteins im zellulären Kontext bedarf einer Einengung der vielfältigen möglichen Funktionshypothesen. Die Membranlokalisation des *SWS/NTE*-Proteins und die Stellung seines aktiven Serins inmitten einer Transmembrandomäne legten den Verdacht nahe, diese Serinesterase könne am Membranmetabolismus der Neuronen in einer noch näher zu bestimmenden Art beteiligt sein.

Ein auffälliges histologisches Merkmal des Nervensystems von *sws*-Fliegen sind pathologische Veränderungen der Membranstruktur zentralnervöser Zellen. Diese Veränderungen fallen in *sws*-Individuen als ungeordnete Membranakkumulationen insbesondere zwischen Lamina und Retina, sowie schwächer im restlichen Kortex auf. Ähnliche Veränderungen sind auch als Folge mehrerer Überexpressionsstudien zu beobachten. Eine Störung des Membrankatabolismus ist somit möglicherweise in den Funktionskreis des *SWS*-Proteins mit einzubeziehen. Die Identifizierung *spezifischer* Veränderungen der Membranzusammensetzung verschiedener *sws*-Allele könnte im Weiteren dienliche Hinweise auf die Funktion des Proteins geben. Um einen Einfluß der *sws*-Mutation auf die korrekte Balance verschiedener Membranbestandteile von wildtypischen und *sws*-Fliegen zu

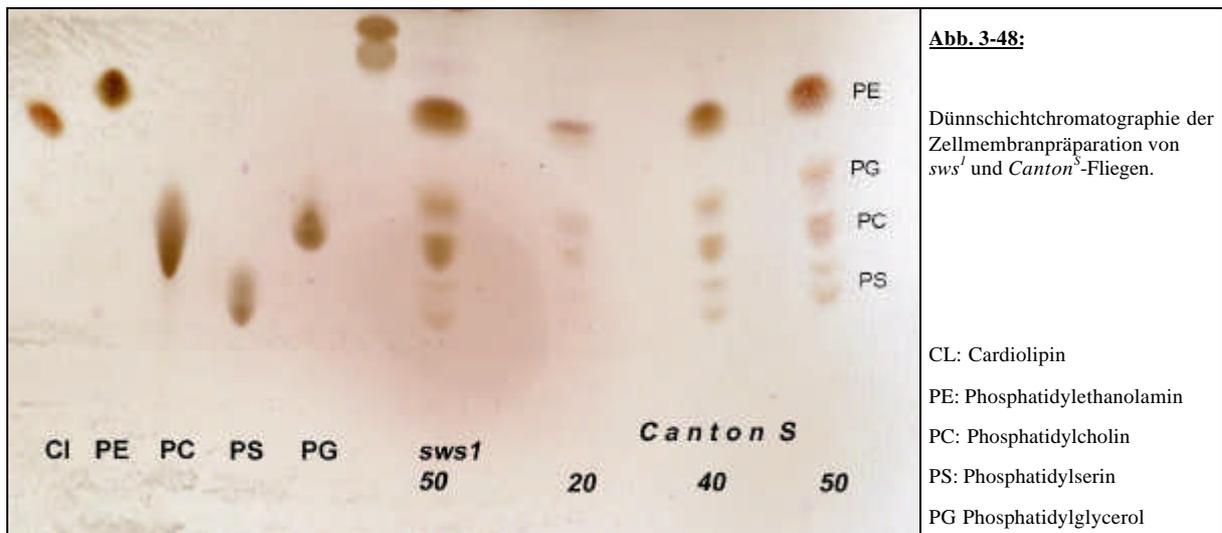
untersuchen, wurden mit dünnschicht- und gas-chromatographischen Methoden potentielle Abweichungen untersucht.

3.6.1 Dünnschichtchromatographie

Um zu Überprüfen, ob sich die Mutation des *sws*-Gens in einer Veränderung der Membranzusammensetzung äußert, wurden mit herkömmlichen dünnschicht-chromatographischen Methoden Untersuchungen durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie der Universität Regensburg wurden von Membranpräparationen der Stämme *w¹¹¹⁸*, *sws⁴* und *sws¹* Dünnschicht-chromatographien erstellt. Charakteristische Komponenten der derart aufgetrennten Membranfraktionen wurden mit Hilfe von Markersubstanzen (Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin) innerhalb des selben Laufs quantitativ miteinander verglichen.

Hierfür wurden je 200 Fliegen einer Gesamt-Membran-Extraktion unterzogen und die bis zur Trockne eingeeengten Lipide in 50 µl Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen. Aufgetragen wurden 25 µl des Eluats.



Das Verteilungsmuster der Phospholipide der *sws¹*-Fliegen unterscheidet sich augenscheinlich nicht signifikant von dem Verteilungsmuster der Präparationen von wildtypischen Fliegen. Lediglich eine schwache Erhöhung des Phosphatidylcholin- und des Phosphatidylethanolamin-Spiegels kann erkannt werden. Diese Schwankungen sind jedoch sehr schwach und mit den am Lehrstuhl etablierten Methoden nicht näher zu quantifizieren.

3.6.2 Gaschromatographische Untersuchung der Neutrallipide

Zur spezifischeren Analyse der Neutrallipide in wildtypischen und in *sws^l*-Fliegen wurden in Kooperation mit Herrn Drobnik am Universitätsklinikum Regensburg gaschromatographische Messungen vorgenommen. Hierbei wurden als membranspezifische Leitwerte der Gehalt an Triglyceriden, sowie Cholesterin- und Cholesterinester analysiert.

Probe	Triglyceride $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein	Cholesterin $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein	Cholesterinester $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein
WILDTYPISCH	21,7	13,3	5,8
<i>sws^l</i>	19,5	16,7	2,1
<i>sws^d</i>	15,2	9,4	4,0

Tab. 3-3: Gaschromatographische Bestimmung von Membrankomponenten am Universitätsklinikum Regensburg

Auch hier kann in den Schwankungen keine einheitliche Tendenz festgestellt werden. Die Absenkung des Cholesterinester-Gehalts von 5,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ im WT auf 2,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in der Nullmutation *sws^l* kann auf einer Veränderung der Enzymaktivität des *sws*-Genprodukts beruhen. Da es sich hier aber lediglich um eine Einzelmessung handelt, können keine tendenziellen Aussagen gemacht werden.

Um diese Daten zu verifizieren, wurden in einer zusätzlichen Kooperation mit Frau Athenstaedt an der Universität Graz weitere gaschromatographische Messungen vorgenommen. Hier wurden Membranbestandteile wie Sterole, Sterolester und Triglyceride in *w¹¹¹⁸*-, *sws^d*- und *sws^l*-Fliegen quantifiziert.

Stamm	Messung	Sterol/Phospholipid in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	Sterolester/ Phospholipid in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	Triglycerid/ Phospholipid in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$
<i>sws^l</i>	Nr.1	1,109 +/- 0,067	0,658 +/- 0,003	11,094 +/- 3,217
	Nr.2	1,142 +/- 0,085	0,450 +/- 0,008	17,295 +/- 0,252
	Nr.3			11,591 +/- 1,286
	gerundeter Mittelwert	1,13	0,57	13
<i>sws^d</i>	Nr.1	1,298 +/- 0,078	1,154 +/- 0,088	12,614 +/- 0,343
<i>w¹¹¹⁸</i>	Nr.1	1,744 +/- 0,113	1,614 +/- 0,155	23,031 +/- 0,454
	Nr.2	1,150 +/- 0,260	1,630 +/- 0,237	27,710 +/- 0,883
	gerundeter Mittelwert	1,4	1,6	25,4
<i>pGH5-loco</i>	Nr.1	1,431 +/- 0,113	1,184 +/- 0,052	24,775 +/- 0,883

Tab. 3-4: Gaschromatographische Bestimmung von Membrankomponenten an der Universität Graz

Die gaschromatographischen Untersuchungen der *sws^l*-, *sws^d* und *w¹¹¹⁸*-Fliegen am Universitätsklinikum Regensburg durch Herrn Drobnik ließen keine Interpretation hinsichtlich einer

tendenziellen Veränderung der Werte zu. Die von Karin Athenstaedt an der Universität Graz durchgeführten gaschromatographischen Messungen schienen dahingegen eine Verminderung der Triglyceride, der Sterolester und der Sterole in den beiden mutanten Allelen anzudeuten. Vergleicht man die gerundeten Durchschnittswerte der Messungen der beiden *sws*-Allele mit den Ergebnissen der *w¹¹¹⁸*-Kontrolle, so ergibt sich für die Mutanten eine signifikante Erniedrigung aller untersuchten Membrankomponenten.

Stamm	Sterol/Phospholipid in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ (% <i>w¹¹¹⁸</i>)	Sterolester/ Phospholipid in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ (% <i>w¹¹¹⁸</i>)	Triglycerid/ Phospholipid in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ (% <i>w¹¹¹⁸</i>)
<i>sws¹</i>	1,13 (77 %)	0,57 (34 %)	13 (52 %)
<i>sws⁴</i>	~1,3 (89 %)	~1,2 (71 %)	~12 (49 %)
<i>w¹¹¹⁸</i>	1,4 (100 %)	1,6 (100 %)	25,4 (100 %)

Tab. 3-5: Zusammenfassung der durchschnittlichen und prozentualen Veränderungen von Membrankomponenten in *sws*-Allelen und *w¹¹¹⁸*

Eine derartig umfassende Änderung der Membrankomponenten würde auf einen zentralen Einfluß des SWS-Proteins auf den Membranmetabolismus hindeuten. Die durchweg größere Abweichung des *sws¹*-Alleles von *w¹¹¹⁸*-Fliegen im Vergleich zu den Abweichungen des *sws⁴*-Alleles, würde auf eine stärkere Minderung der physiologischen Aktivität von *sws¹* aufgrund der Nullmutation zurückzuführen sein. Lediglich die Triglyceridkonzentration erwies sich in der Mutation *sws⁴* als noch niedriger als in der *sws¹*-Mutation.

Wenn die *sws¹*-Mutation zu einer Erniedrigung des Sterolestergehalts in der Membranfraktion von Kopfgewebe führt, dann sollte die *Überexpression* der wildtypischen cDNA unter der Kontrolle eines starken Promotors gleichfalls in einer Veränderung des Gehalts an Sterolestern münden. Die wildtypische cDNA von *Drosophila melanogaster* unter Kontrolle des *loco*-Promotors (*w*; *p{sws⁵/loco}*) hat eine gegenüber dem Wildtyp um das zwanzigfache erhöhte Phenyl-Valerat-Esterase-Aktivität. Die Bestimmung des Sterolester-Gehalts von Fliegen des Genotyps *w*; *p{sws⁵/loco}* ergab jedoch mit 1,184 +/- 0,052 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Protein einen Wert, der immer noch unter dem wildtypischen Mittelwert von 1,622 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Protein liegt. Da die Aktivitätserhöhung des SWS-Proteins um den Faktor zwanzig keine Erhöhung des Gehalts an Sterolestern zur Folge hat, könnte aber auch auf eine redundante Regulation zurückgeführt werden. So erscheint es möglich, daß über eine negative Rückkopplung die Konzentration der Sterolester auf ein wildtypisches Maß und sogar darüber hinaus herunterreguliert wird.

Diese ersten Hinweise auf eine Veränderungen von Membranmetaboliten im mutanten Hintergrund und in verschiedenen Expressionssystemen, legen die Forderung nach einer systematischen Überprüfung der biochemischen Folgen der *sws¹*-Mutation nahe. Diese zukünftige Analyse birgt einen vielversprechenden Einblick in die Dynamik der histologischen Pathologie der *sws*-Mutation und weist unter Umständen andere Mitglieder des durch die *sws¹*-Mutation gestörten Funktionskreises aus.

3.7 Analyse der Defizienzkreuzungen 61A1-100F5

Indem man das mutierte Gen in den genetischen Hintergrund einer Defizienz einkreuzt, können Interaktionen des mutierten Gens mit einem möglichen Partner, dessen Lokalisation innerhalb der verwendeten Defizienz liegt, zu Verstärkungen oder Abschwächungen des mutanten Phänotyps führen. Eine detailliertere Untersuchung der Gene, die innerhalb dieser Defizienz liegen, kann Hinweise auf Genprodukte geben, die mit dem zu untersuchenden Protein in einem funktionellen Zusammenhang stehen.

Es wurden *sws¹*-Jungfrauen mit Männchen der Defizienzsammlung des dritten Chromosoms gekreuzt. Da die Defizienz immer über einem Balancer gehalten wird, kann man mögliche Veränderungen des Phänotyps durch den Vergleich der balancierten Nachkommen mit den die Defizienz tragenden Nachkommen erkennen. Von allen Linien wurden Paraffin-Schnitte der Stämme *sws¹/y; Emc-E12* bis *faf-BP/III* und *sws¹/y; TM6/III* angefertigt. Bei keinem der histologisch überprüften Genotypen konnte in den Paraffin-Schnitten eine signifikante Verstärkung oder Abschwächung des *sws*-Phänotyps entdeckt werden. Lediglich die Kreuzung *sws¹ x W10/TM6* erbrachte weder männliche noch weibliche *sws¹*-Nachkommen mit der Defizienz. Die sich von 75A7 bis 75C1 erstreckende Defizienz W10 schien somit eine, sich auch in Wiederholungsexperimenten bestätigende, letale Wechselwirkung mit der *sws¹*-Mutation aufzudecken. Die Kreuzung mit der davon rechts gelegenen, teilweise überlappenden Defizienz *Cat/TM6* zeigte keinerlei histologische Auffälligkeiten, so dass die letale Wechselwirkung des *sws¹*-Phänotyps mit der Defizienz W10/TM6 auf einen Bereich von 74A7 bis 75B8 eingeengt werden konnte.

Die in diesem Bereich bekannten offenen Leseraster wurden mit Hilfe der Datenbank *Fly Base Cyto Search* ermittelt (folgende Seite):

Loci	Annotation	Beschreibung (Gad fly)	Loci	Annotation	Beschreibung (Gad fly)
75A	l(3)S103408		75B	l(3)S045608	letal
75A4-6	CG5535	DNA Primase, p58 UE	75B	l(3)S044823	letal
75A4-7	CG7408	Arylsulfatase B	75B	l(3)S034305	letal
75A4-8	CG5506	keine Homologien bekannt	75B	l(3)S024135	letal
75A5-8	CG16775	<i>Drosophila melanogaster</i> STS Dm1837	75B	l(3)S005302	letal
75A6-8	CG7402	Arylsulfatase B	75B	l(3)S001717	letal
75A6-8	CG5492	„platelet endothelial tetraspan antigen“	75B	l(3)S000107	letal
75A7-8	CG5485	Sulfate Transporter	75B1-2	l(3)rL061	letal
75A8	CG14353	keine Homologien bekannt	75B1-7	l(3)S102211	letal
75A8	CG5290	O-GlcNAc Transferase	75B3-10	anon-XV	?
75A8-9	l(3)02634	keine Homologien bekannt	75B5-10	E(var)181	?
75A9-75B6	Eip75B	Steroidhormone Receptor	75B6-7	CG13697	keine Homologien bekannt
75B	l(3)S017014	letal	75B7-9	CG13698	keine Homologien bekannt
75B	l(3)S147006	letal	75B8-11	CG7354	keine Homologien bekannt
75B	l(3)S146004	letal	75B8-11	CG5147	keine Homologien bekannt
75B	l(3)S097001	letal	75B11-13	Cyp312a1	Zytochrom p450

Tab. 3-6: Mögliche Interaktionspartner des SWS-Proteins aus dem Defizienzbereich *61A1-100F5*

Die letale Interaktion der *sws*¹-Mutation mit dem diese Gene umfassenden Defizienzbereich, stellt einen deutlichen Hinweis auf eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen dem SWS-Protein und einem oder mehreren der hier aufgeführten Genprodukte dar.

Die Ergebnisse der Defizienzkreuzungen sind als erste Hinweise auf mögliche Interaktionspartner des SWS/NTE-Proteins zu verstehen. Von den bis jetzt bekannten und in Datenbanken wie FlyBase aufgeführten 32 offenen Leserastern im Bereich *75A7-75C1* sind 13 letal. Eine dieser letalen Linien (*l(3)rL061*) ist bis dato als Fliegenstamm erhältlich (*Bloomington stock 12103*). Elf weiteren Genomannotationen sind bislang keine Homologien zugeordnet. Die verbleibenden acht Transkriptionsbereiche zeigen in unterschiedlichem Maß bereits bekannte Beteiligung an neurodegenerativen Erkrankungen und müssen im einzelnen noch auf eine individuelle Wechselwirkung mit dem SWS/NTE-Protein überprüft werden.

Symbol	Genprodukt	mutante Allele in <i>Drosophila</i>	Referenzen
CG5535	kationischer Aminosäuretransporter	Keine	Ketchum, 1999.11, Celera Jamboree
CG7408	Arylsulfatase B	Keine	Li, 1999.11, Celera Jamboree
CG7402	Arylsulfatase B	Keine	Li, 1999.11, Celera Jamboree
CG5492	Tetraspannin	Keine	Todrs et al., 2000
CG5485	Sulfat/Hydrogen Symporter	Keine	Kodira, 1999.11, Celera Jamboree
Eip75B	nuklear receptor NR1D3	Bloomington stock 11712	Buszczak et al., 1998
Cyp312a1	Zytochrom p450	Keine	Dunkov, 1999.11, Celera Jamboree

Tab. 3-7: Zusammenstellung bisheriger Homologien der Genprodukte des Defizienzbereichs *61A1-100F5*

Das offene Leseraster CG5492 codiert für ein integrales Membranprotein, welches mit anderen Mitgliedern die sogenannte *Tetraspannin*-Superfamilie in Insekten bildet. Neben der geschlechtsspezifischen Expression in den Antennen von *Manduca sexta*, ist das humane Ortholog

CD151 an der zellulären Antwort auf Infektionen durch den humanen *T-Zell-Virus Typ 1* beteiligt (Hasegawa et al., 1996).

Der unter der Abkürzung *Eip75B* aufgeführte Rezeptor ist an der frühen Genantwort auf die Bindung des Häutungshormons *20-hydroxy-Ecdyson* und an der Kontrolle der Entwicklung und der Reproduktion von *Drosophila melanogaster* beteiligt (Buszczak et al., 1998). Eine Überprüfung durch Einkreuzung des erhältlichen Alleles in den *sws¹*-Hintergrund könnte eine mögliche Wechselwirkung mit *SWS* verifizieren.

Das als Interaktionspartner in Frage kommende *Zytochrom p450* ist von besonderem Interesse, da es als zentraler Mediator von radikalischen Reaktionen in vielfältigen Fehlfunktionen bereits beschrieben ist (Hathway, 2000). Dazu gehört die Kontrolle der freien Radikale, die an der Peroxidation von Lipiden maßgeblich beteiligt sind (Sevanian, 2000) und die Synthese von Steroiden (Tsutsi et al., 1999). Dieses mit der Mikrosomenmembran assoziierte Enzym stellt ein Zielprotein für viele Entgiftungsreaktionen von Drogen und Karzinogenen dar (Djordjevic et al., 1998). Darüber hinaus ist *Zytochrom p450* maßgeblich an dem Metabolismus von Organophosphaten beteiligt. Sie werden im Körper durch oxidative Dealkylierung mit Hilfe des *Zytochromes p450* zu wasserlöslichen Abbauprodukten weiterverarbeitet, was ihre Ausscheidungsfähigkeit signifikant verbessert. Im Kontrast zu dieser Entgiftungsreaktion ist *Zytochrom p450* aber auch an einem Reaktionsmechanismus zentral beteiligt, der als „Giftungsreaktion“ bezeichnet wird und ein mäßig oder nicht toxisches Addukt in ein toxisches Produkt umsetzt. So wird die Hemmpotenz von Parathion gegenüber der Acetylcholinesterase nach Überführung in Paraoxon (*0,0-Diethyl-0-4-nitrophenylphosphat*) durch *Zytochrom p450* um etwa drei Größenordnungen gesteigert (Maynard et al., 1996). *Zytochrom p450* ist also nicht nur allgemein in neurodegenerative Prozesse involviert, sondern kann mit dem funktionellen Umfeld der Serinesterase *SWS/NTE* in Verbindung gebracht werden. Eine Beteiligung des *Zytochrom p450* an den verschiedenen Reaktionen der Zellmembranen und des Mikrosomensystems könnte mit den beobachteten Störungen des Membranmetabolismus (*sws¹*, *sws¹*; *p{m-nte}¹³/II*; *loco/III* und *sws¹*; *p{sws⁵/loco*) oder des lysosomalen Stoffwechselsystems (*w*; *p{m-nte}¹³/III*; *loco/III* und *w*; *p{sws¹⁰/loco*) in Verbindung gebracht werden. Hierbei handelt es sich jedoch um Hinweise, die in jedem Falle einer tiefergreifenden Überprüfung bedürfen.

3.8 Untersuchung von potentiellen Entwicklungsdefekten an *sws¹* Embryonen

Verschiedene Nachforschungen deuten auf eine Mitwirkung des *SWS*-Proteins in bisher nicht näher definierbaren zytoskelettären Prozessen hin (Seifert und Casida, 1984). Anhand von embryonalen *in situ*-Hybridisierungen kann eine embryonale Expression des *sws*-Transkriptes im peripheren Nervensystem nachgewiesen werden (D. Kretzschmar, persönliche Mitteilung). Um eine mögliche Beeinflussung der *sws¹*-Mutation auf embryonale Entwicklungsschritte, die von einem

unbeeinträchtigt Zytoskelett abhängen, aufzudecken, sollten folgende Entwicklungsbereiche im Wildtyp und in *sws*¹-Fliegen anhand histologischer Präparationen miteinander verglichen werden:

- Die morphologische Entwicklung der Embryonen von *Drosophila melanogaster* durch Färbung der Zellkerne mit Diamidin-Phenylindol (DAPI)
- Die korrekte Ausbildung des embryonalen Nervensystems durch Anfärbung mit dem Antikörper 22C10
- Immunologische Untersuchung des embryonalen Tubulinskeletts mit einem α -Tubulin-Antikörper

Die morphologische Entwicklung der Embryonen von *Drosophila melanogaster* durch Färbung der Zellkerne mit 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)

Die von wildtypischen und *sws*¹-Fliegen über Nacht auf Bacto-Agarplatten gelegten Eier wurden gesammelt und mit 1:1000 verdünntem DAPI gefärbt. Es wurden insgesamt 496 *Canton*^S- und 261 *sws*¹-Fliegenembryonen gesammelt und ihrem Embryonalstadium nach Ashburner zugeordnet. Um die visuelle Zuordnung zu erleichtern wurden die 16 Embryonalstadien nach Ashburner in zehn augenscheinlich einfach zu unterscheidende Gruppen unterteilt.

Stadium	Phänotyp	<i>Canton</i> ^S		<i>sws</i> ¹	
		n	%	n	%
1	befruchtetes Ei	14	2,7	16	6,1
1a	wenige Zellkerne	8	1,6	14	5,4
2	synzytiales Blastoderm	9	1,7	7	2,7
2a-4	zelluläres Blastoderm	20	3,9	29	11
5	Ende der Polzellenformation	3	0,6	1	0,3
6-7	Gastrulation	81	16	52	20
8-11	Keimband verlängert sich	58	11,5	12	4,6
12-13	Keimband verkürzt sich wieder	134	26,6	43	16,6
14-16c	fortgeschrittene Segmentierung	110	21,7	25	9,5
16d-17	vollständig entwickelt	13	2,6	3	1,1
	unbefruchtete Eier	20	3,9	27	10,4
	beschädigter Embryo	36	7,2	32	12,3
Gesamtsumme		506	100,00	261	100,00

Tab. 3-8: Untersuchungen der embryonalen Entwicklungsstadien der *sws*¹-Mutante im Vergleich mit Wildtyp *Canton*^S

Individuen jedes Entwicklungsstadiums wurden mit DAPI gefärbt und hinsichtlich möglicher Unterschiede zwischen den wildtypischen *Canton*^S-Fliegen und *sws*¹-Fliegen untersucht. In allen untersuchten Stadien wiesen *sws*¹-Fliegen keine signifikant veränderte embryonale Morphologie auf. Anhand der Auszählung der verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien konnte kein Entwicklungsstadium eingengt werden, in welchem Embryonen auffällig lange verweilen oder besonders häufig sterben.

Untersuchung des embryonalen Nervensystems durch Anfärbung mit dem Antikörper 22C10

Da die Entwicklung des Nervensystems im Embryo erst verhältnismäßig spät einsetzt, wurden vorzugsweise ältere Embryonen (Stadien 14-17) untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen den mutanten *sws¹*-Fliegen und den wildtypischen *Canton^S*-Fliegen festgestellt werden.

Immunologische Untersuchung des embryonalen Tubulinskeletts mit einem α -Tubulin-Antikörper

Der primäre α -Tubulin Antikörper wurde 1:500 eingesetzt. Alle untersuchten Embryonen zeigten in den Proben und in den Negativ-Kontrollen ohne primären Antikörper die gleiche Färbeintensität und ließen daher keinen Aufschluss über eine etwaige Veränderung des Tubulinskeletts zu.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Fragestellungen zur Expression und der Funktionsweise des *SWS*-Proteins und seines Orthologen aus Vertebraten, der *neuropathy target esterase NTE*, in *Drosophila melanogaster* bearbeitet. Hierfür wurden wildtypische und modifizierte *sws/nte*-cDNAs in transgenen Tieren in verschiedenen Zelltypen des zentralen Nervensystems exprimiert. Die Analyse der Ultrastruktur nervösen Gewebes von transgenen Tieren wurde mit Aktivitätsmessungen des induzierten *SWS/NTE*-Proteins der einzelnen Stämme kombiniert und hinsichtlich möglicher Funktionsmodelle erörtert.

Durch p-Element-Transformation und anschließende Expression der wildtypischen *Drosophila-sws*-cDNA unter Kontrolle verschiedener *GAL4*-Treiber in *sws*-Mutanten konnte gezeigt werden, daß dieses Gen für den neurodegenerativen Phänotyp der *sws*-Fliegen verantwortlich ist. Die partielle Revertierung des *sws*-Phänotyps zeigt mit der getrennten Rettung des neuronalen oder glialen Phänotyps zwei, möglicherweise von einander getrennte Funktionskreise von *SWS* auf. Das *SWS*-Protein scheint in beiden Zellpopulationen eine vitale Rolle zu besitzen, die auf einer zellautonomen Expression beruht und die nicht durch einen Proteintransfer oder andere Zell-Zell-Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen ersetzt werden kann (Kapitel 3.2.1).

Die Überexpression des *sws*-Gens in den Gliazellen wildtypischer Fliegen bewirkt einen deutlichen pathologischen Phänotyp der Gliazellen, während die Überexpression in Neuronen keine sichtbare Veränderung hervorruft (Kapitel 3.2.2). Hierbei könnte jedoch auch die Stärke der *GAL4*-Expression des Treiber-Stamms entscheidenden Einfluß auf die Ausprägung des Phänotyps haben.

Das *NTE*-Protein der Maus und das *SWS*-Protein von *Drosophila* besitzen, neben ausgeprägten Homologien der Aminosäure- und der DNA-Sequenz, eine überzeugende funktionelle Äquivalenz. Die Rekonstitution des wildtypischen Gewebeszustandes der *sws*-Mutante unter Zuhilfenahme des Gens der Maus, zeigt Ergebnisse, die mit der Expression der *Drosophila*-cDNA vergleichbar sind (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). In den Rettungs- und in den Überexpressionsexperimenten (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4) zeigt die Expression des Gens der Maus, im Vergleich zu der Expression des *Drosophila*-Gens, abgeschwächte histologische Folgen. Diese Dämpfung ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Proteinlokalisierung aufgrund einer veränderten N-terminalen Sequenz in *Drosophila* zurückzuführen (Kapitel 3.3.5).

Die erste Transmembrandomäne der *Drosophila*-cDNA besitzt entscheidenden Einfluß auf die Funktionalität des Enzyms (Kapitel 3.4). Der *in vitro*-Aktivitätsverlust der cDNA nach Ablation der ersten Transmembrandomäne in *Drosophila melanogaster* konnte durch Messungen in anderen eukaryontischen Expressionssystemen bestätigt werden. Neben der vorhergesagten Lokalisation der zweiten Transmembrandomäne in *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* kommen aus funktionellen Erwägungen weitere Bereiche als mögliche Kandidaten für eine Transmembrandomäne in Betracht. Die Stellung der Transmembrandomänen und die Analyse der Sequenzhomologien legt als Funktion des SWS-Proteins einen cNMP gesteuerten Kanal der Mikrosomen nahe.

Die Serin-Aspartat-Substitution im aktiven Zentrum des SWS/NTE-Proteins beseitigt nicht nur die *in vitro*-Aktivität des UAS-Konstrukts (Kapitel 3.5), sie führt auch zu einer völligen Funktionslosigkeit im physiologischen Hintergrund. Die Theorie, wonach die pathologischen Folgen der Inhibition von NTE aus der Hinterlassung eines negativ geladenen Rests des neuropathischen Organophosphats resultieren (Glynn, 2000), konnte durch diese Experimente nicht bestätigt werden.

Nach ersten durchgeführten Messungen führt die *sws*¹-Mutation aufgrund eines bislang unbekanntem Mechanismus zu einer Veränderung von charakteristischen Membrankomponenten wie dem Gehalt an Triglyceriden oder an Sterolestern (Kapitel 3.6).

4.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse stellen erste Hinweise auf die Funktion des SWS-Proteins in *Drosophila melanogaster* dar. Es sind jedoch noch weitere Anstrengungen nötig, um die Funktion dieses Proteins in Neuronen und Gliazellen bestimmen zu können. Der Modellorganismus *Drosophila* besitzt durch die Möglichkeit der p-Element-Transformation und die bisher geleistete Vorarbeit ein enormes Potential hinsichtlich der funktionellen Charakterisierung des SWS-Proteins und seiner Orthologen. Die systematische Modifikation der verschiedenen funktionellen Domänen kann wertvolle Hinweise auf die *in vivo*-Aktivität des Enzyms geben. Die Ablation der Transmembrandomänen TM2-TM4 stellt einen notwendigen Schritt dar, um ein tieferes Verständnis der obligatorischen Verankerung des SWS-Proteins in der Membran zu erlangen. Die in dieser Arbeit aufgrund theoretischer Erwägungen aufgestellte Hypothese, *Drosophila*-SWS und *C. elegans* YOLA könnten eine zweite Transmembrandomäne mit einer zu TM2 von Maus und Mensch analogen Stellung innerhalb des Proteins besitzen, bedarf einer Überprüfung *in vivo*. Durch geeignete Substitution betreffender DNA-Sequenzabschnitte von *Drosophila* mit cDNA-Fragmenten der Maus kann die Funktion eines cDNA-Konstrukts mit einem weiter C-terminal gelegenen Transmembranabschnitt überprüft werden.

Der Frage, ob die Entstehung der verzögerten Neuropathie durch eine intramolekulare Umlagerung des abgespaltenen Arylrests verursacht wird, kann man sich durch eine gezielte Modifikation der Zielaminosäure (D¹⁰⁶³ in *Drosophila* oder D¹⁰⁴⁴ in Maus und Mensch) durch eine Aminosäure mit einem vergleichbaren Arylrest annähern. Ein entscheidender Schritt in der Verwendung all der wildtypischen und modifizierten cDNA-Konstrukte ist der Aufbau funktioneller Zellkultur-Expressionssysteme. Hierbei könnten auch neuronale und gliale Zellkulturlinien aus dem Menschen oder anderen Vertebraten hilfreich sein. Die biochemische Untersuchung solcher Zellkultursysteme, in denen das SWS-Protein überexprimiert wird, vermag substantielle Hinweise auf ein mögliches Substrat oder eine Funktion zu geben. Nach wie vor bleibt jedoch die Produktion eines spezifischen Antikörpers eine zentrale Notwendigkeit um einen zellbiologisch und biochemisch exakten Zugriff auf das SWS-Protein zu ermöglichen.

Die Suche nach möglichen Interaktionspartnern durch Defizienzkreuzungen mit *sws*-Mutanten sollte auf das zweite Chromosom ausgedehnt und die mögliche Interaktion potentieller Kandidaten mit dem *sws*-Hintergrund spezifisch überprüft werden.

5 Anhang

5.1 Sequenz des wildtypischen *Drosophila melanogaster* sws-Gens

```

1      GAAAAACAAC AATTGCTTTG GTTCTGATGA TTCTCGTAAC AGCAAAAACA ACAAGATTTA
61     TAATCTAAAT CAAAAGAAAC TGTGCTCTCC GCTGTGCGTG GCTGTGAGTG CGTTTGTGCG
121    GTACGGTGCG TGCATTATAA CAATTATTGC ACAAAGGCA TGACAAACGT GGGGCGGGG
181    TGTCTGTAAA TGTGAGTGCG ATAGAGCGCG ACATATTCAA ACAAGCTAGG GACGGAGTAG
241    GTGAGCGAGG GAGAGAGAGA ACGCGACGGT GGCAACAACA AAGGGCTGTG ATTTTACTTT
301    GCCCCCTCCA CCCTGTACCC CGTCCCATCC ATACACTTGC GTATTTACCA AATAAACGGA
361    ACATACATAA GCCAAAATAG GCAGAACAAC AACCAACATTA AGAGTCAACT AAACAGCAAA
421    TCGAATAGTT TCGTGGGAGA AAGGACAGCG TAGAGAGTCA TTGGAAAAC TGGCCGCGTAA
481    GGGAGCGCAA TGGATGTCCT GGAAATGCTG CGCGCGAGCG CGAGCGGCAG CTACAACACA
541    ACATTCTCGG ACGCGTGGTG CCAATATGTC TCCAAGCAGA TCACAGCAAC GGTGTACATG
601    TATTTGCGCC TGGTAATGAT GAGCCTGCTC TTCATAGCCT GGTTCCTATA CTTCAAACGA
661    ATGGCACGTT TGCCTTTGCG CGACGAGATT GCCCGTTCCA TTAGCACCGT AACCAATTCA
721    TCCGGCGATA TGCCTGGCCT GCGTTTCCGG AAGCGTGACA AGATGCTATT CTACGGCCGT
781    CGAATGCTGC GCAAAATGAA GAACGTGAGC GGTCAAATGT ACAGCAGCGG TAAGGGCTAC
841    AAGCGTCGTG CTGTCATGCG TTTTCGCGAGA AGGATACTCC AGCTGAGGCG GGATAATATG
901    CCGCTAGAGA TGCGCACCGT GGAGCCGCCA GCCGAGTATC TGGAGGAGAC AATCGAGGGC
961    AGCGATAGAG TTCCGCCCGA TGCACTCTAT ATGCTCCAGA GCATTCGCAT TTTTGGACAT
1021   TTCGAGAAGC CGGTCTTTTT GCGGCTCTGC AAGCACACCC AATGCTGGA ACTGATGGCC
1081   GGCGACTATT TGTTTAAGAT AACCGATCCG GACGATAGCG TCTATATCGT TCAATCGGGC
1141   ATGATCAATG TGTACATCTC CAATGCCGAT GGCAGCACAC TATCATTGAA GACGCTCAGG
1201   AAGGGCAGAT CCGTGACATC CGTGCTCAGC TTTATTGATG TCCTGTCGGG GAATCCCAGC
1261   TACTATAAGA CCGTCACCGC CAAAGCCATT GAGAAATCGG TGGTCATTCC TCTGCCCATG
1321   CAGGCATTCC AAGAGGTGTT CCAGGACAAT CCGGACGTAA TGATTGCGGT CATCCAGGTG
1381   ATTATGATCC GGCTACAACG CGTACTGTTC ACCGCTTTGC GCAACTACCT CGGTCTAAAT
1441   GCCGAAGTGG TGCAGAATCA CATGCGCTAC AAGAGCGTAT CCACAATGAG TGGACCGATT
1501   AACTCGCAGA CCTCGCAATC CTCACGCCAG GCGCCCAATG GGCCGCCCAT GGTGATCAGC
1561   CAGATGAATC TGATGCAGTC CGCTGTTTTC GGAACGGGAT CATCGGGTGT CTCGGTGACC
1621   GTAACCTGAC CACCATCCTC GCCATCGCGA CACTCGCGCG AGGAGCACAC GCTATCCGAT
1681   CCGAATCCAA ATCCGGATGG TAGTTTTTAC GGCCTACCA ATCTGTTTAC CGAGGTGCAT
1741   GGCGATGCGC CCAATGCAGA TCTATTCCAT CAGCAGCAGC AGCAGCATTG GGTGGGCAAC
1801   CTATCCACGC GTCGCAAGTT CATAACTCTG ATGGCACCCG ATCCTTCGCA CTCGTGTCTA
1861   CAGACACCCG GTGTGACAAC CTCGATAGAC ATGCGCCTGG TCCAATCCTC AGCGGTGGAC
1921   AGCCTACGCA AGGAATTGGG TCTGTCCGAG GAGGATTCCC ACATTATTGA GCCTTTTGTG
1981   GAGCTAAGGG AACTGGAGCC GAATGTCACC CTGATTACGG AGGGCAATGC GGACGATGTT
2041   TCGCTTTGGT TTGTGATGAC AGGCACATTG GCTGTTTACC AGAGCAATCA GGATGCCACG
2101   CGGGCCAAGC AGGATAAGAG CGACATGCTC ATTTACTTTG TGCATCCCGG CGAAATCGTT
2161   GGTGGACTGG CCATGCTAAC GGGAGAGGCT AGTGCGTATA CCATTCGATC GAGAAGCATC
2221   ACCAGAATAG CCTTCATCCG ACGAGCAGCT ATTTACCAGA TCATGCGACA ACGACCACGC
2281   ATTGTTTTGG ATCTGGGCAA CGGAGTAGTA CGCCGTCTAT CGCCTCTGGT GAGGCAGTGT
2341   GACTATGCCT TGGACTGGAT CTTTCTGGAA TCGGGCAGAG CTGTCTATCG GCAGGACGAG
2401   AGCAGCGACA GCACATATAT TGTGCTTAGC GGGCGAATGC GTTCGGTTAT CACGCATCCT
2461   GGTGGCAAAA AGGAGATCGT CGGCGAATAC GGCAAGGGGG ATCTTGTGGG CATCGTTGAA
2521   ATGATCACGG AAACGTCGCG CACCACGACG GTGATGGCTG TGCGCGACTC GGAGCTGGCC
2581   AAGCTGCCCC AGGGCCTGTT CAATGCCATC AAGCTGCGCT ACCCCATCGT GGTGACCAAG
2641   CTGATTAGCT TCCTTAGCCA CCGCTTCTCT GGCTCGATGC AGACGCGCTC GGGCAGCGGG
2701   GCGCCGGGCG CGCCGTCGA GGCCAATCCC GTCACGCACA AGTACTCCAC GGTGGCCCTG
2761   GTGCCCATCA CCGACGAGGT GCCGATGACG CCCTTACCT ACGAGCTCTA CCACTCGCTC
2821   TGTGCCATAG GACCCGTTCT CCATTTGACC TCCGATGTGG TGCGCAAGCA GCTGGGCTCC
2881   AACATCTTTG AGGCAGCCAA CGAGTATCGT CTAACCTCGT GGCTGGCGCA GCAGGAGGAC
2941   CGAAACATCA TCACCCTCTA TCAGTGTGAC AGTTCGCTGA GCGCGTGGAC ACAGCGCTGC

```

3001 ATGCGACAGG CTGACGTTAT CCTGATCGTG GGCCTCGGCG ATCGATCACA CCTGGTCGGA
3061 AAGTTCGAAC GCGAGATCGA CCGGCTGGCG ATGCGAACGC AAAAGGAGCT CGTCCTGCTA
3121 TATCCGGAGG CCAGCAATGC CAAGCCGGCC AACACGCTTA GTTGGCTAAA TGCCCCGACCC
3181 TGGGTAACAA AGCACCACCA TGTGCTCTGC GTCAAGCGGA TCTTCACGCG CAAAAGTCAA
3241 TATCGCATTA ATGATCTCTA TAGTCGCGTC CTGCTGTCCG AGCCAAACAT GCATTCCGAC
3301 TTCTCGCGTT TGGCGCGCTG GCTTACGGGC AACTCGATTG GCCTGGTGTG GGGCGGCGGA
3361 GGAGCGCGTG GAGCTGCCCA CATTGGTATG CTGAAGGCCA TCCAGGAGGC GGGCATAACCT
3421 GTTGACATGG TGGCGGCGGT CAGCATCGGT GCCTTGATGG GAGCTCTCTG GTGCTCGGAG
3481 CGTAATATCA CCACGGTAAC GCAGAAGCGT CGCGAGTGGT CAAAGAAAAT GACGAAATGG
3541 TTCCTACAAC TACTTGACCT CACCTACCCG ATCACATCGA TGTTCTCCGG ACGAGAGTTC
3601 AACAAAGACGA TCCACGACAC TTTTCGGGGAC GTGAGCATCG AGGACCTGTG GATACCCTAC
3661 TTCACCCTCA CCACCGACAT AACCGCCAGT TGCCATCGCA TTCACACCAA TGGATCTCTG
3721 TGGCGTTACG TACGCTCCTC CATGTGCGTC AGTGGCTACA TGCCGCCGTT ATGCGATCCT
3781 AAAGATGGGC ACCTCTTGCT GGATGGCGGC TATGTGAATA ATCTGCCAGC CGATGTGATG
3841 CATAATCTTG GAGCTGCTCA CATAATCGCC ATCGATGTGG GATCCCAGGA TGACACTGAC
3901 CTGACCAACT ATGGCGACGA CCTAAGCGGT TGGTGGCTGC TCTACAAGAA ATGGAATCCC
3961 TTCACATCGC CTGTGAAGGT GCCCGACTTG CCGGACATCC AATCCCAGCT AGCCTATGTG
4021 TCCTGCGTAC GCCAACTAGA GGAGGTCAAA AACTCCGACT ACTGCGAGTA TATCCGACCG
4081 CCGATCGATA AGTACAAGAC TCTAGCCTTC GGCAGCTTCG ACGAAATTCG AGACGTGGGC
4141 TATGTGTTTTG GCAAAAACCTA CTTTGAGAGC ATGGCCAAGG CTGGTTCGATT GGGCCGCTTC
4201 AATCAGTGGT TCAACAAAGA GCCACCCAAG CGGGTTAACC ATGCCTCCCT CAACGAGTAC
4261 ACGTTCATCG ATCTGGCGCA GATCGTGTGC CGTCTGCCGG AGACATACGC CGTGAATACC
4321 GCGGAACCTCT TTAGCGAGGA CGAAGACTGT GATGGCTACA TTTTCGGAGCC GACCACACTG
4381 AATACGGATC GCGTTCGCAT CCAGGTGTGC CGCGCTGGCA ACTCGTTATC CTTTTCCGAA
4441 ACGGAAATGG ACTCGGACGT GGAGCTTGAC CTGAAGCTGG AGCGCAAGAC GGACAAGTCC
4501 ACACAGTCGT CGCCGCCGAG TAACAGCAGG TCGGACATGC GCGCAAGGA AGAGGCTAGA
4561 CATATGTCTA ATTGGCATTG GGGTGTGAAG CACAAGGATG AGACTGGCAG CGGAGCCAAT
4621 GAAGCCACAA AAACACAAAC CGGTCAAGGAG CAGGAACTCC AGCAGGAGCA GCAGGATCAG
4681 GGAGCTACGG CTGAGCAGCT GGTGGATAAA GACAAGGAGG AGAACAAAGA GAACAGAAGT
4741 AGCCCGAATA ACGAAACCAA AAAGTAGCTA TATATGGACA AACAAAACAA TTACAAATAC
4801 AATGCAAATT CGAAGCGTGG CTATATACTC AACAAGAAGC ATTAACAAGC CGAGGACGAG
4861 GTGCCTTTTCG CTTGCCAGAC GCCCAACGGC ACAAGGTAAC CGCCCGCCCC CCCCCTTCA
4921 CCAAGAAAGC AACCGCAACT ACTCAATCAT CAAATCTCCA ACGAAACGAA GTAAAATATA
4981 GCAATGACAA GGAAAATTGT TAACCTATAG GTTTTATAGC AACCAAGACT TAGGCTTAGC
5041 TTAGCGTATG AAACGATTAA CCCACAATCC TGCATCCCAT CCCTCTCATT CACCTAACCA
5101 ATCCACACAC ATTGTAATGG AAGGCGCAAG AAGTCCACAA ACTTTCTATA TACATATAGT
5161 TATATATTTT TACTGAAGCA ACCGATATTG TACTACCGAA ATTGAGACTC CTTGCAATG
5221 AATCCCCCTC AACACAAAAT TTAGCCCCAA AATTGCCGCA CACTCGTGTA GTCTCTCTAT
5281 TATTTTAGGC AACAAATCTT TTGTTTAAATG GTCGGATTTT TTTTGAAATG CAAACAAATA
5341 AATTTAAAAA GGGAGTACAA ACAG

5.2 Sequenz des wildtypischen *Drososophila melanogaster* SWS-Proteins

TM1: V³⁵-F⁵⁵
 MDVLEMLRASASGSYNTTFSDAWCQYVSKQITATVYMYFALVMMSLLFIAWFLYFKRMARLRLRDEIARSI¹STVTN²SSGDMRGLRFRKRDK
 MLFYGRMLRKMKNVSGQMYSSGKGYKRAV³MRFARRILQLRRDNMPLEMR⁴TVEPPAEYLEETIEGSDR⁵VPPDALYMLQSIRIFGHFEKPV
 FLRLCKHTQLELMAGDYLFKITDPDDSVYIVQSGMINVYISNADGSTLSLKTVRKGESVTSLSFIDVLSGNPSYKTVTAKAIEKSVVI
 cNMP I: H¹⁸⁹-D²⁸⁹
RLPMQAFEEVFQDNPDV⁶MIRVIQVIMIRLQRVLTALRNYLGLNAELVQNHMYKSVSTMSGPINSQTSQSSRQAPNGPMPVISQMNLMQS
RLPMQAFEEVFQDNPD
^{sws}¹
 AVSGTGSSGVVTVTRPPSSPSRHSREEHTLSDPNPNPDG⁷SFHGTNLFTVHGDAPNADLFHQQQQHSVGNLSTRSSITLMAPDPSHS
 CLQTPGVTTSIDMRLVQSSAVDSLRLKELGLSEEDSHIIEFFVELRELEPNVTLITEGNADDVCVWFVMTGTLAVYQSNQDATRAKQDKSDM
 cNMP II: F⁴⁹⁶-R⁵⁹⁷
 TM2: F⁵⁵⁰-I⁵⁷²
LIHFVHPGEIVGGLAMLTEASAYTIRSRISITRIAFIRRAAIYQIMRQRPRIVLDLGN⁸GVVRRLSPLVRQCDYALDWIFLESGRAVYRQDE
 cNMP III: A⁶²⁰-I⁷¹³
SSDSTYIVLSGRMRSVITHPGGKKEIVGEYKGDVIGIVEMITETSRTTTVM⁹AVRDELAKLPEGLFNAIKLRYPIVVTKLISFLSHRFLG
 SMQTRSGSGAPGAPVEANPVTHKYSTVALVPI¹⁰TDEVPMPFTTYELYHSLCAIGPVLH¹¹LTSDVVRKQLG¹²SNIFEAA¹³NEYRLTSWLAQQEDRN
 IITLYQCDSLSAWTQRCMRQADVILIVGLGDRSHLVGKFEREIDRLAMRTQKELVLLYPEASNAK¹⁴PANTLSWLNARPVWTKHHHVL¹⁵CVKR
 IFTRKSQYRINDLYSRVLLSEPNMHSDFSR¹⁶LARWLTGNSIGLVLG¹⁷GGGARGAAHIGMLKAIQEAGIPVDMVGV¹⁸VSIGALMGALWC¹⁹SERNIT
 TM3: W⁹⁴⁴-I⁹⁶⁵ TM4: A⁹⁷⁴-C⁹⁹⁵
 UPF0028: L⁹²⁹-R¹²⁴⁸
TVTQKAREWSKMTKWFLQLLDLTYPI²⁰TSMFSGREFNKTIHDTFGDVSIEDLWIPYFTLTDTITASCHRIHTNGSLWR²¹YVRSSMSLSGYMP
PLCDPKDGHLLLDGGYVNNLPADV²²MHNLGAAHIIAIDVGSQDDTDLTNYGDDL²³SGWLLYKKNPFTSPVKVPDLPDIQSRLAYVSCVRQL
EEVKNSDYCEYIRPPIDKYKTLAFGSFDEIRDVG²⁴YVFGKNYFESMAKAGRLGRFNQWFNKEPPKRVN²⁵HASLNEYTFIDLAQIVCRLPETYA
 VNTAELFSEDEDCDGYISEPTTLNTDRRRIQVSRAGNSLSFSETEMDSV²⁶ELDLKLERKTDKSTQSSPPS²⁷NSRSDMRGKEEARHMSNWHWG
 VKHKDETGSGANEATKTQTGQEQLQQEQDQGATAEQLVDKDKENKENR²⁸SSPNETKN 1425 aa

6 Literaturverzeichnis

- * **Abdelsalam EB.** Neurotoxic potential of six organophosphorus compounds in adult hens. *Vet Hum Toxicol.* 1999 Oct; 41(5):290-2.
- * **Abou-Donia MB, Lapadula DM.** Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: type I and type II. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990; 30:405-40.
- * **Achim CL, Wiley CA.** Inflammation in AIDS and the role of the macrophage in brain pathology. *Curr Opin Neurol.* 1996 Jun; 9(3):221-5.
- * **Aldridge WN.** Nature of the reaction of organophosphorus compounds and carbamates with esterases. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1973 Jan; 354(1):4-5.
- * **Aleu FP, Katzman R, Terry RD.** Fine structure and electrolyte analyses of cerebral edema induced by alkyl tin intoxication. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1963 Jul; 22(3):403-13.
- * **Ashburner M.** *Drosophila. A Laboratory Manual.* Cold Spring Laboratory Press. 1989
- * **Atkins J, Glynn P.** Membrane association of and critical residues in the catalytic domain of human neuropathy target esterase. *Biol Chem.* 2000 Aug 11; 275(32):24477-83.
- * **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K.** *Current Protocols in Molecular Biology.* 1994
- * **Bancher C, Jellinger K, Wichart I.** Biological markers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 1998; 53:185-97.
- * **Barden H.** The histochemical relationship of neuromelanin and lipofuscin. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1969 Jul; 28(3):419-41.
- * **Barril JB, Vilanova E, Pellin MC.** Sciatic nerve neuropathy target esterase. Methods of assay, proximo-distal distribution and regeneration. *Toxicology.* 1988 Apr; 49(1):107-14.
- * **Barry MA, Barry ME, Johnston SA.** Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *Biotechniques.* 1994 Apr; 16(4):616-8, 620.
- * **Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V, Hofmann F.** Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26; 91(9):3505-9.
- * **Blendis L, Phillips MJ.** Amiodarone-associated phospholipidosis and fibrosis of the liver. Light, immunohistochemical, and electron microscopic studies. *Gastroenterology.* 1984 May; 86(5 Pt 1):926-36.
- * **Bligh EG, Dyer WJ.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37: 911-917
- * **Booth GE, Kinrade EF, Hidalgo A.** Glia maintain follower neuron survival during *Drosophila* CNS development. *Development.* 2000 Jan; 127(2):237-44.
- * **Bouldin TW, Cavanagh JB.** Organophosphorous neuropathy. I. A teased-fiber study of the spatio-temporal spread of axonal degeneration. *Am J Pathol.* 1979 Feb; 94(2):241-52.
- * **Bouldin TW, Cavanagh JB.** Organophosphorous neuropathy. II. A fine-structural study of the early stages of axonal degeneration. *Am J Pathol.* 1979 Feb; 94(2):253-70.
- * **Brand AH, Perrimon N** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993 Jun; 118(2):401-15.
- * **Bunch TA, Grinblat Y, Goldstein LS.** Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11; 16(3):1043-61.
- * **Butany J, Hanna W, Downar E, Shaikh N, Rebuck T, Brody A.** Ultrastructural findings in patients on long-term amiodarone treatment. *Lab Invest.* 1983 (48):12A.

-
- * **Carrington CD, Abou-Donia MB.** Characterization of [3H]di-isopropyl phosphorofluoridate-binding proteins in hen brain. Rates of phosphorylation and sensitivity to neurotoxic and non-neurotoxic organophosphorus compounds. *Biochem J.* 1985 Jun 15; 228(3):537-44.
 - * **Carrington CD, Abou-Donia MB.** Paraoxon reversibly inhibits neurotoxic esterase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985 Jun 15; 79(1):175-8.
 - * **Carrington CD, Fluke DJ, Abou-Donia MB.** Target size of neurotoxic esterase and acetylcholinesterase as determined by radiation inactivation. *Biochem J.* 1985 Nov 1; 231(3):789-92.
 - * **Clothier B, Johnson MK.** Rapid aging of neurotoxic esterase after inhibition by di-isopropyl phosphorofluoridate. *Biochem J.* 1979 Feb 1; 177(2):549-58. No abstract available.
 - * **Clothier B, Johnson MK.** Reactivation and aging of neurotoxic esterase inhibited by a variety of organophosphorus esters. *Biochem J.* 1980 Mar 1; 185(3):739-47.
 - * **Davis AD, Weatherby TM, Hartline DK, Lenz PH.** Myelin-like sheaths in copepod axons. *Nature.* 1999 Apr 15; 398(6728):571.
 - * **Davis CS, Barth ML, Dudek BR, Richardson RJ.** Inhibitor characteristics of native, solubilized, and lipid-reconstituted neurotoxic esterase. *Dev Toxicol Environ Sci.* 1980; 8:63-6.
 - * **Davis CS, Richardson RJ.** Neurotoxic esterase: characterization of the solubilized enzyme and the conditions for its solubilization from chicken brain microsomal membranes with ionic, zwitterionic, or nonionic detergents. *Biochem Pharmacol.* 1987 May 1; 36(9):1393-9.
 - * **Djordjevic D, Nikolic J, Stefanovic V.** Ethanol interactions with other cytochrome P450 substrates including drugs, xenobiotics, and carcinogens. *Pathol Biol (Paris).* 1998 Dec; 46(10):760-70.
 - * **Dodson G, Wlodawer A.** Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci.* 1998 Sep; 23(9):347-52.
 - * **Dryer SE, Henderson D.** A cyclic GMP-activated channel in dissociated cells of the chick pineal gland. *Nature.* 1991 Oct 24; 353(6346):756-8.
 - * **D'Urso D, Prior R, Greiner-Petter R, Gabreels-Festen AA, Muller HW.** Overloaded endoplasmic reticulum-Golgi compartments, a possible pathomechanism of peripheral neuropathies caused by mutations of the peripheral myelin protein PMP22. *J Neurosci.* 1998 Jan 15; 18(2):731-40.
 - * **D'Urso D, Schmalenbach C, Zoidl G, Prior R, Muller HW.** Studies on the effects of altered PMP22 expression during myelination in vitro. *J Neurosci Res.* 1997 Apr 1; 48(1):31-42.
 - * **Ecobichon DJ, Joy RM.** Pesticides and neurological Diseases. Second Edition. CRC Press Boston & London 1994.
 - * **Edmunson RS.** Directory of organophosphorus compounds. Chapman & Hall. London 1988
 - * **el-Fawal HA, Jortner BS, Ehrich M.** Modification of phenyl saligenin phosphate-induced delayed effects by calcium channel blockers: in vivo and in vitro electrophysiological assessment. *Neurotoxicology.* 1990 Winter; 11(4):573-92
 - * **Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T.** Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids.* 2000 Jun; 106(1):1-29.
 - * **Farooqui AA, Yang HC, Horrocks L.** Involvement of phospholipase A2 in neurodegeneration. *Neurochem Int.* 1997; 30(6), 517-522
 - * **Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA.** Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J Neurochem.* 1997 Sep; 69(3):889-901.
 - * **Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497-509
 - * **Forstl H.** Alzheimer's disease: the size of the problem, clinical manifestation and heterogeneity. *J Neural Transm Suppl.* 1998; 54:1-8.
 - * **Fu SY, Gordon T.** The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997 Feb-Apr; 14(1-2):67-116.

- * **Fugleholm K, Schmalbruch H, Krarup C.** Early peripheral nerve regeneration after crushing, sectioning, and freeze studied by implanted electrodes in the cat. *J Neurosci.* 1994 May; 14(5 Pt 1):2659-73.
- * **Fugleholm K, Sorensen J, Schmalbruch H, Krarup C.** Axonal elongation through acellular nerve segments of the cat tibial nerve: importance of the near-nerve environment. *Brain Res.* 1998 May 11; 792(2):309-18.
- * **George EB, Glass JD, Griffin JW.** Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci.* 1995 Oct; 15(10):6445-52.
- * **Ghadially FN, Jachson P, Junor J.** A nomogram for electron microscopists. *J Submicrosc Cytol* 1981 (13) 95
- * **Ghadially FN.** Ultrastructural pathology of the Cell. 1975 London: Butterworths.
- * **Ginsberg SD, Martin LJ.** Ultrastructural analysis of the progression of neurodegeneration in the septum following fimbria-fornix transection. *Neuroscience.* 1998 Oct; 86(4):1259-72.
- * **Glynn P, Holton JL, Nolan CC, Read DJ, Brown L, Hubbard A, Cavanagh JB.** Neuropathy target esterase: immunolocalization to neuronal cell bodies and axons. *Neuroscience.* 1998 Mar; 83(1):295-302.
- * **Glynn P, Read DJ, Guo R, Wylie S, Johnson MK.** Synthesis and characterization of a biotinylated organophosphorus ester for detection and affinity purification of a brain serine esterase: neuropathy target esterase. *Biochem J.* 1994 Jul 15; 301 (Pt 2):551-6.
- * **Glynn P, Read DJ, Lush MJ, Li Y, Atkins J.** Molecular cloning of neuropathy target esterase (NTE).*Chem Biol Interact.* 1999 May 14; 119-120:513-7.
- * **Glynn P, Ruffer-Turner M, Read D, Wylie S, Johnson MK.** Molecular characterisation of neuropathy target esterase: proteolysis of the [3H]DFP-labelled polypeptide. *Chem Biol Interact.* 1993 Jun; 87(1-3):361-7.
- * **Glynn P.** Neural development and neurodegeneration: two faces of neuropathy target esterase. *Prog Neurobiol.* 2000 May; 61(1):61-74.
- * **Glynn P.** Neuropathy target esterase (NTE): molecular characterisation and cellular localisation. *Arch Toxicol Suppl.* 1997; 19:325-9.
- * **Glynn P.** Neuropathy target esterase. *Biochem J.* 1999 Dec 15; 344 Pt 3:625-31.
- * **Granderath S, Stollewerk A, Greig S, Goodman CS, O'Kane CJ, Klambt C.** *loco* encodes an RGS protein required for Drosophila glial differentiation. *Development.* 1999 Apr;126(8):1781-91.
- * **Griffin JW, George R, Lobato C, Tyor WR, Yan LC, Glass JD.** Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J Neuroimmunol.* 1992 Oct; 40(2-3):153-65.
- * **Harp P, Tanaka D, Pope CN.** Potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity following phenyl saligenin phosphate exposures in 2-, 5-, and 8-week-oldchickens. *Fundam Appl Toxicol.* 1997 May; 37(1):64-70.
- * **Hasan G.** Molecular cloning of an olfactory gene from Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Nov; 87(22):9037-41.
- * **Hasegawa,H., Utsunomiya,Y., Kishimoto,K., Yanagisawa,K. Fujita,S.** SFA-1, a novel cellular gene induced by human T-cell leukemia virus type 1, is a member of the transmembrane 4 superfamily. *J. Virol.* 70 (5), 3258-3263 (1996)
- * **Hirano A, Zimmerman HM.** Some new pathological findings in the central myelinated axon. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1971 Jul; 30(3):325-36.
- * **Hodge CF.** Changes in ganglion cells from birth to senile death. Observations on man and honey-bee. *J Physiol Lond.* 1894, 17:129.
- * **Hoffman PN, Cleveland DW.** neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific eta-tubulin isotype. *roc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun; 85(12):4530-3.

- * **Hofmann K, Stoffel W.** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1993 347,166
- * **Hotta Y, Benzer S.** Mapping of behaviour in Drosophila mosaics. Nature. 1972 Dec 29; 240(5383):527-35.
- * **Ito K, Sass H, Urban J, Hofbauer A, Schneuwly S.** GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the Drosophila central nervous system. Cell Tissue Res. 1997 Oct; 290(1):1-10.
- * **Jamal GA.** Long term neurotoxic effects of chemical warfare organophosphate compounds (Sarin) Adverse Drug React Toxicol Rev. 1995 Summer; 14(2):83-4.
- * **Jamal GA.** Long term neurotoxic effects of organophosphate compounds. Adverse Drug React Toxicol Rev. 1995 Summer; 14(2):85-99.
- * **Jamal GA.** Neurological syndromes of organophosphorus compounds. Adverse Drug React Toxicol Rev. 1997 Aug; 16(3):133-70.
- * **Johnson MK, Glynn P.** Neuropathy target esterase (NTE) and organophosphorus-induced delayed polyneuropathy (OPIDP): recent advances. Toxicol Lett. 1995 Dec; 82-83:459-63.
- * **Johnson MK, Richardson RJ.** Biochemical endpoints: neurotoxic esterase assay. Neurotoxicology. 1983 Summer; 4(2):311-20.
- * **Johnson MK.** Delayed neurotoxic action of some organophosphorus compounds. Br Med Bull. 1969 Sep; 25(3):231-5.
- * **Johnson MK.** Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. Arch Toxicol. 1977 Jun 18; 37(2):113-5.
- * **Johnson MK.** Initiation of organophosphate-induced delayed neuropathy. Neurobehav Toxicol Teratol. 1982 Nov-Dec; 4(6):759-65.
- * **Johnson MK.** Organophosphates and delayed neuropathy--is NTE alive and well? Toxicol Appl Pharmacol. 1990 Mar 1; 102(3):385-99.
- * **Johnson MK.** The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. Biochem J. 1969 Oct; 114(4):711-7.
- * **Johnson MK.** The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. J Neurochem. 1974 Oct; 23(4):785-9.
- * **Jortner BS, Shell L, el-Fawal H, Ehrich M.** Myelinated nerve fiber regeneration following organophosphorus ester-induced delayed neuropathy. Neurotoxicology. 1989 Winter; 10(4):717-26.
- * **Karalliedde L, Henry JA.** Effects of organophosphates on skeletal muscle. Hum Exp Toxicol. 1993 Jul; 12(4):289-96.
- * **Krejci E, Duval N, Chatonnet A, Vincens P, Massoulie J.** Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 1; 88(15):6647-51.
- * **Kretzschmar D, Hasan G, Sharma S, Heisenberg M, Benzer S.** The *swiss cheese* mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*. J Neurosci. 1997 Oct 1; 17(19):7425-32.
- * **Lassmann H, Ammerer HP, Jurecka W, Kulnig W.** Ultrastructural sequence of myelin degradation. II. Wallerian degeneration in the rat femoral nerve. Acta Neuropathol (Berl). 1978 Nov 15; 44(2):103-9.
- * **Lassmann H, Ammerer HP, Kulnig W.** Ultrastructural sequence of myelin degradation. I. Wallerian degeneration in the rat optic nerve. Acta Neuropathol (Berl). 1978 Nov 15; 44(2):91-102.
- * **Lenz PH, Hartline DK, Davis AD.** The need for speed. I. Fast reactions and myelinated axons in copepods. J Comp Physiol [A]. 2000 Apr; 186(4):337-45.
- * **Levitan IB.** Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. Annu Rev Physiol. 1994; 56:193-212.
- * **Lindner P, Bauer K, Krebber A, Nieba L, Kremmer E, Krebber C, Honegger A, Klinger B, Mocikat R, Pluckthun A.** Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. Biotechniques. 1997 Jan; 22(1):140-9

- * **Liu HM, Yang LH, Yang YJ.** Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995 Jul; 54(4):487-96.
- * **Lotti M, Moretto A.** Promotion of organophosphate induced delayed polyneuropathy by certain esterase inhibitors. *Chem Biol Interact.* 1999 May 14; 119-120:519-24.
- * **Lotti M.** Pathogenesis of Organophosphate Polyneuropathy. In *Toxicology.* 1992; 21(6): 465-487
- * **Lotti M.** The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit Rev Toxicol.* 1991; 21(6):465-87.
- * **Lush MJ, Li Y, Read DJ, Willis AC, Glynn P.** Neuropathy target esterase and a homologous Drosophila neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man. *Biochem J.* 1998 May 15; 332 (Pt 1):1-4.
- * **Marrs TC, Maynard RL, Sidell FR.** Chemical Warfare Agents. Toxicology and Treatment. John Wiley and Sons, Chichester. 1996
- * **McConnell R, Delgado-Tellez E, Cuadra R, Torres E, Keifer M, Almendarez J, Miranda J, El-Fawal HA, Wolff M, Simpson D, Lundberg I.** Organophosphate neuropathy due to methamidophos: biochemical and neurophysiological markers. *Arch Toxicol.* 1999 Aug; 73(6):296-300.
- * **Mehta PN, Ghadially FN.** Articular cartilage in corn oil-induced lipoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1973 Jan; 32(1):75-82.
- * **Meredith C, Johnson MK.** Neuropathy target esterase: rates of turnover in vivo following covalent inhibition with phenyl di-n-pentylphosphinate. *J Neurochem.* 1988 Oct; 51(4):1097-101.
- * **Moretto A, Lotti M.** Organ distribution of neuropathy target esterase in man. *Biochem Pharmacol.* 1988 Aug 1; 37(15):3041-3.
- * **Moretto A.** Promoters and promotion of axonopathies. *Toxicol Lett.* 2000 Mar 15;112-113:17-21. Review.
- * **Moser M, Stempfl T, Li Y, Glynn P, Buttner R, Kretzschmar D.** Cloning and expression of the murine sws/NTE gene. *Mech Dev.* 2000 Feb; 90(2):279-82.
- * **Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinck HM, Griffiths IR, Nave KA.** The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Sep 14; 883:254-61.
- * **Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP.** Target proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP- glucuronosyltransferases. *Can J Gastroenterol.* 2000 May; 14(5):429-39.
- * **Oda H, Sasaki Y, Nakatani Y, Maesaka H, Suwa S.** Hunter's syndrome. An ultrastructural study of an autopsy case. *Acta Pathol Jpn.* 1988 Sep; 38(9):1175-90.
- * **Perry VH, Brown MC, Gordon S.** The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med.* 1987 Apr 1; 165(4):1218-23.
- * **Peters JH, Baumgarten H.** Monoklonale Antikörper, 2.Auflage. Springer Verlag. 1989
- * **Phelps CB, Brand AH.** Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system. *Methods.* 1998 Apr; 14(4):367-79.
- * **Pope CN, Padilla S.** Modulation of neurotoxic esterase activity in vitro by phospholipids. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989 Feb; 97(2):272-8.
- * **Pope CN, Padilla SS.** Chromatographic characterization of neurotoxic esterase. *Biochem Pharmacol.* 1989 Jan 1; 38(1):181-8.
- * **Poucell S, Ireton J, Valencia-Mayoral P, Downar E, Larratt L, Patterson J, Blendis L, Phillips MJ.** Amiodarone-associated phospholipidosis and fibrosis of the liver. Light, immunohistochemical, and electron microscopic studies. *Gastroenterology.* 1984 May; 86:926-36.
- * **Prusiner SB.** Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10; 95(23):13363-83.
- * **Ramon y Cajal S (1928).** Degeneration and Regeneration of the Nervous System. May RM Translation. Oxford Univ. Press, London
- * **Reed RR, Bakalyar HA, Cunningham AM, Levy NS.** The molecular basis of signal transduction in olfactory sensory neurons. *Soc Gen Physiol Ser.* 1992; 47:53-60.

- * **Richardson RJ, Davis CS, Johnson MK.** Subcellular distribution of marker enzymes and of neurotoxic esterase in adult hen brain. *Neurochem.* 1979 Feb; 32(2):607-15.
- * **Richardson RJ.** Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature. *J Toxicol Environ Health.* 1995 Feb;44(2):135-65.
- * **Robertson DG, Mattson AM, Bestervelt LL, Richardson RJ, Anderson RJ** Time course of electrophysiologic effects induced by di-n-butyl-2,2-dichlorovinyl phosphate (DBCV) in the adult hen. *J Toxicol Environ Health.* 1988; 23(3):283-94.
- * **Robitaille Y, Carpenter S, Karpati G, DiMauro SD.** distinct form of adult polyglucosan body disease with massive involvement of central and peripheral neuronal processes and astrocytes: a report of four cases and a review of the occurrence of polyglucosan bodies in other conditions such as Lafora's disease and normal ageing. *Brain.* 1980 Jun; 103(2):315-36.
- * **Romeis B.** *Mikroskopische Technik.* Oldenbourg Verlag München. 1948
- * **Rosenstock L, Keifer M, Daniell WE, McConnell R, Claypoole K.** Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. The Pesticide Health Effects Study Group. *Lancet.* 1991 Jul 27; 338(8761):223-7.
- * **Rubin GM, Spradling AC.** Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* 1982 Oct 22; 218(4570):348-53.
- * **Saint Marie RL, Carlson SD, Chi C.** The glial cells of insects. In *Insect Ultrastructure*, ed. R.C. King, H. Akai, 1984 (2): 435-45. New York: Plenum
- * **Saint Marie RL, Carlson SD.** Glial membrane specializations and the compartmentalization of the lamina ganglionaris of the housefly compound eye. *J Neurocytol.* 1983 Apr; 12(2):243-75.
- * **Saint Marie RL, Carlson SD.** The fine structure of neuroglia in the lamina ganglionaris of the housefly, *Musca domestica* L. *J Neurocytol.* 1983 Apr; 12(2):213-41
- * **Schlaepfer WW, Bunge RP.** Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J Cell Biol.* 1973 Nov; 59(2 Pt 1):456-70. No abstract available.
- * **Schroder JM, Wang JF, Sindern E, Malin JP.** Polyneuropathy with osmiophilic membrane-bound, cytoplasmic inclusions in Schwann cells (POMCIS). *Acta Neuropathol (Berl).* 1999 Oct; 98(4):427-32.
- * **Seifert J, Casida JE.** Neural microtubular and lysosomal phenyl valerate esterases and proteases in relation to organophosphate-induced delayed neurotoxicity. *Comp Biochem Physiol C.* 1984; 78(2):271-6.
- * **Senanayake N, Karalliedde L.** Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *N Engl J Med.* 1987 Mar 26; 316(13):761-3.
- * **Simard R, Bernhard W.** [The phenomenon of nucleolar segregation: specificity of action of certain antimetabolites]. *Int J Cancer.* 1966 Sep 15; 1(5):463-79.
- * **Sonnenfeld MJ, Jacobs JR.** Macrophages and glia participate in the removal of apoptotic neurons from the *Drosophila* embryonic nervous system. *J Comp Neurol.* 1995 Sep 4; 359(4):644-52.
- * **Southern JA, Young DF, Heaney F, Baumgartner WK, Randall RE.** Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen Virol.* 1991 Jul; 72 (Pt 7):1551-7.
- * **Steenland K.** Chronic neurological effects of organophosphate pesticides. *BMJ.* 1996 May 25; 312(7042):1312-3.
- * **Stephenson D, Rash K, Smalstig B, Roberts E, Johnstone E, Sharp J, Panetta J, Little S, Kramer R, Clemens J.** Cytosolic phospholipase A2 is induced in reactive glia following different forms of neurodegeneration. *Glia.* 1999 Aug; 27(2):110-28.
- * **Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD.** Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* 1989 Oct; 18(5):671-83.
- * **Taylor P.** Anticholinesterase agents. Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. MacMillan New York. 1980: 100-119.

-
- * **Thomas TC, Szekacs A, Rojas S, Hammock BD, Wilson BW, McNamee MG.** Characterization of neuropathy target esterase using trifluoromethyl ketones. *Biochem Pharmacol.* 1990 Dec 15; 40(12):2587-96.
 - * **Tolnay SE, Glynn PJ.** The persistence of high fertility in the American South on the eve of the baby boom. *Demography.* 1994 Nov; 31(4):615-31.
 - * **Triebig G, Lang C.** Brain imaging techniques applied to chronically solvent-exposed workers: current results and clinical evaluation. *Environ Res.* 1993 May; 61(2):239-50
 - * **Triebig G.** [Toxic encephalopathy as an occupational disease]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1990 Aug 24; 115(34):1287-90.
 - * **Uchihara T, Akiyama H, Kondo H, Ikeda K.** Activated microglial cells are colocalized with perivascular deposits of amyloid-beta protein in Alzheimer's disease brain. *Stroke.* 1997 Oct; 28(10):1948-50.
 - * **Virchow, R.** Über das granulirte Ansehen der Wandungen der Gehirnventrikel, *Allg. Z. Psychiatr.*, 3 (1846) 242-250
 - * **Weatherby TM, Davis AD, Hartline DK, Lenz PH.** The need for speed. II. Myelin in calanoid copepods. *J Comp Physiol [A].* 2000 Apr; 186(4):347-57.
 - * **Williams DG, Johnson MK.** Gel-electrophoretic identification of hen brain neurotoxic esterase, labelled with tritiated di-isopropyl phosphorofluoridate. *Biochem J.* 1981 Nov 1; 199(2):323-33.
 - * **Xu K, Terakawa S.** Fenestration nodes and the wide submyelinic space form the basis for the unusually fast impulse conduction of shrimp myelinated axons. *J Exp Biol.* 1999 Aug; 202 (Pt 15):1979-89.
 - * **Yau KW, Baylor DA.** Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci.* 1989; 12:289-327.
 - * **Yau KW.** Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26; 91(9):3481-3.

Fruit flies like a banana.

Der erste Dank gehört meiner Betreuerin *Doris Kretzschmar*, die es in den vergangenen vier Jahren immer wieder geschafft hat, der Arbeit und mir, auch in Phasen scheinbarer Stagnation, stetig neue Impulse zu verschaffen. Ihre Tatkraft und Kreativität war immer mitreißend und motivierend. Viel Glück für den weiteren Weg!

und

Prof. Dr. Stefan Schneuwly, in dessen Institut diese Promotionsarbeit entstand und der mir in der Endphase Hilfreich und mit konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Der zweite Dank gebührt den Menschen, ohne welche diese Arbeit nicht in dieser Form realisierbar gewesen wäre.

Hier ist als erstes *Paul Glynn* von der University of Leicester zu nennen, der unermüdlich auf die Express-Packete aus Regensburg gewartet hat um direkt Messungen vorzunehmen, die uns dann manchmal schon Stunden später zur Verfügung standen. Darüber hinaus stand sein immer offenes Ohr meinen Fragen stets zur Verfügung. Herrn *Wolfgang Drobnik* und Frau *Karin Athenstaedt* danke ich für die Messungen der Membrankomponenten.

Besonderer Dank an die Adresse von *Markus Moser* und *Reinhart Büttner* (damals noch) an der RWTH Aachen, die spontan und ohne lange zu zögern die Finanzierung für ein weiteres halbes Jahr ermöglicht haben, nachdem sich unsere finanzielle Situation grundlegend geändert hatte. Vielen Dank Euch beiden und viel Glück für die Zukunft!

Frau Kühn und *Uschi* ein herzliches Dankeschön für die Unmenge an Präparaten, Tips und den Beistand am Elektronenmikroskop. Allen anderen, die einzeln unerwähnt bleiben und die aber trotzdem die Hilfsleistungen erbracht haben, ohne die ein Leben mit *Drosophila* nicht möglich ist und die mir dadurch das eine oder andere Wochenende in den Bergen oder sonstwo ermöglicht haben, ein herzliches Vergelt's Gott.

Außerhalb des Arbeitsumfeldes gibt es viele Menschen, die mir die vergangenen Jahre hindurch geholfen haben, neben der Arbeit ein abwechslungsreiches und anregendes Leben führen zu können, die mir Inspiration und Widerpart waren und die insbesondere in den letzten eineinhalb Jahren mit sehr viel Geduld und Teilnahme so manchen Meter mit mir gemeinsam zurückgelegt haben. Euch, meine lieben Freunde, im einzelnen aufzuzählen, würde vermutlich nicht jedem gerecht werden und so belasse ich es in dieser "Unschärfe". Hervorheben möchte ich trotz allem *Renate*, *Ingeborg* und *Jörg*, deren heldenhafte Ausdauer und familiäre Fürsorge von entscheidender Bedeutung für mich waren. Tausend Glückssterne!

Lieber Hans, hier ein kleines Ping-Pong Dankeschön zurück, Deine Anwesenheit im Kammerl und so manches spätabendliche Zwickel hielten den Ultrastruktur-Hospitalismus von mir fern und trugen wesentlich zur Heiterkeit der letzten Monate bei.

Susi, Jose, Heiko, Jakob, Ralf und Sinje: Ihr habt die menschliche und freundschaftliche Atmosphäre während der Arbeit grundlegend gestaltet und immer Farbe in den Alltag gebracht. Ich wünsche Euch das Glück, daß man zum Erfolg braucht und das Durchhaltevermögen, letzterem auf der Spur zu bleiben. Und noch viele schöne Abende in Ralf's Eck.

Sinje ein Extra-Dank.

Und zu Letzt der größte Dank an meine Familie:

An meinen Vater, Wim und meine Geschwister Heidi und Berhard, Sema und Gernot.

An meine Mutter. Ich sah ein Schifflein fahren.