
Funktionelle Analyse der Signalpeptidpeptidase Familie im Zebrafisch

Peter Krawitz



Augsburg 2009

Aus dem Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie
des Adolf Butenandt Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Christian Haass

Funktionelle Analyse der Signalpeptidpeptidase Familie im Zebrafisch

Peter Krawitz

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

Peter Krawitz

aus Augsburg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Haass
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Peter B. Becker
- Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Lohse
Prof. Dr. med. Manfred Schliwa
Priv. Doz. Dr. Ursula Strobl
- Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Bettina Schmid
- Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser
FACR, FRCR
- Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2009

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits teilweise in folgender Publikation veröffentlicht:

Differential Localization and Identification of a Critical Aspartate Suggests Non-redundant Proteolytic Functions of the Presenilin Homologues SPPL2b and SPPL3

Peter Krawitz, Chirstof Haffner Regina Fluhner, Harald Steiner, Bettina Schmid, and Christian Haass, **J Biol. Chemistry**, 2005 Nov 25; Vol 280, No 47, pp39515-39523

Die Publikation befindet sich im Anhang.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Intramembran Proteasen (I-CLiPs)	1
1.2 Intramembranäre Aspartylproteasen des GxGD-Typs	4
1.2.1 Preseniline	4
1.2.2 SPP und homologe Proteine	6
1.2.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Presenilin und SPP	9
1.3 Substrate von SPP	10
1.3.1 Signalsequenzen	10
1.3.2 SPP Spaltprodukte - mehr als nur Abbauprodukte	12
1.3.2.1 Präsentation von Signalpeptid Fragmenten auf MHC Klasse I Molekülen	12
1.3.2.2 Fragmente der Präprolaktin Signalsequenz inhibieren Calmodulin.....	13
1.3.2.3 Funktion der SPP bei der Pestivirus und Hepatitis C Virus Replikation.....	14
1.4 Substrate von SPPL2a und SPPL2b	14
1.5 Ziel der Arbeit	15
2 Material und Methoden	18
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.1 Molekularbiologie	18
2.1.2 Zellkultur	18
2.1.3 Proteinbiochemie.....	18
2.1.4 Fischarbeiten	19
2.2 Chemikalien und Lösungen.....	19
2.2.1 Molekularbiologie	19
2.2.2 Zellkultur	21
2.2.3 Proteinbiochemie.....	21
2.2.4 Antikörper	24

2.2.5	Fischarbeiten	24
2.3	Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere	25
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.4.1	Vektoren	25
2.4.2	DNA Konstrukte.....	25
2.4.3	Rekombinante DNA-Techniken.....	26
2.4.3.1	Verwendete Oligonukleotide	26
2.4.3.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.4.3.3	PCR-Mutagenese.....	28
2.4.3.4	Aufreinigung und Analyse der DNA.....	29
2.4.3.4.1	Gelelektrophorese	29
2.4.3.4.2	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	29
2.4.3.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	30
2.4.3.4.4	DNA Sequenzierung	30
2.4.3.5	Enzymatische Modifikation der DNA.....	30
2.4.3.5.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	30
2.4.3.5.2	Dephosphorylierung von DNA.....	30
2.4.3.5.3	Ligation von DNA Fragmenten	31
2.4.3.6	Transformation und Plasmidpräparation	31
2.4.3.6.1	Herstellung transformationskompetenter E.coli	31
2.4.3.6.2	Transformation des Ligationsproduktes	31
2.4.3.6.3	Bakterienkultivierung	31
2.4.3.6.4	Plasmidpräparation	32
2.5	Zellkultur.....	32
2.6	Proteinbiochemie.....	33
2.6.1	Zelllysate	33
2.6.2	Membranpräparation und Inkubation mit Inhibitoren.....	33

2.6.3	SDS-PAGE Elektrophorese.....	33
2.6.4	Western-Blot und Immunodetektion.....	34
2.7	Fisch Arbeiten.....	35
2.7.1	Aufzucht und Haltung der Fische.....	35
2.7.1	Isolierung von Zebrafisch mRNA und RT-PCR.....	35
2.7.2	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	35
2.7.3	Injektion der Zebrafischeizellen mit mRNA und GriPNA.....	36
2.7.4	Injektion der Mikrobeads.....	38
2.7.5	Acridine Orange und TUNEL Färbung.....	38
2.7.6	Photographie.....	39
2.8	Homologievergleiche in Genomdatenbanken.....	39
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Orthologe Gene der SPP Familie im Zebrafischgenom.....	42
3.1.1	Intron-Exon Struktur von <i>spp</i> , <i>sppl2</i> und <i>sppl3</i>	45
3.2	mRNA Expressionsprofile während der frühen Entwicklung im Zebrafisch.....	47
3.2.1	Zebrafisch Embryogenese.....	47
3.2.2	Expressionsmuster von <i>spp</i> , <i>sppl2</i> und <i>sppl3</i>	48
3.3	Inhibition der Gen Funktion <i>in vivo</i>	51
3.3.1	Auswahl der GriPNA's.....	51
3.3.2	Auswirkungen eines <i>spp</i> bzw. <i>sppl3</i> Funktionsverlustes auf die Zebrafiscentwicklung.....	51
3.3.3	Auswirkung eines <i>sppl2</i> Funktionsverlustes auf die Zebrafiscentwicklung.....	55
3.3.4	Spezifität und Effektivität der knock down Experimente.....	58
3.4	Der Aspartylrest des GxGD Motivs ist für die Funktion von <i>spp</i> , <i>sppl2</i> und <i>sppl3</i> notwendig.....	61
3.4.1	Immunpräzipitation von SPP, SPPL2b und SPPL3 mit einem Aspartylprotease Inhibitor.....	64

4	Diskussion	66
4.1	Expressionsmuster der SPP Familie in anderen Spezies.....	66
4.2	Funktionelle Analyse von SPP in <i>Drosophila melanogaster</i> und <i>Caenorhabditis elegans</i>	68
4.3	Reifungsprozess und subzelluläre Lokalisation von SPP, SPPL2b und SPPL3.....	70
4.4	Neurodegenerative Phänotypen im Zebrafisch	71
4.5	Der <i>sppl2</i> Funktionsverlust im Zebrafisch.....	73
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	74
6	Literaturverzeichnis.....	76
	Abkürzungsverzeichnis	88
	Danksagung.....	92
	Lebenslauf.....	94
	Anhang.....	96

1 Einleitung

Die regulierte Intramembranproteolyse (RIP, regulated intramembrane proteolysis) ist ein neuer zellulärer Mechanismus (Brown et al, 2000) (Wolfe & Kopan, 2004), der beschreibt, wie bi- und polytopische Transmembranproteine proteolytisch gespalten werden. Bei diesem Mechanismus wird die Ektodomäne, der extrazelluläre Anteil eines Membranproteins, abgespalten (shedding) und anschließend das in der Membran verbliebene Fragment durch Intramembranproteasen weiter prozessiert (Abbildung 2 A). RIP ist eingebunden in den Prozess reverser Signaltransduktion und Degradation bestimmter Transmembranfragmente.

Die γ -Sekretase und die Familie der Signalpeptidpeptidasen (SPP) sind GxGD-Intramembran-Aspartylproteasen. Kennzeichen der Vertreter dieser Klasse ist der Aspartylrest, der in das hochkonservierte Aminosäure Motiv GxGDim katalytischen Zentrum der Protease eingebettet ist.

SPP und γ -Sekretase sind aus unterschiedlichen Gründen von großem medizinischen Interesse. Während der γ -Sekretase eine entscheidende Funktion in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit zukommt, scheinen Mitglieder der SPP Familie eine wichtige Rolle bei immunologischen Prozessen und Virus Infektionen zu spielen. Dies macht beide Proteasen zu potentiellen Zielen pharmakologischer Intervention.

Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung und die funktionelle Analyse der Intramembran-Aspartylproteasen ist daher auch hinsichtlich möglicher Kreuzreaktionen durch therapeutisch einsetzbare Inhibitoren von großer Bedeutung.

1.1 Intramembran Proteasen (I-CLiPs)

Proteasen sind Enzyme, die Peptide oder Proteine spalten können. Dabei katalysieren Proteasen die Hydrolyse der mesomeriestabilisierten Peptidbindung. Proteasen begünstigen die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung, indem sie den nukleophilen Angriff auf das wenig reaktive Kohlenstoffatom der Peptidbindung katalysieren. Proteasen werden nach der Art ihres aktiven Zentrums in fünf Gruppen eingeteilt: Aspartylproteasen, Cysteinproteasen, Metalloproteasen, Serinproteasen und Threoninproteasen.

Im aktiven Zentrum der Aspartylproteasen befinden sich zwei Aspartylreste, von denen nur einer deprotoniert ist (Abbildung1). Der protonierte Aspartylrest polarisiert die Peptidbindung, so dass ein nukleophiler Angriff auf das Kohlenstoffatom der Peptidbindung

erleichtert wird. Der deprotonierte Aspartylrest aktiviert ein Wassermolekül, welches die Peptidbindung hydrolysiert (Davies, 1990).

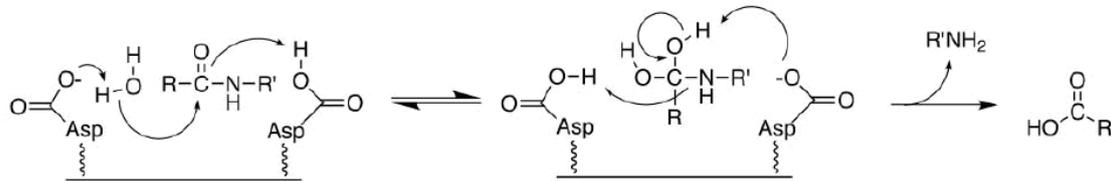


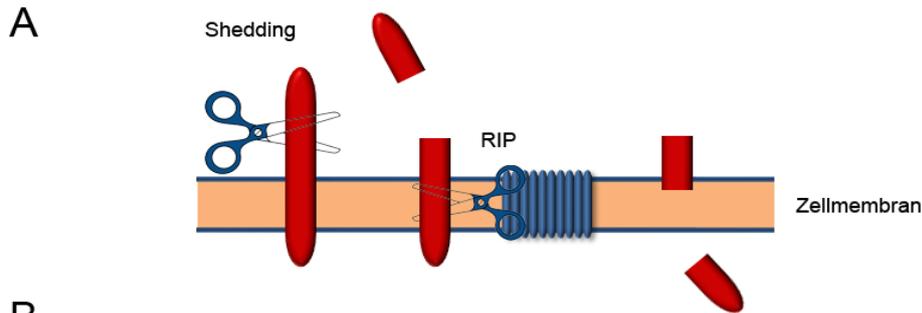
Abbildung1: Hydrolyse einer Peptidbindung, katalysiert durch eine Aspartylprotease (Davies, 1990).

Da für die Hydrolyse der Peptidbindung ein Wassermolekül benötigt wird, befinden sich die aktiven Zentren klassischer Proteasen in wässriger Umgebung. Um so erstaunlicher war daher die Entdeckung polytopischer Transmembranproteasen, deren enzymatisch aktives Zentrum sich innerhalb der hydrophoben Lipiddoppelschicht zellulärer Membranen befindet (Wolfe et al, 1999a; Wolfe & Kopan, 2004). Diese Proteasen werden als Intramembranproteasen (I-CliPs, intramembrane cleaving proteases) bezeichnet. Obwohl der genaue katalytische Mechanismus noch unbekannt ist, scheint die Hydrolyse in einem den klassischen Proteasen ähnlichen Prozess stattzufinden. Man unterscheidet in Analogie zu den klassischen Proteasen zwischen intramembranären Aspartylproteasen, Metalloproteasen und Serinproteasen (B).

Ein Vertreter der intramembranären Metalloprotease ist die S2-Protease (S2P, human site-two protease). S2P spaltet und aktiviert ein Protein (SREB, sterol regulatory element binding protein), das an der Cholesterin Homöostase beteiligt ist (Brown & Goldstein, 1999).

Ein Beispiel für eine intramembranäre Serinprotease ist Rhomboid-Like 1, das den EGF Rezeptorliganden spaltet (Gallio et al, 2002; Koonin et al, 2003).

Der Prototyp der Intramembran-Aspartylproteasen ist Presenilin, welches an der Spaltung von Notch und β APP (β -Amyloid precursor protein) beteiligt ist und das katalytische Zentrum im γ -Sekretase Komplex darstellt (Haass & Steiner, 2002).



B

I-CLiP	Catalytic motifs (and topology of substrates)	Substrates	Cleavage products	Function, pathway
Presenilins				
Presenilin-1 (Animals, Plants)	<p>Presenilin (Substrate)</p> <p>Cytosol (Substrate)</p> <p>Extracellular space (type I)</p>	NOTCH 1-4 β APP ErbB4 N-Cadherin CD44 LRP	NICD ^g AICD, p3, A β B4-ICD ? CD44ICD ?	NOTCH signalling Nuclear signalling, Alzheimer's disease EGF signalling Dissociation of E-Cad from cytoskeleton Upregulation of TPA-responsive elements ?
SPP family				
SPP (Animals, Plants)	<p>SPP (Substrate)</p> <p>Cytosol (Substrate)</p> <p>ER lumen (type II)</p>	Polymorphic MHC class I molecules Prolactin HCV polyprotein	HLA-E epitopes CaM-binding signal peptide fragment HCV core protein	HLA-E signalling Regulation of CaM-dependent processes (prolactin secretion?) Processing of HCV core protein ?
SPP-like proteases (Animals, Plants, Fungi, Archaea)		?	?	?
S2P family				
S2P (Animals)	<p>S2P (Substrate)</p> <p>Cytosol (Substrate)</p> <p>Golgi lumen (type II)</p>	SREBP ATF6	SREBP (N-term. domain) ATF6 (N-term. domain)	Cholesterol/lipid biosynthesis Unfolded protein response (chaperone induction)
S2P-like proteases (Plants, Archaea, Bacteria)		?	?	?
Eep (<i>E. faecalis</i>) YaeL (<i>E. coli</i>)	<p>SpoIVFB (Substrate)</p> <p>Cytosol (Substrate)</p> <p>Intermembrane space (type I)</p>	cAD1 precursor ^a Anti- σ^E (RseA) pro- σ^K	cAD1 (pheromone) Degraded σ^K	Conjugation σ^E activation (stress response) Sporulation
SpoIVFB (<i>B. subtilis</i>)				
Rhomboid family				
Rhomboid 1 (<i>D. melanogaster</i>)	<p>Rhomboid 1 (Substrate)</p> <p>Cytosol (Substrate)</p> <p>Golgi lumen (type I)</p>	Spitz Gurken Keren	Spitz (EGF ligand) Gurken (EGF ligand) Keren (EGF ligand)	EGF signalling EGF signalling EGF signalling
Rhomboid-like proteases (Animals, Plants, Fungi, Archaea, Bacteria)		?	?	?
PCP1 (<i>S. cerevisiae</i>)		Cytochrome c peroxidase (Ccp1)	?	?
AarA (<i>P. stuartii</i>)		?	?	Quorum sensing (acetyltransferase repression)

Abbildung 2: (A) Schematische Darstellung des RIP (regulated intramembrane proteolysis) Mechanismus, die intramembranäre Proteolyse findet statt, nachdem die Ektodomäne verkürzt wurde. (B) Übersicht über die Familie der I-CLiPs. Ihrer Substrate und Funktionen, modifiziert aus (Weihofen & Martoglio, 2003).

1.2 Intramembranäre Aspartylproteasen des GxGD-Typs

1.2.1 Preseniline

Die Preseniline (PS1 und PS2) sind Membranproteine mit neun Transmembrandomänen (Laudon et al, 2005; Steiner & Haass, 2000). Presenilin wird als ca. 50 kD großes inaktives Vorläuferprotein synthetisiert. Zusammen mit den Kofaktoren Nicastrin, APH-1 (anterior pharynxdefective-1) und PEN-2 (presenilin enhancer 2) bildet Presenilin die funktionelle Einheit der γ -Sekretase (Edbauer et al, 2003). Der Kofaktor Nicastrin spielt bei der Substraterkennung eine Rolle (Shah et al, 2005) und APH-1 beeinflusst die Stabilität des Holo-proteins (Takasugi et al, 2003). Das Voll-längen-Protein Presenilin wird nach Anlagerung von PEN-2 endoproteolytisch in ein ca. 30 kDa großes N-terminales und ein ca. 20 kD großes C-terminales Fragment gespalten. Die beiden Fragmente werden durch PEN-2 zusammengehalten (LaVoie et al, 2003; Luo et al, 2003; Prokop et al, 2005; Prokop et al, 2004).

Alle bekannten Substrate der γ -Sekretase stammen von Transmembranproteinen mit Typ I Orientierung ab. Der C-Terminus dieser Proteine ist dem Zytoplasma zugewandt. Bevor die γ -Sekretase schneiden kann, muss die Ektodomäne dieser Proteine durch andere Proteasen verkürzt werden, so dass die verbleibende Ektodomäne typischerweise kürzer als 30 Aminosäuren lang ist (Beel & Sanders, 2008; Struhl & Adachi, 2000).

Von besonderer entwicklungsbiologischer Bedeutung ist die Prozessierung von Notch, einem Transmembranprotein mit Rezeptorfunktion. Nachdem Notch einen Liganden aus der DSL Familie (Delta, Serrate, Lag-2) gebunden hat, spaltet eine α -Sekretase der ADAM Familie die Ektodomäne von Notch ab. Das in der Membran verbliebene Fragment kann daraufhin durch die γ -Sekretase weiter gespalten werden. Dadurch wird das dem Zytoplasma zugewandte C-terminale Fragment von Notch (NICD) freigesetzt und reguliert im Zellkern im Komplex mit RBP-Jk die Transkription entwicklungsbiologisch relevanter Gene. Delta-Notch Interaktionen vermitteln durch laterale Inhibition wichtige Zelldifferenzierungsprozesse (Abbildung 4) (Artavanis-Tsakonas et al, 1999; LaVoie & Selkoe, 2003; Muskavitch, 1994; Selkoe & Kopan, 2003).

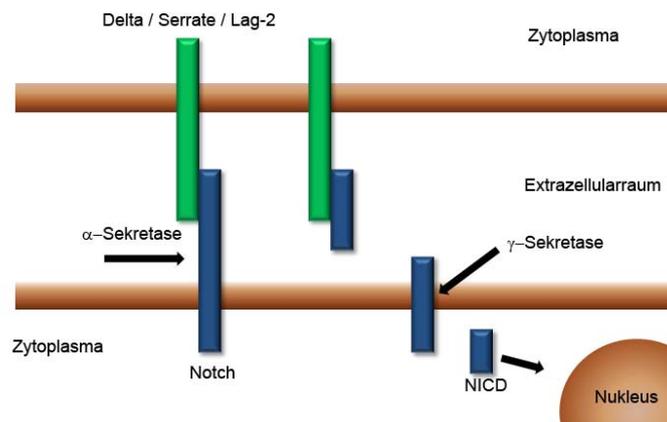


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Notch Signalweges. Nachdem Notch seinen Liganden gebunden hat, schneidet eine α -Sekretase im Extrazellulärraum. Anschließend spaltet die γ -Sekretase das verbliebene Membranfragment und setzt so das N-terminale Fragment NICD ins Zytoplasma frei.

Pathophysiologisch von großer Bedeutung ist die Prozessierung des β -Amyloid Vorläufer Proteins (β APP). Die Prozessierung von β APP erfolgt in zwei aufeinander folgenden Schritten (Abbildung 4). Zunächst wird die Ektodomäne von β APP durch eine α -Sekretase oder eine β -Sekretase abgespalten und an der Zelloberfläche in den extrazellulären Raum freigesetzt. Ein C-terminales Fragment verbleibt in der Membran. Nachdem die Ektodomäne abgespalten wurde, schneidet die γ -Sekretase das verbliebene C-terminale Fragment innerhalb der Transmembrandomäne. Die neu entstandenen C- bzw. N-terminalen Fragmente werden ins Zytoplasma bzw. in den extrazellulären Raum abgegeben. Das durch das Zusammenspiel von β - und γ -Sekretase entstandene A β 40/42 Peptid kann aggregieren und ist maßgeblich an der Amyloidbildung bei der Alzheimer Erkrankung beteiligt (Haass, 2004; Selkoe & Kopan, 2003).

Allen Intramembran-Aspartylproteasen gemeinsam sind die hochkonservierten Aminosäure Motive YD in TM 6 und GxGD in TM 7 (Steiner et al, 2000; Steiner et al, 2002). Die Aspartylreste dieser Motive sind notwendig für die γ -Sekretase Aktivität (Wolfe et al, 1999c).

In Familien, bei denen die Alzheimer Krankheit bereits in einem frühen Lebensalter auftritt, wurde eine Mutation des Glyzinrestes (G384A) nachgewiesen (Cruts et al, 1995; Selkoe, 1997). Diese Mutation führt zu einer Verlagerung der APP Schnittstelle, so dass der relative Anteil des hochamyloidogenen Spaltproduktes A β 42 um das bis zu vierfache zunimmt (Steiner et al, 2000).

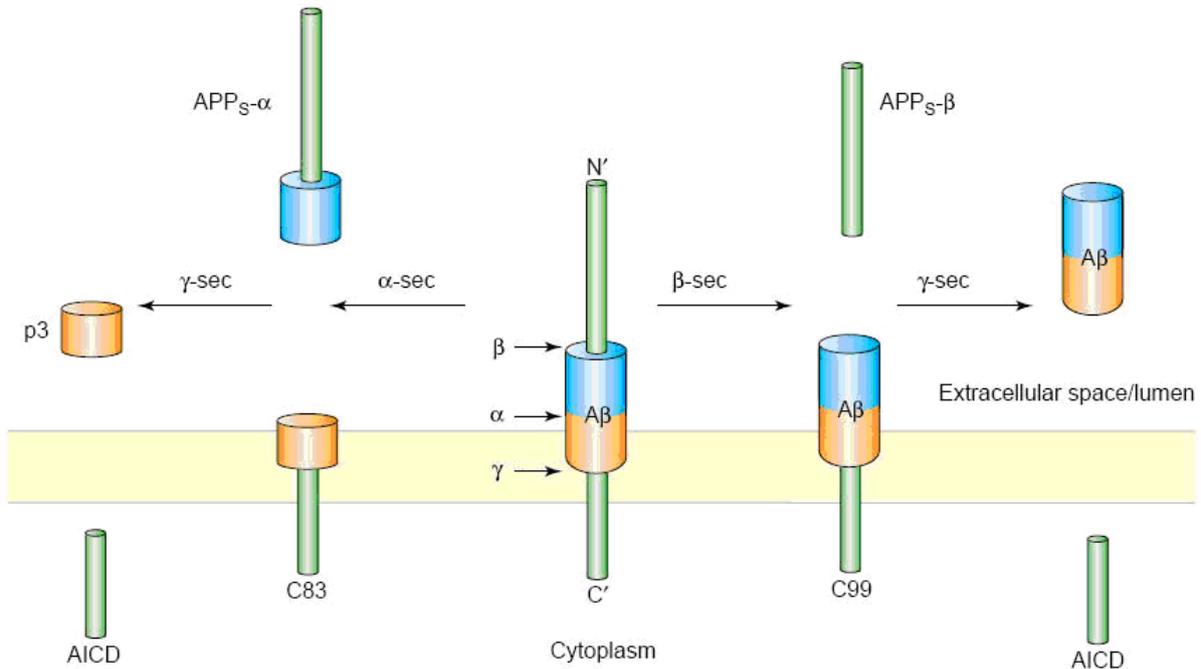


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Prozessierung von β APP (Haass & Steiner, 2002).

1.2.2 SPP und homologe Proteine

Nach der Entdeckung der physiologischen Funktion bestimmter Signalpeptid Spaltprodukten (Martoglio & Dobberstein, 1998), wurde eine Signalpeptidpeptidase postuliert. SPP konnte daraufhinüber einen Inhibitor-Enzym-Komplex isoliert und identifiziert werden (Weihofen et al, 2002). Da SPP wie auch die Preseniline über das GxGD – GD Motiv verfügt, wird sie der Familie der Intramembran-Aspartylproteasen zugeordnet. SPP ist ein Membranprotein mit neun Transmembrandomänen (Abbildung 5), das zunächst als ca. 38 kD schweres Protein synthetisiert wird und nach Glykosylierung in einer 40 - 42 kD murenen Form vorliegt. Orthologe Proteine wurden in höheren Eukaryonten, Pflanzen, Pilzen und Hefe gefunden. In Prokaryonten gibt es hingegen kein SPP.

Über Homologievergleiche wurden weitere Gene identifiziert, die der SPP Familie zugerechnet werden. Da bisher die physiologischen Substrate und die Funktion dieser Proteine nicht vollständig geklärt sind, werden sie, wegen ihrer Sequenzähnlichkeit zu SPP als SPPLs (signal peptidase like proteases) bezeichnet. Im humanen Genom existieren SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c und SPPL3 (Friedmann et al, 2004). Weitere in der Literatur gebräuchliche Bezeichnungen für diese Gene sind PSH1-5 (presenilin homologe) (Ponting et al, 2002) und IMPAS1-5 (intramembrane protease associated activity) (Grigorenko et al, 2002). Alle Mitglieder der SPP Familie sind Membranproteine mit neun

Transmembrandomänen und besitzen die charakteristischen Aminosäure-Motive YD und GxGD im aktiven Zentrum. Desweiteren ist die Sequenzhomologie insbesondere im C-Terminus sehr ausgeprägt, das Aminosäure Motiv PAL ist in allen Mitgliedern der SPP Familie konserviert.

Bei SPP und SPPL3 hat die erste N-terminale hydrophobe Region die Funktion einer Signalankersequenz (Abbildung 5). Der N-Terminus ragt ins ER Lumen. SPPL2a/b/c besitzen Signalsequenzen, die abgespalten werden, so dass der N-Terminus des jeweiligen Proteins ebenfalls dem ER-Lumen zugewandt ist (Friedmann et al, 2004). Die konservierten Motive YD und GxGD mit den katalytisch aktiven Aspartylresten befinden sich in den zwei benachbarten Transmembrandomänen TM6 und TM7. Die Schleife, die diese Transmembrandomänen miteinander verbindet befindet sich im extrazellulären Raum (Friedmann et al, 2004). Der dem Zytosol zugewandte C-Terminus von SPP enthält zwei Lysinreste. Transmembranproteine mit dem Motiv KKxx werden im ER zurückgehalten (Jackson et al, 1990; Jackson et al, 1993), so dass SPP vermutlich seine physiologische Funktion im ER erfüllt. Im Unterschied dazu haben SPPL2a/b/c und SPPL3 kein bekanntes ER Rückhaltesignal.

Als physiologisch relevante Substrate von SPP wurden Signal Peptide beschrieben (siehe 1.3). Ähnlich den Presenilinen führt eine Mutation der Aspartylreste in den konservierten Motiven YD und GxGD zu einem nahezu vollständig reduzierten Substratumsatz (Martoglio & Dobberstein, 1998; Weihofen et al, 2002; Wolfe et al, 1999c). Als physiologische Substrate für SPPL2a/b konnten TNF α (Tumornekrosefaktor α) und Bri2 identifiziert werden (Fluhrer et al, 2006; Friedmann et al, 2006; Martin et al, 2008).

Für die SPP Homologen SPPL2c und SPPL3 sind bislang noch keine physiologisch relevanten Substrate bekannt. Die Vermutung, es handele sich auch bei diesen Proteinen um Intramembran-Proteasen vom GxGD Typ konnte daher noch nicht final belegt werden.

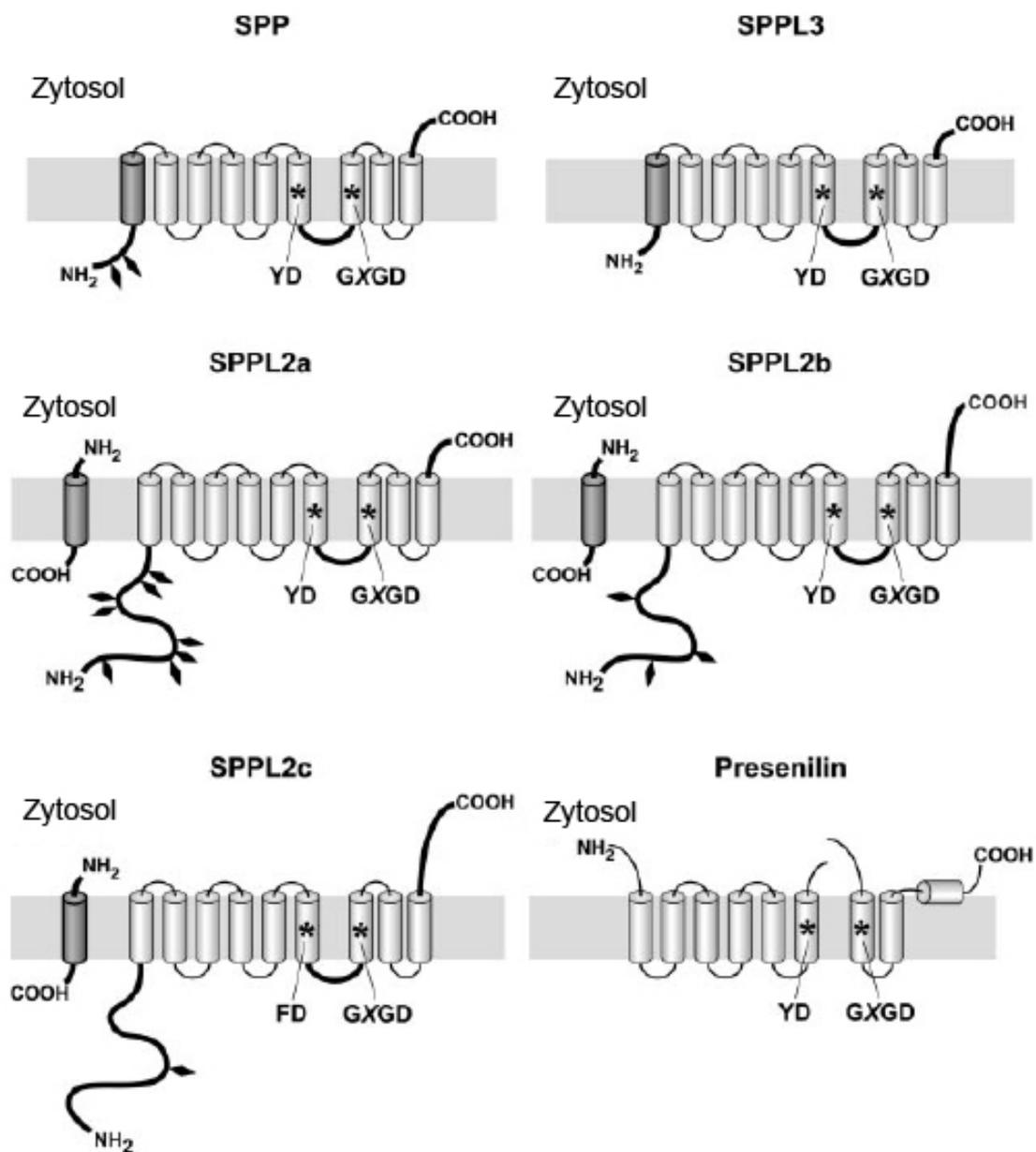


Abbildung 5: Topologische Modelle der SPP Familie und Presenilin (Friedmann et al, 2004). Die Mitglieder der SPP Familie sind Membranproteine mit neun Transmembrandomänen. Die Aspartylreste der konservierten Motive YD und GxGD befinden sich in benachbarten Transmembrandomänen.

1.2.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Presenilin und SPP

Das gemeinsame Merkmal der Preseniline und der Mitglieder der SPP Familie sind die konservierten Aminosäuremotive YD, GxGD und PAL. Wie bereits beschrieben (vgl. 1.1), sind die Aspartylreste dieser Motive an der Hydrolyse des Substrates beteiligt. Die Funktion des PAL Motivs ist bisher nicht eindeutig geklärt. Mutationen im Bereich des PAL Motivs von PS beeinträchtigen die Funktion der γ -Sekretase. Zum einen scheint es als Teil eines ER Rückhaltesignals an der Bildung des γ -Sekretase Komplexes beteiligt zu sein (Kaether et al, 2004; Tomita et al, 2001). Zum anderen ist eine direkte Beteiligung an dem proteolytischen Mechanismus von GxGDProteasen möglich (De Strooper, 2005; Kaether et al, 2004; Wang et al, 2006). Auch die genaue Lage des PAL Motivs bezüglich der Membran ist noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise, dass sich die PAL Sequenz sowohl in Presenilin als auch in SPP innerhalb der letzten Transmembrandomäne befindet (Henricson et al, 2005).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Presenilin und SPP ist die umgekehrte Orientierung der Motive YD und GxGD in der Membran. Hiermit in Zusammenhang steht das unterschiedliche Substratspektrum der beiden Proteasen: Substrate der γ -Sekretase sind Membranproteine deren C-Terminus dem Zytosol zugewandt ist und haben damit eine Typ I Orientierung. Die Substrate von SPP/SPPL hingegen sind Membranproteine vom Typ II.

Die Substrate der γ -Sekretase als auch der SPP sind Produkte vorangehender enzymatischer Reaktionen, die die Ektodomäne verkürzt. So erfordert z.B. das β APP einen Schnitt durch die α - oder β - Sekretase, bevor es durch die γ -Sekretase weiter prozessiert werden kann und auch das Signalpeptid muss erst durch die Signalpeptidase vom Vorläuferprotein abgespalten werden, um SPP zugänglich zu sein.

Presenilin benötigt drei weitere Kofaktoren (APH-1, PEN-2 und Nicastrin) und einen endoproteolytischen Schnitt, um den katalytisch aktiven Komplex der γ -Sekretase zu bilden (Edbauer et al, 2003). Im Unterschied dazu scheint SPP ohne weitere Kofaktoren sein Substrat spalten zu können. Derzeit noch nicht erschöpfend geklärt ist, ob es sich bei der aktiven Form von SPP um ein Monomer oder ein Dimer handelt. Es gibt Hinweise dafür, dass sowohl Presenilin als auch SPP in ihrer aktiven Form als Dimere vorliegen (Nyborg et al, 2004; Schroeter et al, 2003).

1.3 Substrate von SPP

Signalsequenzen spielen eine Schlüsselrolle beim gerichteten Transport neu synthetisierter Membranproteine und sekretorischer Proteine ins Endoplasmatische Retikulum eukaryontischer Zellen. Die Signalsequenzen werden nach der Integration in die ER Membran durch die Signalpeptidase von dem Präprotein abgespalten. Da sich Fragmente der Signalpeptide im Zytosol nachweisen lassen, wurde schon seit längerer Zeit eine Signalpeptidase postuliert, die für die Spaltung der Signalpeptide verantwortlich ist. Mit Hilfe eines photoaktiven Inhibitors gelang es, SPP zu isolieren und zu identifizieren (Weihofen et al, 2002).

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei SPP um eine Intramembran-Aspartylprotease vom GxGD Typ. Die bekannten Substrate von SPP sind Polypeptide mit einer einzigen Transmembrandomäne in Typ II Orientierung.

Aus energetischen Gründen nehmen Transmembrandomänen eine α -helikale Konformation an. Die Substrate von SPP enthalten in ihrer Transmembrandomäne zusätzlich Helix destabilisierende Aminosäuren („helix-break-helix structure“). Hierdurch wird die Hydrolyse erleichtert (Lemberg & Martoglio, 2002; Urban & Freeman, 2003; Ye et al, 2000). Im Unterschied zu vielen klassischen Proteasen gibt es jedoch keine spezifische Konsensus Sequenz, die von SPP erkannt wird. Wie bei der γ -Sekretase ist zwar das Verkürzen der Ektodomäne vermutlich erforderlich, bevor das Substrat weiter durch SPP prozessiert werden kann, aber ein Kofaktor, der ähnlich dem Nicastrin in der γ -Sekretase die Substratbindung überwacht (Esler et al, 2002; Shah et al, 2005), ist für SPP bislang nicht bekannt.

1.3.1 Signalsequenzen

Proteine, deren Bestimmungsort nicht das Zytosol ist, besitzen Signalsequenzen, die während der Synthese den weiteren Transportweg des Proteins bestimmen. Zum Transport an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums, lagert sich ein Signalerkennungspartikel (SRP) der Signalsequenz an. Dieser Komplex kann dann an Translokationsstellen im ER binden („targeting“). Nachdem die Proteine in die Membran eingefügt wurden, werden die Signalsequenzen von membranständigen Signalpeptidasen abgespalten (Abbildung 6) (Paetzel et al, 2002).

Signalsequenzen enthalten ein hydrophobes 6 bis 15 Aminosäuren langes Mittelstück (h-Region), welches für die Ziellenkung besonders wichtig ist. Am C-terminalen Ende schließt sich ein polares Stück (c-Region) an, das häufig helixbrechende Aminosäuren wie Glyzin und

Prolin, aber auch kleine ungeladene Aminosäuren an Position 1 und 3 enthält. Diese markieren die Schnittstelle der Signalpeptidase (Abbildung 7). Das N-terminale Ende bildet ebenfalls ein polares Stück (n-Region) aus Aminosäuren, die zusammengenommen meist eine positive Ladung tragen. Die Gesamtlänge der Signalsequenzen liegt zwischen 15 und 50 Aminosäuren, hierbei stellt die n-region den Teil mit der höchsten Variabilität dar (Bendtsen et al, 2004; von Heijne, 1985).

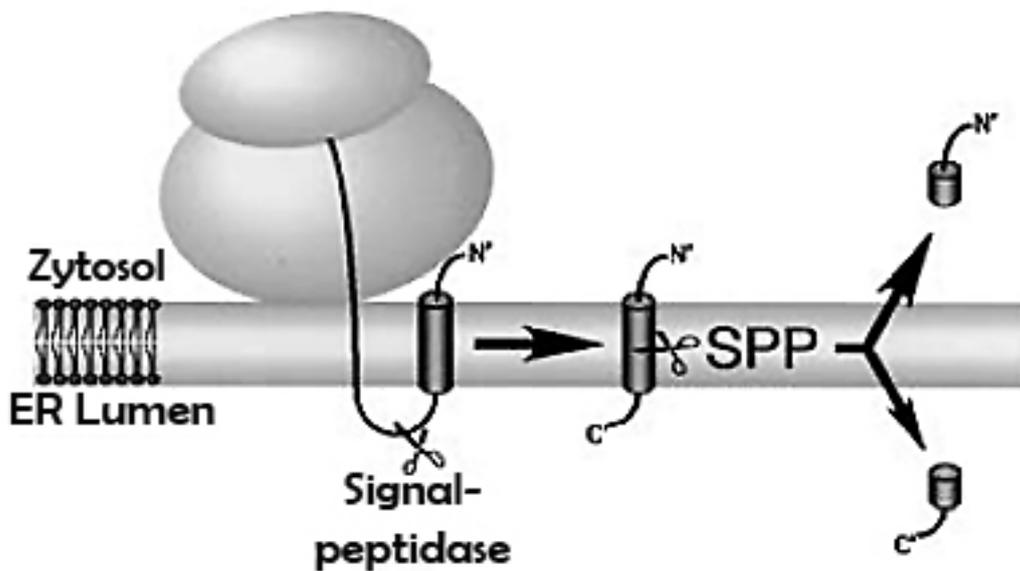


Abbildung 6: Die Signalsequenz des Präproteins wird nach Translokation durch die Signalpeptidase gespalten und durch SPP weiter prozessiert (modifiziert nach (Martoglio, 2003)).

Signalsequenzen			
N-	n	h	c
	MGVMAPRT	LLLLLAAALA	PTQTRA ... HLA-A
	MDSKGSSQKGSR	LLLLLVVSNLLL	CQGVVS ... Prolactin
		SPPase ↑	SPase ↑

Abbildung 7: Signalsequenzen von HLA-A und Präprolaktin, die Pfeile markieren die Schnittstellen der Signalpeptidase, bzw. von SPP.

Neben der „helix-break-helix“ Struktur der Signalsequenz, die erforderlich ist, um einen SPP Schnitt zu ermöglichen, gibt es weitere Faktoren, die die Effizienz des Substratumsatzes beeinflussen. Ein bis zwei positiv geladene Aminosäuren, wie z.B. Arginin in der c-Region

vermindern beispielsweise die Aktivität von SPP (Lemberg & Martoglio, 2002; Lemberg & Martoglio, 2004).

1.3.2 SPP Spaltprodukte - mehr als nur Abbauprodukte

Signalsequenzen, die sich in der Zellmembran von Bakterien ansammeln, werden durch die membranständige Protease IV abgebaut. Dieses zu SPP nicht sequenzhomologe Enzym hat die Aufgabe, die Lipiddoppelschicht von nicht mehr benötigten Signalsequenzen zu „säubern“. Im Gegensatz dazu sind einige Spaltprodukte der SPP nicht nur Abbauprodukte, sondern Bestandteile weiterer Regelkreise. Durch diese „posttargeting“ Funktion der Signalsequenzen ist SPP, wie auch viele andere Mitglieder der I-CLiP Familie, an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt.

1.3.2.1 Präsentation von Signalpeptid Fragmenten

auf MHC Klasse I Molekülen

Die klassischen MHC Klasse Ia Rezeptoren HLA-A, -B und -C binden Peptide, von pathogenen und zellulären Proteinen und präsentieren diese an der Zelloberfläche zytotoxischer T-Zellen. Die präsentierten Peptide stammen größtenteils von zytosolischen Proteinen, die im Proteasom abgebaut wurden und über den Transporter für Antigenpräsentation (TAP) ins ER Lumen gelangt sind (Abbildung 8). Aber auch Fragmente von Signalpeptiden werden an die MHC Klasse I Rezeptoren gebunden. Dabei gelangen Fragmente, die sich von der h- und c-Region der Signalsequenz ableiten und direkt ins ER-Lumen abgegeben werden, direkt an die Rezeptorbindungsstellen, während die Präsentation von Fragmenten der h- und n-Region langer Signalsequenzen vom TAP Mechanismus abhängig ist.

Besonders interessant ist die Rolle der MHC Klasse Ib Rezeptoren HLA-E. Diese überwachen die Anwesenheit der klassischen MHC Ia Moleküle, indem sie die hoch konservierten Signalpeptid Fragmente der HLA-A, -B und -C Signalsequenzen (VMAPRTLTL) natürlichen Killerzellen (NK) präsentieren. Natürliche Killerzellen zerstören Zellen, denen es nicht gelingt, für MHC Klasse I spezifische Rezeptoren, der NKs zu aktivieren. NKs verfügen über zwei Typen solcher Rezeptoren, den „killer cell inhibitory Rezeptor“ (KIR), der durch MHC Klasse Ia Moleküle aktiviert wird und das CD94-NKG2 Heterodimer, das durch Wechselwirkung mit beladenen HLA-E Rezeptoren aktiviert wird (Braud et al, 1997; Braud et al, 1998a; Braud et al, 1998b). Die Spaltung der HLA-A, -B und -C Signalsequenzen durch SPP ist ein essentieller Schritt bei der Herstellung der HLA-E Epitope (Lemberg et al, 2001).

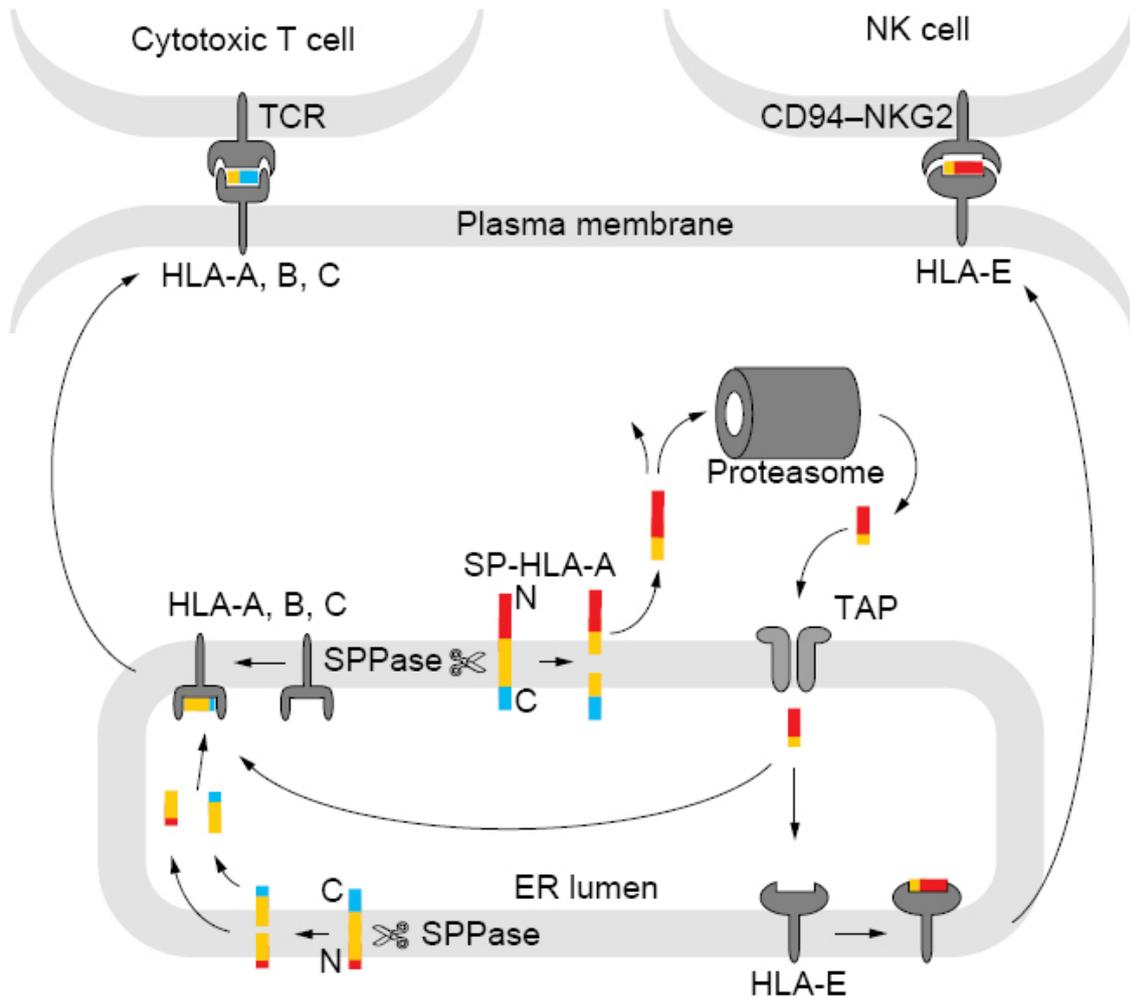


Abbildung 8: Modell der Präsentation von Signalpeptid Fragmenten durch MHC Klasse I Rezeptoren. Ein an den HLA-E Rezeptor gebundenes Signalpeptid Fragment von HLA-A (SP-HLA-A) aktiviert den inhibitorischen NK Rezeptor CD94-NK2 (Martoglio & Dobberstein, 1998).

1.3.2.2 Fragmente der Präprolaktin Signalsequenz inhibieren Calmodulin

Die Signalsequenz von Präprolaktin hat eine für Signalpeptide ungewöhnlich lange n-Region. Das Signalpeptid wird, nachdem es durch die Signalpeptidase abgespalten wurde durch SPP weiterprozessiert. Das dabei entstandene N-terminale Fragment gelangt ins Zytosol und kann dort eine basisch amphipathische α -Helix bilden. Moleküle mit dieser Struktureigenschaft können von Calmodulin erkannt und gebunden werden (O'Neil & DeGrado, 1990). Calmodulin ist ein Calcium bindendes Protein, das an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen und insbesondere an der Neurotransmitter Synthese und Freisetzung beteiligt ist. *In vitro* wirkt das Fragment des Präprolaktin Signalpeptids inhibitorisch auf Calmodulin abhängige Prozesse (Martoglio et al, 1997).

1.3.2.3 Funktion der SPP bei der Pestivirus und Hepatitis C Virus Replikation

Für die Replikation des Pestivirus und des Hepatitis C Virus ist die Funktion der wirtseigenen SPP erforderlich. Das Genom des Hepatitis C Virus besteht aus einem positiv orientierten einzelsträngigen RNA Molekül, das für ein einziges Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren Länge kodiert. Im N-terminalen Drittel sind die Strukturkomponenten des Virions, ein Nukleoprotein (core) und zwei Hüllen-Glykoproteine (E1, E2) kodiert. Eine Signalsequenz zwischen core und E1 leitet das Polyprotein an die ER Membran und ermöglicht die Translokation von E1 in das ER Lumen. E1 wird durch einen Schnitt der Signalpeptidase von der ER Membran abgelöst. Das in der Membran verankerte core Protein wird daraufhin von SPP geschnitten. Dies ist ein essentieller Schritt in der Genese des Hepatitis C Virus (McLauchlan et al, 2002; Targett-Adams et al, 2008).

In ähnlicher Weise wird auch das core Protein des Pestivirus durch SPP von der Membran gelöst. Wird die Funktion der SPP durch einen Inhibitor beeinträchtigt, so wird die Prozessierung des C-terminalen core Proteins blockiert und die Virusgenese stark beeinträchtigt (Heimann et al, 2006).

1.4 Substrate von SPPL2a und SPPL2b¹

Bei den meisten bekannten Substraten, die regulierter Intramembran Proteolyse unterliegen und deren Spaltprodukte an intrazellulären Regelkreisen beteiligt sind, wie beispielsweise der Notch Rezeptor, handelt es sich um Typ I Membran Proteine. Es wurde die Vermutung angestellt, dass auch Rezeptorliganden entgegengesetzter Membranorientierung, wie zum Beispiel Mitglieder der TNF Familie, in reverse Signaltransduktionskreise eingebunden sein können (Eissner et al, 2004). Die Kenntnis der Lokalisation von SPPL2a/b und der Substratanforderung der SPP legten nahe, dass SPPL2a/b Typ II TM Proteine in der Membran spalten können.

Fluhrer et al. konnten zeigen, dass SPPL2b TNF α mehrfach innerhalb seiner TMD spaltet (Abbildung 9) (Fluhrer et al, 2006; Fluhrer & Haass, 2007). Die TNF α Spaltung wird sowohl durch den SPP/SPPL spezifischen Inhibitor (Z-LL)₂-Ketone als auch durch die Überexpression einer SPPL2b Aspartylmutante vermindert, ein weiterer Beleg für die Aspartylprotease Aktivität von SPPL2b.

¹ Die wissenschaftlichen Ergebnisse dieses Abschnitts wurden im Wesentlichen erst nach dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit veröffentlicht.

Das intrazelluläre Fragment von TNF α (TNF α -ICD) löst die Transkription des Interleukins IL-12 in dendritischen Zellen aus und übernimmt damit eine wichtige Funktion in der Regulation der adaptiven Immunabwehr (Friedmann et al, 2006; Fujii et al, 2004; Ma, 2001; Trinchieri et al, 2003). Die Freisetzung von TNF α -ICD in reifen dendritischen Zellen erfolgt in Abhängigkeit von SPPL2a/b (Fluhrer et al, 2006; Friedmann et al, 2006).

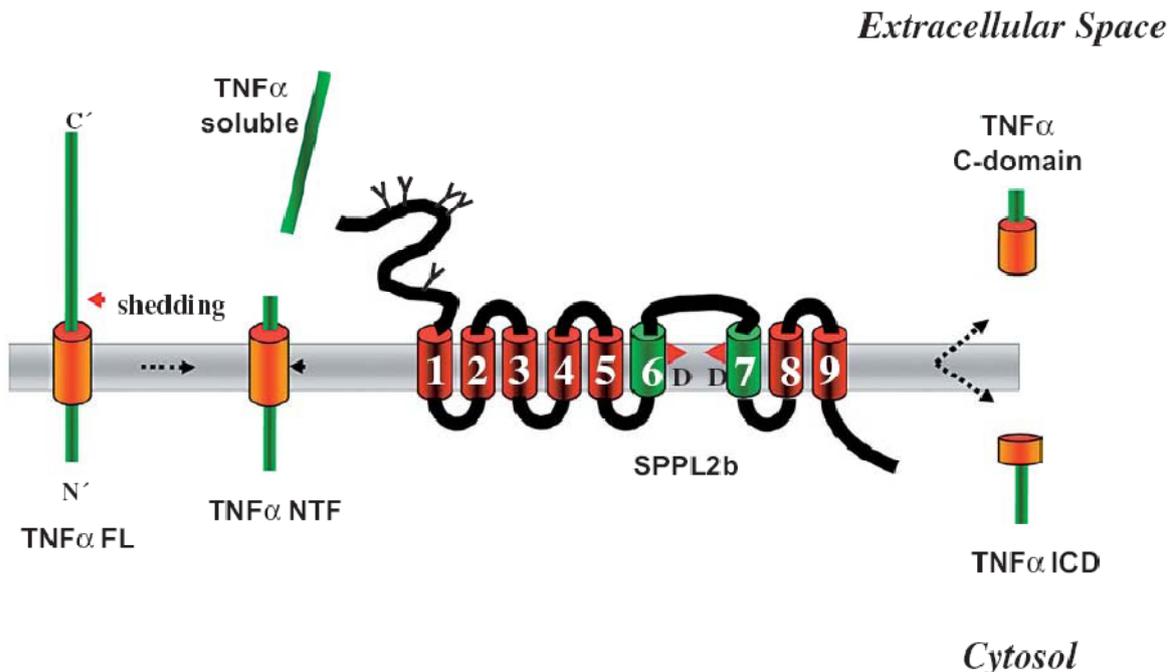


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Prozessierung von TNF α durch SPPL2b (Fluhrer & Haass, 2007)

1.5 Ziel der Arbeit

Die bekannten GxGD-Intramembran-Aspartylproteasen Presenilin und SPP sind in wichtige physiologische Regelkreise eingebunden und spielen darüber hinaus bei den beschriebenen Erkrankungen eine bedeutende Rolle. Für die zu SPP sequenzhomologen Proteine SPPL2a/b/c und SPPL3 gilt es zum einen zu klären, ob es sich auch bei ihnen um Intramembran-Aspartylproteasen handelt. Zum anderen gilt es, ihre physiologische Funktion aufzuklären. Die Kenntnis des genauen Proteolysemechanismus ist erforderlich, um gezielt selektive Inhibitorsubstanzen entwickeln zu können. Das Wissen um die biologische Funktion der Proteine hingegen ist wichtig, um Nebenwirkungen durch Kreuzreaktionen abschätzen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Fragestellungen bearbeitet.

- Können im Zebrafisch Genom homologe Gene zur humanen SPP Familie identifiziert werden?

Im humanen Genom wurden die fünf Mitglieder der SPP Familie, SPP, SPPL2a/b/c und SPPL3 über Homologievergleiche identifiziert. Alle Mitglieder dieser Familie verfügen über die Aminosäure Sequenzmotive YD und GxGD. Das Zebrafischgenom soll in einer Datenbank Analyse auf zu den humanen Sequenzen homologe Gene untersucht werden.

- Wo und wann werden SPP und deren homologe Gene während der Embryonalentwicklung des Zebrafisches exprimiert?

Die Expression der im Zebrafischgenom identifizierten Transkripte soll in unterschiedlichen Stadien der Zebrafisch Embryonalentwicklung mittels *in situ* Hybridisierung untersucht werden. Ein charakteristisches Expressionsmuster kann Aufschluss darüber geben in welchen Geweben und welchen Entwicklungsstadien die untersuchten Gene von Bedeutung sind.

- Wie wirkt sich eine Unterdrückung der Translation (knock down) dieser Gene auf die Embryonalentwicklung aus?

Die Expression der identifizierten Gene soll durch Injektion komplementärer Oligopeptidonukleotide unterdrückt werden. Der Effekt der verminderten Genexpression auf den Phänotyp soll untersucht und charakterisiert werden.

- Wie wirkt sich die künstliche Überexpression durch Injektion von Wildtyp mRNA auf die Embryonalentwicklung aus? Welche Auswirkung hat die Injektion von modifizierten mRNA Konstrukten?

Kennzeichnendes Merkmal aller Mitglieder der SPP-Familie ist ein Aspartylrest, eingebunden in ein hochkonserviertes GxGD Motiv. Dieser Aspartylrest ist notwendig für die katalytische Aktivität von SPP/SPPL. Es soll untersucht werden, inwieweit die Überexpression von Wildtyp mRNA bzw. von mRNA Konstrukten, die eine Mutation des konservierten Aspartylrestes tragen, die Embryonalentwicklung beeinflussen.

- Binden spezifische Aspartylprotease Inhibitoren auch an Homologe der SPP?

Spezifische, den Substratübergangszustand simulierende Aspartylprotease Inhibitoren binden an das aktive Zentrum der SPP und blockieren dessen enzymatische Funktion. Es soll untersucht werden, ob diese Inhibitoren auch die SPP Homologen binden können und ob sich ein SPPL/Inhibitor Komplex isolieren lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Molekularbiologie

Geräte/Materialien	Firma
37 °C Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products
Drucker Geldokumentationsanlage	Mitsubishi
Elektrophoresekammern	OwlSeparation Systems, Inc.
Geldokumentationsanlage	Intas GmbH
Hybridisierungssofen (Hybridiser HB-1D)	Techne Cambridge
Kamera (CCD Video Camera Module)	MS Laborgeräte
Mikrowelle	Alaska
PCR Maschine (Mastercycler)	Eppendorf
Schüttelinkubator (Cortomat BS-1)	B. Braun Biotech International
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus

2.1.2 Zellkultur

Geräte/Materialien	Firma
-80 °C Gefrierschrank	Heraeus
Bunsenbrenner	Heraeus
Deckgläser	Menzel-Gläser
Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegpipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarsted
Einweg-PP-Röhrchen steril (15 ml, 50 ml)	Sarsted
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Leica DMRB
Glasplättchen (ø 10 mm)	Marienfeld
Objektträger	Menzelgläser
Pasteurpipetten	Volac
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments
Wasserbad	GFL
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zell-Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products
Zellkulturschalen (24 Well, 6 cm, 10 cm)	Nunc
Zellschaber	Corning Incorporated
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus Instruments

2.1.3 Proteinbiochemie

Geräte/Materialien	Firma
Filme Super RX	Fuji
Filmentwicklungsgerät	Agfa

Gefrierschrank (Arktis)	AEG
Gel-Blottingpapier (Whatmanpapier)	Schleicher & Schuell
Gelkammer	Biorad
Heizblöcke	Stuart Scientific, NeoLab
Kühlschrank (Santo)	AEG
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
Magnetrührer	Roth
pH-Elektrode	Schott
PhosphoImager	Nunc
Photometer	Tecom Spectra
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt
Röntgenfilme (Super RX)	Fuji
Scanner	Hewlett Packard
Sonifier (Cell Disrupter B 15)	Branson
Spannungsquelle	Biorad
Thermomixer kompakt	Eppendorf
Transferkammer	BioRad
Überkolschüttler (Reax2)	Heidolph
Ultrazentrifuge (Optima LE 80K Rotor TLA-55)	Beckmann
Vortex VF2	IKA-Labortechnik
Wasserbad	GFL
Zentrifuge (Avanti J-20 XP)	Beckman

2.1.4 Fischerarbeiten

Geräte/Materialien	Firma
Fischanlage	Schwarz
Mikroinjektor (Femtojet)	Eppendorf
Mikroskop (Axioplan 2)	Zeiss
Nadelzieher (DMZ)	Zeitz Instrumente
Waage (BP 3100S)	Sartorius

2.2 Chemikalien und Lösungen

2.2.1 Molekularbiologie

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
10 x TBE Puffer	890 mM Tris HCl 890 mM Borsäure 20 mM Na EDTA	
1kB-DNA-Leiter		Fermentas
5 x Ladepuffer	Glyzerin 50 % 50 mM Na EDTA (pH 8,0) Bromphenolblau 0,05 %	
Agarose		Amersham Biosciences

Ampizillin		Roth
Ampizillin Stammlösung	100 mg/ml Ampizillin in H ₂ O (steril filtriert)	
CIP (Chloroform/Isoamylalkohol/Phenol)	(v:v:v) = (24:1:25)	
DEPC behandeltes H₂O		Ambion
DNA Probenpuffer	30 % (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA, 0,05 % Orange G in dH ₂ O	
DNA T4 Ligase (5 U/μl)		Roche
DNA T4 Ligase Puffer (10 x)	Tris HCl (pH 7,8) 400 mM, Mg ₂ Cl 100 mM, DTT 100 mM ATP 5 mM	
dNTP (10 mM)		Roche
Glycerinlösung	50 % (w/v) Glycerin in dH ₂ O	
Kanamycin		Roth
Kanamycin	50 mg/ml Kanamycin in H ₂ O (steril filtriert)	
LB-Medium (Lysogeny Broth Medium)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl pH 7,0	
LB-Medium mit Ampizillin oder Kanamycin	LB-Medium, 100 μg/ml Ampizillin, 50 μg/ml Kanamycin	
mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit		Ambion
Mutagenese-Primer		Metabion
NucleoSpin Extract Kit		Machery Nagel
NucleoSpin Plasmid		Machery Nagel
NucleoTrap mRNA		Machery Nagel
Oligonukleotide		Invitrogen
P1 Resuspensionspuffer	50 mM Glukose 25 mM Tris HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)	
P2 Lysispuffer	200 mM NaOH 1 % SDS	
P3 Neutralisationspuffer	5 M K Acetat mit 5 M Eisessig auf pH 5,0 einstellen	
Poly(A) Tailing Kit		Ambion
pwo-Polymerase		Roche
Pwo-Polymerase (1 U/μl)		PeqLab
Quick Spin Säulen		Roche
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit		Stratagene
Restriktionsenzyme	10 U/μl	Invitrogen, MBI Fermentas, New England Biolabs
Sequenzanalyse		Vector NTI Invitrogen

SOB-Medium (Super Optimal Broth)	20 g Trypton 5g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 2,5 mM KCl, ad 1 l H ₂ O (autoklavieren)	
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR		Invitrogen
TAE Puffer (50x)	2 M Tris, 1 M CH ₂ COOH, 50 mM EDTA	
taq-Polymerase		Roche
TB Puffer	10 mM Hepes, 15 mM Ca ₂ Cl x 2 H ₂ O, 250mM KCl, pH-Wert 6,7 mit KOH einstellen, 55 mM MnCl ₂ x 2H ₂ O, steril filtrieren	
TE Puffer	10 mM Tris HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA HCl (pH 8,0)	

2.2.2 Zellkultur

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Dimethylsulfoxid (DSMO)		Roth
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose	Gibco
Doxyzyklin		Roth
Einfriermedium	FCS mit 5 % DMSO	
FCS (Fetal Calf Serum)		Gibco
Grundmedium	DMEM 10 % FCS, 50 U/ml Penizillin 50 µl/ml Streptomycin	
HEPES		Invitrogen
Minimalmedium	DMEM + 0,1 % BSA	
PBS (Phosphat buffered Saline)	140mM NaCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 1,75mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit HCl eingestellt in dH ₂ O autoklaviert	
Trypsin-Lösung	0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA * 4 Na in Hanks	Gibco

2.2.3 Proteinbiochemie

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
1 x Anodenpuffer	0,2 M Tris in dH ₂ O, pH mit HCl auf 8,9 eingestellt	
1 x Kathodenpuffer	0,1 M Tris-HCl,	

	0,1 M Tricine 0,1 % (w/v) SDS in dH ₂ O	
10 x TBST	100 mM Tris HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 0,5 % Tween-20	
4 x SDS Probenpuffer	Für 10ml: 4ml 20% (v/v) Glycerin, 4 ml 20% (w/v) SDS 1 ml β -Mercaptoethanol, 1,25 ml 1M Tris pH 6,8, 10 µl 10 % Bromphenolblau	
Acrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid-BIS-Acrylamid in dH ₂ O	Q-BioGene
Acrylamidlösung für Tris-Tricin-Gele	48g Acrylamid 1,5g Bisacrylamid ad 100ml dH ₂ O	
Alkalische Phosphatase-Substrat	1 Tablette in 1 ml H ₂ O lösen, 1:500 einsetzen	Roche
Ammoniumchlorid-Lösung	50 mM NH ₄ Cl in PBS	
APS (Ammonium-Persulfat)	10 % Stammlösung in H ₂ O	
Biotinlösung (EZ-Link Sulfo NHS-SS-Biotin)	0,5 mg/ml in PBS-Puffer	Pierce
Blockpuffer für Western Blot	5 % Milchpulver in PBST	
Blockreagenz für Immunfluoreszenz	2% BSA, 2% FCS, 0,2% Gelatin gelöst in PBS	
BSA (Bovine Serum Albumin)		Uptima, Interchim
CHAPSO	3-[(3-cholamindopropyl)dimethylamino]-2-hydroxy-1-propanesulphonat	
CHAPSO Puffer	1 % CHAPSO (pH 6,4) 150 mM NaCitrat Protease Inhibitor 1 Tab/10ml	
Coomassie-Blue-Färbelösung	50 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,5% (w/v) Coomassie-Blue-R in dH ₂ O	
DABCO		Sigma
ECL Detektionsreagenz		Amersham Biosciences
ECL plus Detektionsreagenz	Chemiluminiszenzreagenz A und B Verhältnis (1:40)	Amersham Biosciences
Eindeckellösung	15% Moviol, 50mg/ml DABCO in dH ₂ O	
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glyzin, 0,1 % SDS in dH ₂ O	
Elutionspuffer	8 M Harnstoff in dH ₂ O	
Entfärbelösung	5% (v/v) Isopropanol, 7% (v/v) Eisessig	
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd, 4 % Saccharose in PBS-Puffer	
Gelpuffer	3 M Tris-HCl pH 8,45 0,3 % SDS in dH ₂ O	
Glycinlösung	20 mM Glycin in PBS-Puffer	
Glyzerollösung	32 % (v/v) Glycerol in dH ₂ O	
Hybridisierungslösung		BD Biosciences

IPTG		Roth
(Isopropyl-β-D-thiogalactosid)		
L1 Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 1 % NP-40 2 mM EDTA	
L2 Lysepuffer	10 mM HEPES (pH 7,4) 1 mM EDTA 0,25 mM Saccharose	
Lysozymlösung	10 mg/ml Lysozym in 25 mM Tris, pH 8,0	Merck
Magermilchpulver		Frema
NH₄CL (50mM)		Merck
Nitrozellulose		Schleicher & Schuell
Transfermembran		
Paraformaldehyd		J.T. Baker
PBST	PBS-Puffer 0,05 % Tween-20	
Peroxidase gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1mg/ml)		Promega
Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgG (1mg/ml)		Promega
pNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat)	5 mg/ml pNPP in Substratpuffer	Sigma
Primärantikörper	0,25 % (w/v) BSA, 0,05 % Natriumazid Antikörper in PBST	
Proteaseinhibitor (PI) Complete	1 Tablette in 1ml H ₂ O lösen, 1:500 einsetzen	Roche
Protein-Assay-Kit (Bradford-Reagenz)		Biorad
Proteinmarker		Invitrogen
Saccharose		Merck
Sammelgel-Puffer (High Tris Buffer)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O	
SDS	10% (w/v) SDS in dH ₂ O	
Sekundärantikörper	0,25% (w/v) BSA Antikörper in PBST	
SPP Inhibitor Merck A, C		Merck
STEN		Biorad
STEN-NaCl		Invitrogen
STEN-SDS		Merck
Streptavidin Dynabeads		Invitrogen
Streptavidin Sepharose High Performance	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O	
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)		
Transferpuffer	25 mM Tris HCl , 200 mM Glyzin	
Trenngel-Puffer (Low Tris Buffer)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O	
Tricin (N-Tris-(Hydroxy-Methyl)-Methylglycin)		Biomol
Tris (Tris (Hydroxy-Methyl) Aminomethan)		Biomol
Triton X-100		Merck
Triton-Lösung	0,2 % Triton X-100 in PBS	
Tween-20		Merck

β -Mercaptoethanol	Merck
---------------------------	-------

2.2.4 Antikörper

Bezeichnung	Zielprotein	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Digoxigenin-AP	Digoxigenin	1:2000	Roche
Anti-mouse-HRP	Maus IgG	1:1000	Promega
Anti-myc 9E10	Myc	1:5000	Hybridoma Bank

2.2.5 Fischerarbeiten

20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	
Acridine Orange		Ambion
BCIP Stock	50 mg/ml in Dimethylformamid	
Chemikalien/Lösungen	Zusammensetzung	Firma
DIG RNA labeling Kit (Digoxigenin)		Roche
DIG RNA labeling Kit (SP6/T7)		Roche
Digoxigenin detection Kit		Roche
Embryo Medium E3	5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl ₂ , 0,33 mM MgSO ₄	
GripNA (Peptid Nuklein Säuren)		Active Motif
HYP	Formamid 50%, 5x SSC, 0,1 % Tween-20, 50µg/ml Heparin, 0,5 mg/ml torulaRNA, Levamisol 1 mM	
In Situ Cell Death Detection Kit TMRred		Roche
Levamisol		Sigma
Lidocain		Sigma
NBT Stock	75 mg/ml in Dimethylformamid	
NCST	10 % NCS, 0,1 % Tween-20, 1 % DMSO, 88,9 % PBS	
SSCT	SSC plus 0,1 % Tween	
Staining Puffer	100 mM Tris HCl (pH 9,5), 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, 1 mM Levamisol	
TUNEL staining Kit		Roche

2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

Der E.coli Stamm DH5 α wurde aus Stammsammlungen des Labors entnommen und der Stamm Top10 wurde von Invitrogen bezogen.

Die Ziellinien HEK293, transfiziert mit humanem SPPL2b-myc-His, und HEK293 TR, transfiziert mit humanem SPP-myc-His und humanem SPPL3-myc-His, wurden freundlicherweise von Dr. Haffner zur Verfügung gestellt.

Die Tierversuche wurden an Zebrafischen der Stämme AB, Tübingen, Tübingen long fin und WIK durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Vektoren

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Vektoren.

Angegeben sind Bezeichnung und Herkunft. Zielorganismus ist E.coli. Die Sequenzen und Vektorkarten sind unter <http://image.llnl.gov/image/html/vectors.shtml> zu finden.

Bezeichnung	Bezugsquelle
pCRbluntII-Topo	Invitrogen
pCS2+	D. Turner und R. Rupp
pME18S-FL3	S. Sugano
pSPORT1	Invitrogen
Zero Blunt TOPO PCR	Invitrogen

2.4.2 DNA Konstrukte

Tabelle 2: Übersicht der hergestellten DNA Konstrukte

Angegeben ist die Bezeichnung des Konstruktes, der Zielvektor, sowie die Herkunft des Plasmids, bzw. Die Restriktionsenzyme, mit denen die gewünschte DNA-Sequenz in den Vektor eingefügt wurde.

Bezeichnung	Vektor	Klonierungsenzyme
hSPP	pSPORT1	Erhalten von Dr. C. Haffner
hSPP	pCS2+	HindIII, EcoR1
hSPPL2b	pSPORT1	Erhalten von Dr. C. Haffner
hSPPL2b	pCS2+	EcoR1, NotI
hSPPL3	pME18S-FL3	Erhalten von Dr. C. Haffner
hSPPL3	pCS2+	XbaI, NotI
zSPP	pME18S-FL3	RZPD
zSPP	pCS2+	EcoR1, XbaI
zSPPL2	pME18S-FL3	RZPD
zSPPL2	pCS2+	EcoR1, XbaI
zSPPL3	pME18S-FL3	RZPD

zSPPL3	pCS2+	EcoRI, XbaI
zSPP_D268A	pCS2+	EcoRI, XbaI
zSPPL2_D422A	pCS2+	EcoRI, XbaI
zSPPL3_D272A	pCS2+	EcoRI, XbaI

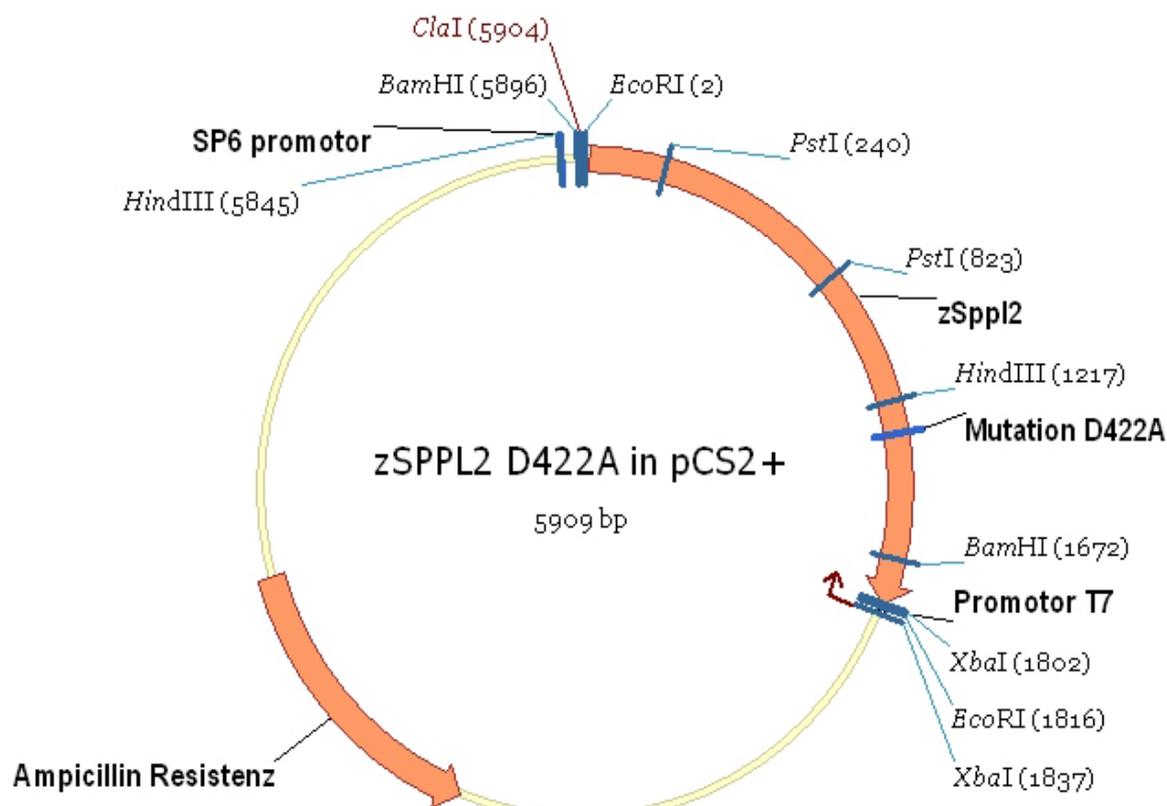


Abbildung 10: Vektor mit enthaltenem DNA-Konstrukt.

Gezeigt ist exemplarisch das Mutationskonstrukt zSPPL2_D422A in pCS2+ mit ausgewählten Restriktionsenzymststellen.

2.4.3 Rekombinante DNA-Techniken

2.4.3.1 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 3: Oligonukleotide, die für Sequenzierreaktionen, Klonierungen und Mutagenese verwendet wurden.

Konstrukt	Oligonukleotid-Sequenzen (5'-3')
zspp_E1_f	gatttggttaaaccgggactgcg
zspp_E2_f	agaccatcaccagcagagatg
zspp_E3_f	gtgctgggaatattagcgctg
zspp_pos_contr_f	gcagagttttccctgctaacc
zspp_E4_r	cagggctcaggagaaagcaaa
zspp_E6_r	ctgttgggaggactcttcggt

zsppl2_E2_f	ggctcatttcagcgattggg
zsppl2_E4_f	cccagtatgaggagattggc
zsppl2_E6_f	gctacatgaagcacaagagg
zsppl2_E12_r	gcccagggttaaattcgtctcc
zsppl2_E15_r	ccggcaacctctgaaaccaa
zsppl3_E4_f	agaccatagactccacacagg
zsppl3_E5_f	Gatgtgccagtatctgaccag
zsppl3_E6_f	tcatgctggttctcatctggg
zsppl3_pos_contr_f	gtctctgctggctatgattg
zsppl3_E7a_r	ccggcaagttggtggttctcta
zsppl3_E7b_r	gctgtgtttctgtgctgcgata
SP6_pCS2+	ccaagcttgatttaggtgac
T7_pCS2+	aatacgactcactatag
zspp_F1_EcoR1	ggaattccgatatctaagcctatcccggtaa
zspp_R1_Xba1	gctctagagcgcaaacatgaatgagggctgatttggg
zsppl2_F1_EcoR1	ggaattcctactgggagccggagggcag
zsppl2_R1_Xba1	gctctagagattacatatacagtcacatgtataaccgac
zsppl3_F1_EcoR1	ggaattcctttgagccgaactcgagtcctcag
zsppl3_R1_Xba1	gctctagagctttctctggtaagttcgggaggt
zspp_D268A	gctgggactcggggccattgttattccagg
zspp_D268A_antisense	cctggaataacaatggccccgagtcccagc
zsppl2_D422A	cttcttggtcttgggtgctatcttgggtgccagg
zsppl2_D422A_antisense	cctggcaccaagatagcaccxaaagccaagaag
zsppl3_D272A	ctgggcatcggcgctatcgtcatgccag
zsppl3_D272A_antisense	ctggcatgacgatagcgccgatgccag

2.4.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion beschreibt die enzymatische Amplifikation von DNA-Abschnitten unter Verwendung spezifischer Polymerisationsstarter (Primer) und thermostabiler taq-Polymerase (Mullis & Faloona, 1987). Ein typischer Ansatz mit cDNA, Plasmid DNA oder genomischer DNA als Template sah folgendermaßen aus:

DNA Template	1 µl (ca. 1 µg/µl)
10x Puffer des Herstellers	5 µl
sense Primer	20 pmol
antisense Primer	20 pmol
dNTP Mix	1 µl (=200 µM Endkonzentration pro Nukleotid)
taq, pwo oder pfu	2,5-5 U
H ₂ O	ad 50 µl

Die Wahl der Primer ist entscheidend für die Effizienz der PCR, es wurde dabei auf folgendes geachtet: Die Schmelzpunkte sollten möglichst ähnlich sein. Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu minimieren wurden Primer ohne in sich komplementäre Sequenzen gewählt. Wenn möglich sollten die Primer auf G/C enden. Die Hybridisierung wurde meist 1-3 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer durchgeführt. Einige Reaktionen können durch Zusatz von DMSO und Glycerin und Variation in der Mg^{2+} -Konzentration im Puffer optimiert werden.

Ein Standard PCR-Protokoll war:

1 Zyklus	Denaturierung	94 °C	7 min
20-40 Zyklen	Denaturierung	94 °C	1 min
	Hybridisierung	48-80 °C	1 min/1000bp
	Elongation	72 °C	1 min
1 Zyklus	Elongation	72 °C	10 min

2.4.3.3 PCR-Mutagenese

Punktmutationen wurden gemäß dem „QuikChange Site-directed Mutagenesis“ Protokoll von Stratagene eingeführt (Abbildung 11). Es wurde dabei mit der proof reading DNA Polymerase *pfu*, doppelsträngiger Plasmid DNA und Mutagenese Primern eine PCR durchgeführt. Die Mutageneseprimer sind basenkomplementär zu zwei gegenüberliegenden Strängen des Vektors zu wählen und enthalten an den entsprechenden Stellen die Mutationen. Die Schmelztemperatur der Primer liegt bei ca. 80 °C. 5' und 3' zur mutierten Base liegen mindestens 10 bis 15 Basen. Nach der Extension liegt eine Einzelstrang DNA des Gens und des Vektors vor, der entweder mit dem forward bzw. dem reverse Mutationsprimer beginnt.

Anschließend wird die methylierte, parenterale Plasmid DNA mit *Dpn I*, das hinter der Erkennungssequenz 5'-Gm⁶ATC-3' schneidet, verdaut. Die daraufhin hybridisierten, mutierten Einzelstränge werden in superkompetente E.coli transformiert. Nach der Transformation werden die noch offenen Enden zwischen Primer Anfang und Transkriptende in den Zellen ligiert.

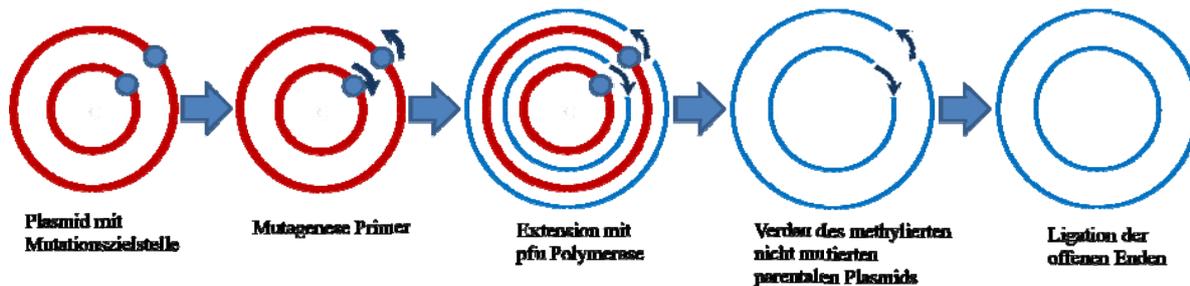


Abbildung 11: Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese Methode.

2.4.3.4 Aufreinigung und Analyse der DNA

2.4.3.4.1 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurden Agarose Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TBE Puffer gelöst und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Der Agarose Gewichtsanteil wurde hierbei je nach zu erwartender Bandenlänge zwischen 1 und 2 Prozent gewählt. Nach Abkühlen auf unter 60 °C wurde Ethidiumbromid (EtBr) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und die Lösung anschließend in Form gegossen. Die DNA-Proben wurden mit fünffach Ladepuffer vermisch. Der Ladepuffer enthält einen Farbstoff, der das Einfüllen erleichtert und Glycerin, welches aufgrund seiner höheren Dichte die Proben schnell in die Taschen absinken lässt. In die Taschen des erstarrten Gels wurden die DNA Proben pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 5-10 V/cm Elektrodenabstand in 1 x TBE-Puffer. Das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde mit UV-Licht bei 366 nm zur Fluoreszenz angeregt. Als Längenmarker wurden die 1 kb und 100 kb Leiter von Fermentas verwendet.

Für Klonierungen wurden die entsprechenden Fragmente unter UV-Licht Kontrolle mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract Kit von Machery Nagel entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert.

2.4.3.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur weiteren Aufreinigung wurde die DNA-haltige wässrige Lösung mit gleichem Volumen CIP gemischt. Nach 2 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm trennen sich wässrige und organische Phase. Die wässrige Phase, in der sich die DNA befindet, wurde vorsichtig abpipettiert und wiederholt mit CIP gemischt bis die Interphase klar war (das Abnehmen der wässrigen Phase wird in speziellen Eppendorf Reaktionsgefäßen, die über eine Gelschicht verfügen, die sich zwischen wässrige und organische Phase legt, erheblich vereinfacht). Anschließend wurde zu der wässrigen DNA-Phase 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH=5,2)

und 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol (100 %) hinzu gegeben und eine halbe Stunde bei -80 °C präzipitiert. Schließlich wurde die DNA abzentrifugiert und mit Ethanol (70 %) gewaschen.

2.4.3.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt. Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ 50 µg/ml dsDNA und 40 µg/ml ssRNA

2.4.3.4.4 DNA Sequenzierung

Die erzeugten Plasmid Sequenzen, sowie die Spleißvarianten wurden von der Firma GATC Biotech nach dem Kettenabbruchverfahren mit Fluoreszenz markierten Didesoxynukleotiden sequenziert. Zur Überprüfung der Sequenzen und zur Analyse der Restriktionsschnittstellen wurde das Programm Vector NTI verwendet.

2.4.3.5 *Enzymatische Modifikation der DNA*

2.4.3.5.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Aktivität der meisten Restriktionsenzyme wird an Lamda DNA oder an Adenovirus-2 DNA definiert: 1 U Enzym schneidet 1 µg der Referenz-DNA vollständig innerhalb einer Stunde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Für einen Einfachverdau berechnet sich die für 1 µg Plasmid benötigte Enzymmenge wie folgt: $(l_{ref} * n_{plasmid}) / (l_{plasmid} * n_{ref})$, wobei $l_{ref/plasmid}$ für die Länge der Referenz Sequenz bzw. des Plasmids in Basenpaaren steht und $n_{ref/plasmid}$ die jeweilige Anzahl der Schnittstellen angibt.

Bei einem Restriktionsverdau wurden 1-5 µg der Plasmid DNA bzw. des PCR-Produktes in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit etwa dem fünffachen Betrag der errechneten Enzymmenge in einem Endvolumen von 30 µl für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die DNA Fragmente unter Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits aufgereinigt.

2.4.3.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Vor der Ligation wurde der durch einfachen Restriktionsverdau linearisierte Vektor mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die alkalische Phosphatase spaltet freie 5'-Phosphatreste von den Nukleinsäuren ab, verhindert dadurch den intramolekularen Ringschluss und erhöht dadurch die Ligationseffizienz. Es wurden dazu 2-5 µg des linearisierten Plasmids im Ansatz des Restriktionsverdaus mit ca. 2 U/µg DNA und entsprechendem Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 75 °C Hitze inaktiviert.

2.4.3.5.3 Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Es wurden 200 ng des dephosphorylierten Vektors mit etwa dem dreifachem molaren Überschuss an DNA-Fragment in 20 µl Ansätzen mit 1U T4-DNA-Ligase 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle diente ein dephosphorylierter Religationsansatz des präparierten Vektors ohne DNA-Fragment.

2.4.3.6 Transformation und Plasmidpräparation

2.4.3.6.1 Herstellung transformationskompetenter E.coli

Zur Herstellung transformationskompetenter *Escherichia coli* wurden 100 ml SOB-Medium mit einer *E.coli DH5α*-Kolonie angeimpft und bei 37 °C und 700 upm ca. 12 h inkubiert. Die Bakterienkultur wurde anschließend mit SOB Medium in einem Volumen von 250 ml auf die OD 0,1 verdünnt und bei 18 °C und 250 upm für ca. 1 d inkubiert. Bei einer optischen Dichte der Bakterienkultur von 0,6 bis 0,8 wurde die Kultur auf 50 ml Falcon Gefäße aufgeteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 3500 upm und 4 °C über 20 min wurde das Pellet in 20 ml TB-Puffer gelöst und 1,5 ml DMSO (Endkonzentration 7 %) zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde erneut 10 min auf Eis inkubiert, anschließend zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.3.6.2 Transformation des Ligationsproduktes

Plasmid-DNA oder Ligationsansatz wurden in 1,5 ml Gefäßen vorgelegt und für 15 min mit 60 µl frisch aufgetauten, kompetenten Bakterien auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C über 60 s und anschließende erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz kann dieser Ansatz dann für 60 min in 0,5 ml LB-Medium bei 37 °C im Thermoblock geschüttelt werden. Anschließend wurde dieser Ansatz auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

2.4.3.6.3 Bakterienkultivierung

Die superhelikale Plasmid-DNA wurde in *E.coli* Bakterien vermehrt. Transformationsansätze wurden entweder mit dem Glasspatel oder mit sterilen Glaskugeln ausplattiert. Zum Vereinzeln von Bakterienkolonien wurden die Bakterien mit einer ausgeglühten Impföse auf Agarplatten ausgestrichen. Den Agarplatten wurde je nach Bedarf zur Selektion Ampizillin (100 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l) zugefügt. Die Platten wurden invertiert bei 37 °C bebrütet. LB-Medium für Flüssigkulturen wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit Bakterien beimpft und im Schüttler bei 200 U/min und 37 °C für 12 h - 16 h

bebrütet. Zur dauerhaften Lagerung wurden 0,5 ml Flüssigkultur mit 0,5 ml Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.4.3.6.4 Plasmidpräparation

Plasmid DNA wurde durch alkalische Lyse aus den Bakterien isoliert. 2 ml einer Bakterienflüssigkultur wurden kurz zentrifugiert (13.000 rpm, 2 min), das Bakterienpellet wurde in 100 µl kaltem P1 Puffer resuspendiert. Zur Lyse wurden 200 µl P2 Puffer zugegeben, die Lösung mehrmals durch leichtes Schütteln gemischt und nicht länger als 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl P3 Puffer wurde die Lösung neutralisiert, anschließend 1 s auf dem Vortexer durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert. Proteine und Zellwandanteile wurden abzentrifugiert (13.000 rpm, 2 min) und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Gefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis der Überstand klar war. Die DNA wurde in 900 µl 100 % Ethanol 10 min auf Eis präzipitiert und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min). Das DNA-Pellet wurde mit 900 µl 70 % Ethanol gewaschen (13.000 rpm, 5 min), luftgetrocknet und in 20 µl destilliertem Wasser oder TE Puffer gelöst.

Alternativ wurde zur Isolierung von Plasmid DNA auch NucleoSpin Plasmid Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank durchgeführt. Als Nährmedium wurde DMEM, angereichert mit 10 % FCS und entsprechenden Selektionsantibiotika verwendet. Die Zellen wurden in 10 cm Petrischalen im Brutschrank bei 37 °C und 5,0 % CO₂ inkubiert. Zum Passagieren wurde zuerst das Medium abgesaugt, die adhärenen Zellen vorsichtig mit PBS in der Petrischale gewaschen und dann für einige Minuten mit Trypsinlösung inkubiert, bis sich die Zellen leicht vom Boden ablösen ließen. 5 - 10 ml Nährmedium wurden hinzugegeben (das darin enthaltene FCS inaktiviert das Trypsin) und die Zellsuspension auf neue Schalen verteilt.

Die Proteinexpression der HEK293 TR Zellen wurde mittels 1 µg/ml Doxyzyklin über 48 h induziert.

2.6 Proteinbiochemie

2.6.1 Zelllysate

Zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten wurden die Zellen in der Kulturschale zunächst mit 2 ml PBS gewaschen, das PBS wurde abgesaugt und anschließend 500 µl Lysepuffer L1 zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Um die Proteindegradation zu minimieren wurde Proteaseinhibitor zugesetzt. Die Lyse wurde durch wiederholtes Aufziehen durch eine 0,6 mm Kanüle mechanisch unterstützt. Daraufhin wurde das Zelllysate bei 8.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Proteinextrakt wurde in ein frisches Eppendorfggefäß pipetiert und das Zellpellet verworfen.

2.6.2 Membranpräparation und Inkubation mit Inhibitoren

Die Membranproteine wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g (50.000 rpm im TLA 55 Gefäßhalter) über 3 h abzentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Membranproteine wurden anschließend in CHAPSO Puffer gelöst.

Die Gesamtprotein-konzentration der Proben wurde nach Bradford mit Hilfe des Protein Assay Kits entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Hierzu wurden zu 200 µl BioRad-Reagenz und 800 µl H₂O 2µl Lysat zupipetiert und die Extinktion photometrisch bei 595 nm gemessen.

Die Membranproteinlösung wurde anschließend mit dem SPP spezifischen biotinylierten Inhibitor Merck C (0,2 µM) und dem nichtbiotinylierten Version Merck A (1,0 µM) für 1 h in CHAPSO Puffer inkubiert. Der Komplex aus Enzym und biotinyliertem Inhibitor wurde mit an Streptavidin gekoppelten Kügelchen entsprechend den Angaben des Herstellers gefällt und mittels SDS-PAGE detektiert.

2.6.3 SDS-PAGE Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamid Gelen (Laemmli, 1970). Für die SDS-Page wurde das Mini-Protean II Gelsystem von Biorad verwendet. Die Glasplatten wurden mit 70 % Ethanol von Rückständen gereinigt. Das Trenngel (Gesamtlänge ca. 7 cm) wurde bis ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren (ca. 15 min) wurde das Isopropanol abgekippt, der freie Raum über dem Trenngel mit saugfähigem Papier getrocknet, anschließend mit Sammelgel befüllt und ein

Kamm eingefügt, um die Probestaschen zu formen. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die Probestaschen wurden ausgespült und die Kammer mit Elektrophorese Laufpuffer befüllt. Das Proteinextrakt wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C 5 min erhitzt und in die Gelkammern pipetiert. Die Auftrennung erfolgte bis zur Sammelgel-Trenngel Linie bei 60 V und danach bei 120 V.

Tabelle 4: Zusammensetzung der von 7 % und 10 % SDS Polyacrylamid-Gelen.

Trenngellösung	7,5 %	10 %	Sammelgellösung	
40% Acrylamid	1,9 ml	2,5ml	40% Acrylamid	0,5ml
Tris 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml	2,5ml	Tris 0,5M (pH 6,8)	1,25ml
SDS 10%	100µl	100µl	SDS 10 %	50µl
Harnstoff	4,8g	4,8g	H ₂ O	3,15ml
H ₂ O	1,8ml	1,2ml		
Direkt vor dem Gießen dazugeben um die Polymerisation zu starten				
10 % APS	70µl		50µl	
TEMED	15µl		10µl	

2.6.4 Western-Blot und Immunodetektion

Nach der Auftrennung durch Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Transferkammer auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Das SDS-Gel wurde zunächst in Transferpuffer in ein Sandwich aus einem Schwamm, drei Whatman-Papieren, Gel (auf der Kathodenseite), Nitrozellulose-Membran und einer zweiten Schicht Whatman-Papiere und Schwamm gelegt. Luftblasen wurden entfernt und das Sandwich anschließend in die Blot-Apparatur eingespannt. Der Transfer erfolgte in kaltem Transferpuffer bei konstantem Stromfluss von 200 mA über 4 h. Ein Magnetrührer sorgte für die Durchmischung des Transferpuffers, Eisblöcke für niedrige Temperaturen.

Nach dem Blotten wurde die Membran bei Raumtemperatur 1 h in Blockpuffer unter leichtem Schütteln geblockt. Die Membran wurde anschließend 2 h mit dem Antikörper (0,1 µg/ml) in 1 x TBST inkubiert und danach 3 x 10 min in 1 x PBST gewaschen. Der primäre Antikörper wurde mit einem sekundären Antikörper, an den Peroxidase gebunden ist, markiert. Durch erneutes Waschen (3 x 10 min in 1 x PBST) wurden ungebundene sekundäre Antikörper entfernt. Nach kurzem Trocknen der Membran erfolgte die Detektion der mit Antikörpern gekoppelten Proteine mittels ECL oder ECL plus Reagenz entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.7 Fisch Arbeiten

2.7.1 Aufzucht und Haltung der Fische

Aufzucht und Haltung der Fische erfolgte wie in Mullins et al, 1994 beschrieben. Embryonen wurden gewonnen, indem Zebrafische paarweise in Plexiglasboxen über Nacht angesetzt wurden.

2.7.1 Isolierung von Zebrafisch mRNA und RT-PCR

Je 50 Embryonen der entsprechenden Stadien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Embryonen wurden durch wiederholtes Aufziehen durch eine Kanüle (\varnothing 0,6 mm) in einer sterilen Spritze homogenisiert. Die RNA wurde mit Hilfe des NucleoTrap® mRNA Kits von Machery-Nagel gewonnen. Um die Degradation der RNA zu minimieren wurden alle Arbeitsschritte im Eisbad durchgeführt.

Anschließend wurde die mRNA unter Verwendung des SuperScript™ First-Strand Kit von Invitrogen entsprechend den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Um RNase freies Arbeiten zu gewährleisten wurden nur sterile Lösungen, DEPC behandeltes Wasser und RNase freie Pipettenspitzen benutzt.

Die Sensitivität der RT-PCR zum mRNA Nachweis ist höher als die der *in situ* Hybridisierung. Transkripte, die sich durch *in situ* Hybridisierungen nicht darstellen lassen, sind daher gegebenenfalls durch die RT-PCR detektierbar.

2.7.2 *In situ* Hybridisierung

Embryonen der entsprechenden Stadien wurden in 1 x PBS 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C über Nacht fixiert und danach von Hand mit feinen Pinzetten dechorioniert. Anschließend wurden die Embryonen in 100 % Methanol gewaschen und bei -20 °C mindestens 30 min gekühlt oder für längere Zeit aufbewahrt. Die Embryonen wurden 5 min je einmal in 50 % MeOH PBST, 25 % MeOH PBST und zweimal in PBST gewaschen, erneut 20 min in 4 % Paraformaldehyd PBS fixiert und abschließend zweimal in PBST gewaschen. Embryonen ab dem 2 d Stadium wurden mit Proteinase K (10 µg/ml) 5-15 min angedaut und erneut gewaschen. Danach wurden die Embryonen in Eppendorf Gefäße transferiert und 15 min in Hybridisierungspuffer (HYB) bei 65 °C inkubiert. Um die endogene alkalische Phosphatase Aktivität zu inhibieren wurde Levamisol zugegeben. Der Hybridisierungspuffer wurde durch frischen HYB Puffer ersetzt und die Embryonen wurden über Nacht bei 65 °C prähybridisiert. Danach wurde soviel HYB Puffer wie möglich abgenommen, ohne dass die Embryonen mit

Luft in Kontakt gerieten. Zur Hybridisierung wurde nun frischer HYB Puffer, der 20 - 100 ng einer mit Digoxigenin markierten RNA Probe enthielt, zugegeben und die Embryonen bei 65 °C über Nacht inkubiert. Die Proben wurden gemäß den Angaben des Herstellers mit dem DIG RNA Labeling Kit erzeugt (Abbildung 12).

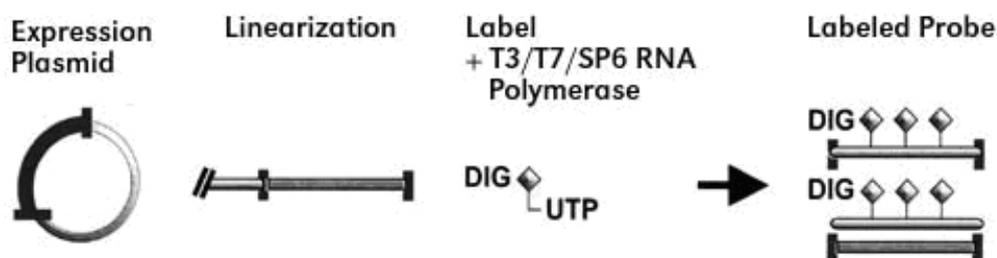


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Herstellung Digoxigenin-markierter RNA Proben.

Am nächsten Tag wurden die Proben abgenommen und die Embryonen zweimal 20 min bei 65 °C in 50 % Formamid und 2 x SSCT gewaschen, gefolgt von zwei Waschschritten je 20 min bei 65 °C in 25 % Formamid und 2 x SSCT. Nach weiteren Waschschritten in 2 x SSCT (10 min, 50 °C), 1 x SSCT (SSC, 0.1 % Tween-20) (15 min 50 °C), 0,2 x SSC (15 min, 50 °C) und PBST (5 min RT), wurden die Embryonen in Mikrotiter Platten transferiert.

Die Embryonen wurden 1 h in NCST geblockt. Danach wurde Alkalische Phosphatase, gebunden an Digoxigenin Antikörper, in einer 1 : 2000 Verdünnung in frischem NCST Puffer hinzugegeben und die Embryonen in dieser Lösung über Nacht im Kühlraum leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Embryonen viermal 25 min in NCST gewaschen und anschließend in Mikrotiterplatten überführt. Nach dreimaligem Waschen in Staining Puffer (je 5 min) erfolgte die enzymatische Farbreaktion in Staining Puffer mit 3,5 µl NBT /ml und 4,5 µl BCIP /ml. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und gestoppt, sobald das Signal kräftig genug war. Bei der Beurteilung des Expressionsmusters ist darauf zu achten, dass die Intensität des Signals von der Länge der Farbreaktion abhängt und daher nur begrenzt über Quantität der vorhandenen mRNA Auskunft geben kann.

2.7.3 Injektion der Zebrafischeizellen mit mRNA und GripNA

Die Überexpression verschiedener Gene wurde mit *in vitro* synthetisierter mRNA durchgeführt. Dazu wurde der das Gen enthaltende Vektor an entsprechender Stelle linearisiert und mit SP6 Polymerase transkribiert. Synthetische mRNA wurde *in vitro* mit dem mMMESSAGE mMACHINE Kit von Ambion hergestellt. Die Konzentration wurde mit dem Photometer bestimmt. Es wurden zwischen 50 pg und 200 pg mRNA injiziert.

Für die Knock Down Experimente wurden GripNAs (Active Motif) verwendet (Abbildung 13). Hierbei handelt es sich um synthetische Oligopeptid Nukleotidsäuren (PNAs), die im Vergleich zu Oligonukleotiden nukleaseresistent sind. Bei PNAs ist das Nucleosid mit einem N-(2-aminoethyl) Glyzin Rückgrat anstatt mit Desoxyribose verbunden. Um die Wasserlöslichkeit und die Aufnahme in die Zelle zu verbessern wird bei GripNA™ ein Rückgrat aus N-(2-aminoethyl) Glyzin abwechselnd mit N-(2-aminoethyl) Phosphono-Glyzin verwendet (Efimov et al, 1999; Efimov et al, 1998). Für die knock down Experimente wurden 18 Nucleotid lange GripNAs verwendet. Die Spezifität dieser GripNAs ist so hoch, dass bereits zwei nicht übereinstimmende Basen die Bildung eines stabilen GripNA/RNA Duplexes verhindern.

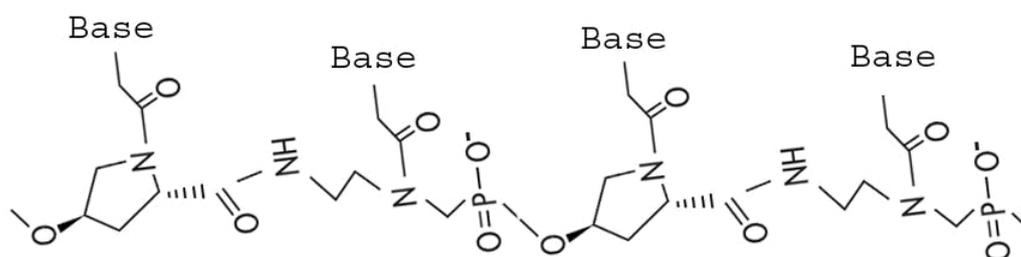


Abbildung 13: Schematische Darstellung der GripNA Struktur. Das Rückgrat besteht aus N-(2-hydroxy-ethyl)phosphonoglyzin und trans-4-hydroxy-L-Prolin.

Die Injektion sowohl der mRNA als auch der GripNAs erfolgte mit Hilfe eines Druckluftinjektorapparates (FemtoJet) und selbst gezogenen Glaskapillaren. Die Embryonen wurden in einem Agarose Gitter immobilisiert, ausgerichtet und anschließend im 1-2 Zellstadium mit der Probe direkt in die befruchtete Eizelle injiziert.

Tabelle 5: Beschreibung der zum Gen Knock Down verwendeten Konstrukte. Angegeben ist die Bezeichnung, sowie die Sequenz des verwendeten PNAs.

PNA (GripNA)	Basen Sequenz (5'-3')
<i>zspp</i> _1 st _ATG_Grip	CCACATCCGCC CAT GTTTC
<i>zspp</i> _2 nd _ATG_Grip	CTGCTCCACATCCGCC CAT
<i>zspp</i> _GT_Grip	CGTACCTCATTGTGTGAG
<i>zspp</i> _ATG_Mismatch_Grip	CTACATTCG CCAT GCTTC
<i>zsppl2</i> _ATG_Grip	TGTGATCTCCC CAT CCG
<i>zsppl2</i> _GT_Grip	CTTACTTTTTCTGTGCC
<i>zsppl2</i> _ATG_Mismatch_Grip	TATGATCTC GCAT ACG
<i>zsppl3</i> _ATG_Grip	CTCTGCTCCG CAT GTCA
<i>zsppl3</i> _GT_Grip	CGCACCGTCCATGAGCAG
<i>zsppl3</i> _ATG_Mismatch_Grip	CTCGGCTCCG CAAT GCCA

2.7.4 Injektion der Mikrobeads

Die Injektion der Mikrobeads zur Beurteilung des Gefäßsystems setzt ein funktionierendes Herzkreislaufsystem voraus. Die Schwierigkeit dieser Experimente besteht einerseits in einer ausreichenden Fixierung der Embryonen für die Injektion und andererseits in einem möglichst schonenden Umgang mit den Embryonen um die Überlebenszeit zu erhöhen.

Embryo Medium E3 mit 1,5 % low melting argarose wurde aufgeköcht und auf ca. 28 °C abgekühlt. Die Embryonen wurden anschließend mit einem Tropfen auf einem Deckglas fixiert. Nach Aushärten der Argarose wurden ein bis drei Boli der Mikrobeads durch eine selbstgezogene Glaskapillare in die common cardinal vein injiziert. Wenn zu große Mengen der Mikrobeads injiziert werden, kann es zum Herzstillstand kommen. Mit isotonischer, heparinierter NaCl Lösung verdünnte Mikrobeads brachten keinen Vorteil. Anschließend wurden die Embryonen zügig mikroskopiert.

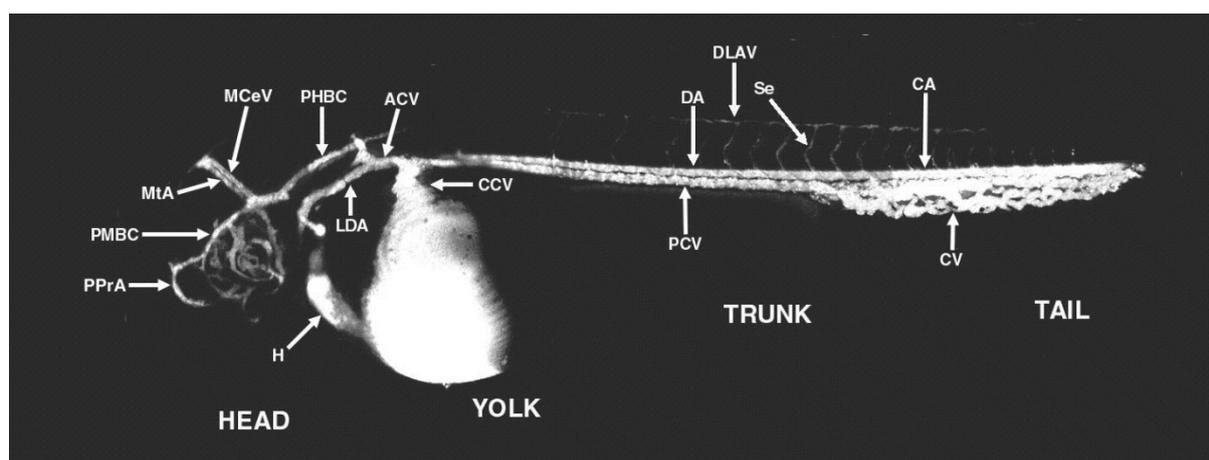


Abbildung 14: Darstellung des Gefäßsystems durch fluoreszierende Mikrobeads. ACV anterior cardinal vein, CA caudal artery, CCV common cardinal vein, CV caudal vein, DA dorsal aorta, DLA V dorsal longitudinal anastomotic vessel, H heart, LDA lateral dorsal aorta, MCeV middle cerebral vein, MtA metencephalic artery, PHBC primordial hindbrain channel, PMBC primordial midbrain channel, PPrA primitive prosencephalic artery, Se intersegmental vessel. Abgewandelt aus (Isogai et al, 2001)

2.7.5 Acridine Orange und TUNEL Färbung

Acridine Orange gelangt durch die durchlässigen Membranen nekrotischer und apoptotischer Zellen in den Zellkern und interkaliert dort mit der DNA. Die Embryonen wurden 15 min bei RT mit Acridine Orange in E3 Embryomedium inkubiert, danach dreimal je 5 min in E3 gewaschen und anschließend mikroskopiert.

Das TUNEL staining nutzt die DNA Degradation apoptotischer Zellen aus. Die Terminale deoxynukleotidyl Transferase (TdT) überträgt Nukleotide auf freie 3' OH Enden von DNA

Fragmenten. Gibt man mit Rhodamine markierte dUTPs als Substrat zu dieser enzymatischen Reaktion, lassen sich die DNA Fragmente unter dem Fluoreszenz Mikroskop nachweisen (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling). Das TUNEL staining wurde mit Hilfe des *in Situ* Cell Death Detection Kits entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie sind die Absorptions- und Emissionsspektren der jeweiligen Farbstoffe zu berücksichtigen und die Farbfilter entsprechend zu wählen. Acridine Orange wird im Wellenlängenbereich um 400 nm Rhodamine B um 510 nm optimal angeregt. Die Detektion sollte im Bereich von 500 nm bis 600 nm erfolgen (Du H., 1998).

2.7.6 Photographie

Fixierte Embryonen wurden in 3 % Methylzellulose in E3 Medium auf einem Objektträger ausgerichtet und unter dem Mikroskop untersucht. Lebende Embryonen wurden zusätzlich mit Tricain anästhesiert und immobilisiert. Bilder wurden mit einer an das Mikroskop AxioPlan 2 angeschlossenen Digitalkamera (AxioCam) aufgenommen und mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop nachbearbeitet.

2.8 Homologievergleiche in Genomdatenbanken

Das Genom des Zebrafisches (*Danio rerio*) wird seit Februar 2001 durch das zebrafish genome project(http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/) sequenziert und annotiert. Die Sequenzdaten sind unter http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html frei zugänglich und werden etwa im Jahresrhythmus aktualisiert. Die Homologievergleiche wurden an den Datensätzen der jeweils aktuellsten Version des Zebrafischgenoms angestellt und nach Aktualisierung der Datenbank überprüft. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die fünfte Version der assemblierten Sequenzdaten (Zv 5).

Um die Orthologen Sequenzen der humanen SPP und ihrer Homologen SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c und SPPL3 im Zebrafischgenom zu identifizieren wurden die humanen Proteinsequenzen mit dem BLAST Algorithmus (Altschul et al, 1994; Altschul et al, 1990; McGinnis & Madden, 2004) gegen die Zebrafisch Genomdatenbank abgeglichen. Da verwandte Proteine meist nicht über die gesamte Länge sondern nur in umschriebenen Regionen hohe Ähnlichkeit aufweisen, bedient sich BLAST eines local alignment Algorithmus. Beim Vergleich zweier Sequenzen wird ein Gesamtwert (score) berechnet, in den die Übereinstimmung der gegenübergestellten Aminosäuren, sowie Strafwerte für in die Sequenz eingefügte Lücken einfließen. In einer Gewichtematrix sind die score values des Aminosäurevergleichs definiert. Die Höhe des Gesamtwertes nimmt im Mittel mit der Länge

der verglichenen Sequenzen zu. Soll nun die Aussagekraft des berechneten Gesamtwertes eines Homologievergleiches zweier Sequenzen beurteilt werden (A gegen B), so ist die Wahrscheinlichkeit zu ermitteln, einen Gesamtwert mindestens gleicher Größe durch Vergleich einer Suchsequenz gleicher Länge jedoch zufälliger Abfolge (X gegen B) zu erhalten. Dieser Wahrscheinlichkeitswert wird mit E-value bezeichnet und gehorcht einer Extremwertverteilung (Gumbel Distribution, (Gumbel, 1958)). Je kleiner der E-value ausfällt, desto höher ist demnach die statistische Signifikanz.

Bei den Homologievergleichs der humanen Proteinsequenzen mit Sequenzen der Zebrafisch Genomdatenbank, wurde die Gewichtsmatrix BLOSUM 62 verwendet, diese Matrix ist für den Vergleich mäßig divergenter Sequenzen optimiert (Henikoff & Henikoff, 1992; Henikoff & Henikoff, 2000).

3 Ergebnisse

3.1 Orthologe Gene der SPP Familie im Zebrafischgenom

Die Suche nach orthologen Genen der SPP Familie im Zebrafischgenom wurde in der Zebrafisch Genomdatenbank des Zebrafisch GenomProjektes mit Hilfe des BLAST Algorithmus durchgeführt (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_erio/). Es wird hierbei ein Wert (E-value) ermittelt, der angibt wie wahrscheinlich ein Treffer in einer zufällig erzeugten Sequenz wäre und damit die Güte des Treffers beschreibt.

Die Suche mit der Proteinsequenz der humanen SPP (GenBank Nummer NP_110416 isoform 1) liefert für verschiedene Fragmente der Protease Treffer auf dem Zebrafisch Chromosom 23 in der Region um 500 Kb. Die E-values sind von der Größenordnung e^{-89} . Treffer in anderen Regionen haben E-values größer oder gleich e^{-6} . In der Trefferregion auf Chromosom 23 ist ein von Ensembl bestätigtes Transkript annotiert, es handelt sich hierbei wahrscheinlich um die Signalpeptidase *spp* (AY926458) des Zebrafisches. Im cDNA Archiv des Deutschen Ressourcen Zentrums für Genomforschung (www.rzpd.de) wurde anschließend der Klon MPMGp637A0723Q2, auf dem sich diese Sequenz befindet, bestellt. Ein Vergleich der humanen und der Zebrafisch Sequenz mit dem multiple sequence alignment tool ClustalW (Jeanmougin et al, 1998; Thompson et al, 1994) liefert eine Übereinstimmung in 77% der Aminosäuren.

Die Suche mit den Protein Sequenzen der humanen SPPL2a/b/c (CAD13133, NP_694533, NP_787078) liefert für alle drei Sequenzen signifikante Treffer auf dem Zebrafisch Chromosom 2 in derselben Region um 34,9Mb (E-values: e^{-50} , e^{-168} , e^{-68}). An dieser Stelle befindet sich ein Zebrafisch Transkript, das translatiert in 50% der Aminosäuren mit SPPL2a, in 66 % mit SPPL2b und in 45 % mit SPPL2c übereinstimmt. Die Sequenzähnlichkeit zu SPPL2b ist höher als zu SPPL2a und SPPL2c. Insgesamt ist die Ähnlichkeit der humanen Sequenzen zu der Zebrafisch Sequenz höher als die Homologie unter den humanen Sequenzen (SPPL2a zu SPPL2b: 47 %, SPPL2a zu SPPL2c: 42 %, SPPL2b zu SPPL2c: 46 %). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei den drei humanen SPPL2s um paraloge Sequenzen handelt, die durch Genduplikation eines Vorläufers entstanden sind. Im Zebrafisch hingegen hat diese Aufspaltung noch nicht stattgefunden. Das Zebrafisch Gen wird im Folgenden als *spl2* (AY926457) bezeichnet. Der Klon MPMGp609O0125Q8, auf dem sich diese Sequenz befindet, wurde vom RZPD bestellt.

Die Suche mit der Proteinsequenz von humanem SPPL3 (NP_620584) liefert Treffer hoher Signifikanz (E-values $<e^{-170}$) auf Chromosom 10. In dieser Trefferregion befindet sich ebenfalls ein validiertes Zebrafisch Transkript und der entsprechende Klon (MPMGp637N1021Q2) wurde vom RZPD bestellt. Die Aminosäuresequenz dieses Transkripts stimmt in 93 % mit dem humanen Protein überein, daher wird dieses Gen im Weiteren als *sppl3* (AY926459) bezeichnet.

Die Übereinstimmung der Basensequenzen für alle Genpaare ist deutlich geringer als die Aminosäuren Übereinstimmung, so stimmen z.B. SPPL3 und *sppl3* nur in 77 % ihrer Basenpaare überein, dies erklärt sich aus dem degenerierten Triplet Code. In Abbildung 15 ist die Homologie der Proteine mit Hilfe eines phylogenetischen Baumes grafisch veranschaulicht. Der Sequenzvergleich in Abbildung 16 zeigt schwarz unterlegt Aminosäuren, die sowohl in den unterschiedlichen Mitgliedern der SPP Familie als auch den beiden Spezies Zebrafisch und Mensch konserviert sind. Grau unterlegt sind Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. Deutlich zu erkennen ist die hohe Sequenzhomologie der beiden grau unterstrichen dargestellten Transmembrandomänen 6 und 7, die die Motive YD und GxGD enthalten. Das PAL Motiv ist in eine acht Aminosäuren lange Sequenz eingebettet, die in allen sechs Proteinen identisch ist.

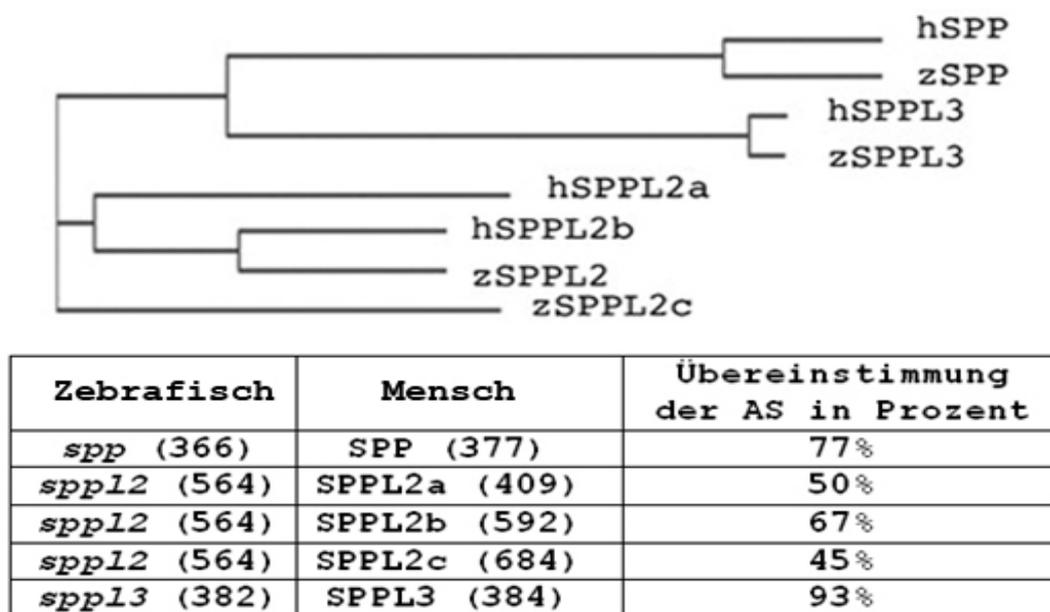


Abbildung 15: Der phylogenetische Baum stellt die Verwandtschaftsbeziehung der einzelnen SPPs grafisch dar; in der Tabelle ist die Übereinstimmung der humanen und der Zebrafisch Sequenzen aufgeführt, die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Länge der Aminosäurenkette.

hSPP	(1)	-----
spp	(1)	-----
hSPPL2b	(1)	MAAAVAAALARLLAAFLLLAA---QVACEYGMVHVVSQAAGGPEGKDYC ILYNPQWAHLPHDLKSKASFLQLRNMTASLLCS
spp12	(1)	MGEITITIGIMRFLSSLLLAAL IVEQVLGEYGMAFHSDWGNS- KGKDYC IFFNSQWARLPQDLKSKATRLQTYDLTS SVLCS
hSPPL3	(1)	-----
spp13	(1)	-----
hSPP	(1)	-----MDSALSDPHNGSABEAGCP
spp	(1)	-----MADVEQTA PAPDGSSNGSDLV
hSPPL2b	(78)	AADLPARGFSNQIPLVARGNCTFYEVKVRLAQGS GARGLL IVS RERLVP PGGNKTQYDE IGIPVALLSYKDMLD IFTRFGGR
spp12	(80)	PSDVP EGGFTNS IPVMVRGNCTFYEVKVRLAQINGAKGLL IVS KDRLTP PGNKSYQYEE IGIPVALLSYKDMLD ISKTFGE
hSPPL3	(1)	-----
spp13	(1)	-----
hSPP	(19)	TNSTTRPPSTPEGIALAYGSLLLMALLPIFFGALRSVRCARGMASDMPETITSR--DAARFPIISCTLLGLYLFKKIF
spp	(22)	NGTAGRFVSSAEGTALAYGSLLLMALLPIFFGALRSVGCSSKSGSSDMPETITSR--DAARFPIISCTLLGLYLFKKIF
hSPPL2b	(158)	TVRAALWAPKEPVLLYNNMIIFFIMAVGTVAIGGVMAGSRDVKRYMKHKRDDGPE----KQDEEDVDTVPVMTCVFVVM
spp12	(160)	KRQVAMWAPNEPVVDYNNMLIFLMAVGTVALGGVMAGSRDIKRYMKHKRDDGAE----KQDEETVDVTPIMICVFVVM
hSPPL3	(1)	-MAEQYSWAYSLVDSSQVSTFLIS ILLLVYGS PRSLNMDFEWQDKKDSNSSSGS-FNGNSTNNSIQIDSTQALDELPM
spp13	(1)	-MAEQYSWAYSLVDSSQVSTFLIS ILLLVYGS PRSLNMDCEWQEKDKDGNPMSAGSFNMANSNNSIQIDSTQALDELPI
hSPP	(97)	SQEYINLLSMYFFVLGILALSHIISPFMMKFPASFNINROYQLLFTQSGENKEEII NYEFDTKDVCIGLSSIVGVWY
spp	(100)	SQEYVNMILSMYFFVLGILALSHIMSPFMC RVFPANISNKQYQLLFTQSGESKEEIV NYEFDTKDVCIGLSSIVGVWY
hSPPL2b	(233)	CCSMLVLLYFFYDLDVYVYVIGIFCLASATGLYSCTAPCVRRLPFGKCRIPENSLPYFHKRPQARMLLALFCVAVSVVWG
spp12	(235)	CCSMLVLLYFFYDLDVYMTIATFCLASAVSLYSCTWPPFVRI PFGKCRIPENSLPYCHKRPQVRMLLSAFCI GSVTWG
hSPPL3	(79)	GACVSLDVMFFFDSSQVFTICIAVLAIAIAPFLLDPMCOMLTRPSPQNKISFGCCGRFTAAELLFSFSLSVMLVLIWV
spp13	(80)	GASVSLDVMFFFDSSQVFTICIAVLAIAIAPFLLDPMCOMLTRPSPQNKISFGCCGRFTLAEELLFSFSLSVMLVLIWV
hSPP	(177)	LLR---KHWIANNLFCLAEALNGVELLEHNNVSTGCILLGGLEFYDVFVWFCTNVMTVA-----KFEAP
spp	(180)	VLK---KHWIANNLFCLAEALNGVELLEHNNVSTGCILLGGLEFYDVFVWFCTNVMTVA-----KFEAP
hSPPL2b	(313)	VFRNEDQWAVLQDALGIAPCLYLKTIIRLPTFACITLLLVLELYDIFVVFITPPLTKSGSSIMVAVATGSDSATREK
spp12	(315)	VFRNEDQWAVLQDALGIAPCLYLKTIIRLPTFACITLLLVLELYDIFVVFITPPLTKSGESIMVAVAGSDSATREK
hSPPL3	(159)	LTG---HULLMDALAMGLCVAVIAFVRLPSLQVSCILLSSGLLYDVFVWFPSAYIFNSN--VMVKVATQADNPLDVL
spp13	(160)	LTG---HULLMDALAMGLCVAVIAFVRLPSLQVSCILLSSGLLYDVFVWFPSAYIFNSN--VMVKVATQADNPLDVL
hSPP	(240)	IKLVFPQDLLEKGLGNS-----MFAMLGLGDVWIPGIFIALLLRFDISLKKNR-----
spp	(243)	IKLVFPQDLLEKGLGNS-----MFAMLGLGDIVIPGIFIALLLRFDVSLKKNR-----
hSPPL2b	(393)	LPMVLKVRRLMS SPLVL-----CDRPFELLGGGDLVPGLLVAYCHREDIQVQSSR-----
spp12	(395)	LPMVLKVRRLMS SPLVL-----CDRPFELLGGGDLVPGLLVAYCHREDILMQTSQ-----
hSPPL3	(232)	SRKHLHGGVNGRDVPRLSLPGKLVFSSSTGSHFEMLGGIDIVMPGLLFCFVLRVDNYKQVAGSDSCGAPGANISGRMQK
spp13	(233)	SRKHLHGGVNGRDVPRLSLPGKLVFSSSTGSHFEMLGGIDIVMPGLLFCFVLRVDNYKQVAGIG--EVPGPANMSGRMQR
hSPP	(288)	HTYFYTSFAAMIFGLGLTIFIMHFKHAQFALLYLVPACIGFPVLVALAKGEVTEMPSEYESNP-----KDPAAV
spp	(292)	-TYFYTSFLAMIFGLGLTIFVMHTFKHAQFALLYLVPACVGFVPLVALVKGEITEMFRYEEETP-----
hSPPL2b	(444)	-VYFVACTIAGVYGLLVTFVALALMQRGQFALLYLVPCTILVTSCAVALWRRETGVFVITGSGFAKVLPPSPWAPAPADGPQ
spp12	(446)	-IYFLACTICWGIGLLITFVALTLMQMGQFALLYLVPCTILLTSLAVALWRKETPLFMTGSGFV-----PPP I
hSPPL3	(312)	VSYFHCITLIGFVGLLTATVASRHRRAQFALLYLVPFILLPLITMAYLKGDVRRMMS EPPHSS-----KSSS
spp13	(310)	VSYFHCITLIGFVGLLTATVASRHRRAQFALLYLVPFILLPLITMAYLKGDVRRMMS EPPHAK-----SSS
hSPP	(358)	TESKGTAEASASKLEKKEK-----
spp	(355)	-SKEGTAESEKDK-----
hSPPL2b	(523)	PPKDSALPLSPQPPSEEPATSPWPAEQSPKSRSTSEEMGAGAPMREPGSPAES EGRDQAQPSVPTQPGASA
spp12	(512)	IMEQINCTQTPGPSTDEPPSNPEPATSETNN-----QREDPTPATQEEVPHLTDASNT-----
hSPPL3	(379)	SRFLV-----
spp13	(377)	SRFLV-----

Abbildung 16: Alignment der humanen und Zebrafisch Sequenzen der SPP-Familie. Die konservierten Aminosäuren sind als weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund dargestellt, funktionell sehr ähnliche AS sind dunkelgrau unterlegt, schwach ähnliche AS hellgrau. Die charakteristischen Motive YD und GxGD (rot unterlegt) liegen in den vorhergesagten TM 6 und TM 7 (grau gestrichelt).

3.1.1 Intron-Exon Struktur von *spp*, *sppl2* und *sppl3*

Die meisten Gene in höheren Eukaryonten enthalten Introns. Die Introns müssen herausgeschnitten und die Exons aneinandergesetzt werden, um die reife mRNA zu bilden (splicing). Die Intron-Exon-Verbindungen haben in Eukaryonten ein gemeinsames strukturelles Motiv, die Basensequenz des Introns beginnt mit GU und endet mit AG. Auch eine Region, die dem 3' Ende der Spleißstelle 20 bis 50 Nukleotide vorgeschaltet ist, hat funktionelle Bedeutung (branch site). Die restlichen Teilbereiche des Introns scheinen auf den Spleißvorgang weniger Einfluss zu haben. Introns haben eine Länge von 50 bis zu 10.000 Nukleotiden.

Die Intron Exon Struktur der Zebrafisch Transkripte wurde mit dem Programm EST2GENOME aus dem Emboss Packet (<http://emboss.sourceforge.net/>) analysiert. Mit Hilfe dieses Programms kann man cDNA, mRNA oder EST Daten mit nicht gespleißter genomischer DNA abgleichen. Das Programm verwendet den Smith-Waterman Algorithmus für das lokale Alignment und berücksichtigt die konservierten Spleiß Donor und Akzeptorstellen GU und AG (Huang, 1994; Mott, 1997). Es wurden die für kleine Exons optimierten Parameter verwendet (mismatch: 3, intronpenalty:20, splicepenalty:10, minscore 10).

Das Transkript von *spp* setzt sich aus 12 Exons zusammen. Das Motiv YD ist auf Exon 6 und das Motiv GxGD auf Exon 8 kodiert. Die mRNA von *sppl2* setzt sich aus 15 Exons zusammen, das Motiv YD befindet sich auf Exon 10, das Motiv GxGD befindet sich auf Exon 12. Das Transkript von *sppl3* ist in 10 Exons unterteilt, die Motive YD und GxGD liegen auf den benachbarten Exons 7 und 8 (Abbildung 17).

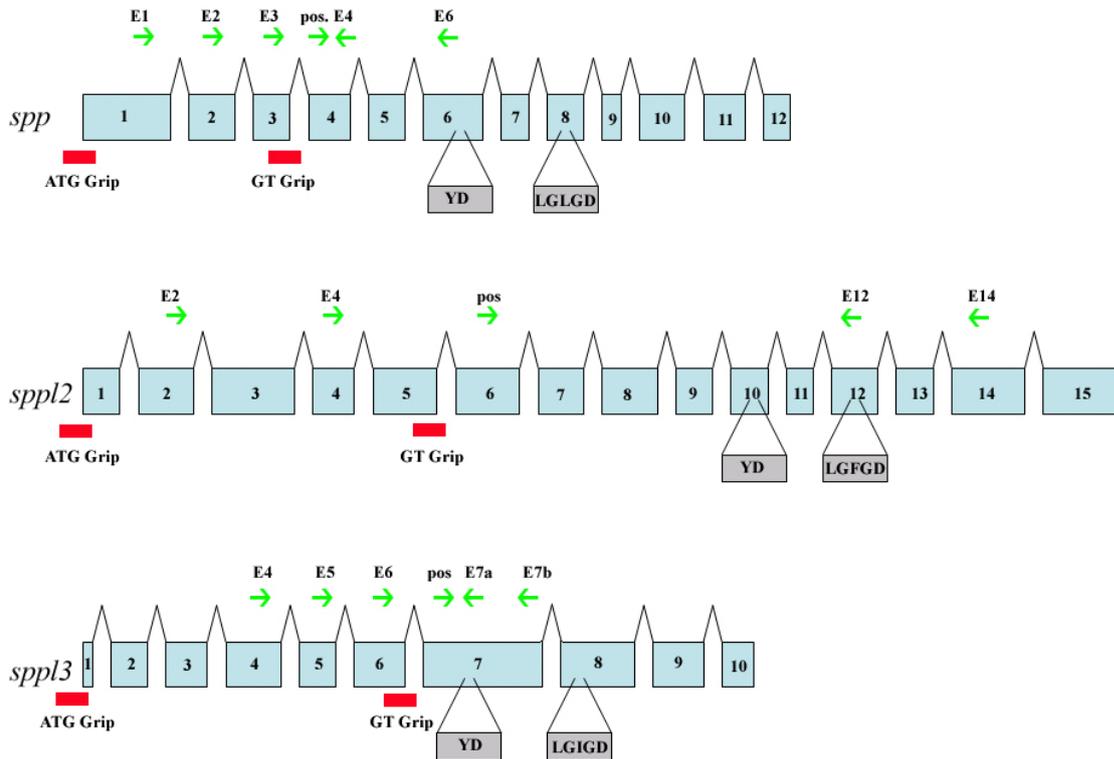


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Exon Intron Struktur von *spp*, *sppl2* und *sppl3*. Die grünen Pfeile markieren die Positionen der Primer die für die RT-PCR Versuche verwendet wurden. Die roten Balken markieren die Zielsequenz der GripNAs (siehe 3.3.1). Grau gekennzeichnet sind die Exonabschnitte, die für die katalytisch aktiven Motive YD und GxGD kodieren.

Tabelle 6: Aufgelistet sind erste und letzte Base, sowie Länge L der einzelnen Exons von *spp*, *sppl2* und *sppl3* im Zebrafisch.

<i>spp</i>	Anfang	Ende	L	<i>sppl2</i>	Anfang	Ende	L	<i>sppl3</i>	Anfang	Ende	L
Exon 1	1	190	190	Exon 1	1	75	75	Exon 1	1	23	23
Exon 2	191	291	101	Exon 2	76	192	117	Exon 2	24	101	78
Exon 3	292	374	83	Exon 3	193	375	183	Exon 3	102	193	92
Exon 4	375	463	89	Exon 4	376	465	90	Exon 4	194	313	120
Exon 5	464	545	82	Exon 5	466	605	140	Exon 5	314	392	79
Exon 6	546	675	130	Exon 6	606	748	143	Exon 6	393	505	113
Exon 7	676	733	58	Exon 7	749	845	97	Exon 7	506	612	107
Exon 8	734	817	84	Exon 8	846	962	117	Exon 8	613	967	355
Exon 9	818	854	37	Exon 9	963	1044	82	Exon 9	968	1077	110
Exon 10	855	957	103	Exon 10	1045	1119	75	Exon 10	1078	1146	69
Exon 11	958	1043	86	Exon 11	1120	1182	63				
Exon 12	1044	1098	55	Exon 12	1183	1282	100				
				Exon 13	1283	1360	78				
				Exon 14	1361	1521	161				
				Exon 15	1522	1692	171				

3.2 mRNA Expressionsprofile während der frühen Entwicklung im Zebrafisch

3.2.1 Zebrafisch Embryogenese

Die Entwicklung des Zebrafisches lässt sich grob in die Phasen der frühen Zellteilung, der Blastula Bildung, der Gastrulation, der Segmentation und des Pharyngealstadiums gliedern (Kimmel et al, 1995). Als erster Schritt der Musterbildung werden die embryonalen Achsen festgelegt. Nach der Befruchtung trennt sich das Zytoplasma vom Eidotter und strömt zum animalen Pol, um dort die Keimscheibe zu bilden. Durch weitere Teilungen zellularisiert die Keimscheibe und beginnt das Blastoderm zu formen. Nach der achten Zellteilung setzt die zygotische Transkription ein (midblastula transition).

Während des späten Blastula Stadiums breitet sich das Blastoderm in Richtung des vegetalen Pols aus (Epibolie). Die Gastrulation setzt ein, sobald die Hälfte des Dotters umschlossen ist (50 % Epibolie). Es kommt nun zu Einwanderungsbewegungen der randständigen Blastodermzellen (Involution). Auf diese Weise entstehen die zwei Keimblätter, der innen liegende Hypoblast und darüber der Epiblast. Laterale Konvergenzbewegungen von Epiblastenzellen und Hypoblastenzellen der Randzone führen zu einer Akkumulation von Zellen (shield). Diese weitere Symmetriebrechung definiert die dorsal-ventrale Achse des Embryos. Gegen Ende der Gastrulation verdickt sich der dorsale Epiblast und bildet die Neuralplatte, aus deren Zellen später das Zentrale Nervensystem hervorgehen wird. Sobald der Dotter vollständig von Blastoderm umgeben und die Epibolie abgeschlossen ist, bildet sich am dorsalen kaudalen Ende des Embryos die Schwanzknospe aus (tail bud). In der nun beginnenden Segmentationsphase kommt es zu einer großen Vielfalt von morphogenetischen Bewegungen, die Somiten entwickeln sich, rudimentäre Organe werden sichtbar, die ersten Zellen differenzieren sich morphologisch und erste Bewegungen sind zu beobachten. Die Somiten entstehen in zeitlich kontrollierter sequenzieller Abfolge und formen die ersten Myotome und Sklerotome. Nachdem die Somitenbildung abgeschlossen ist, beginnt das Pharyngealstadium, der typische Vertebraten Bauplan mit Notochord ist gut entwickelt. In dieser Periode nimmt die Länge des Embryos schnell zu, die Pharyngealbögen entwickeln sich, das Kreislaufsystem bildet sich aus und das Herz beginnt zu schlagen. Die Entwicklung des Nervensystems ist so weit fortgeschritten, dass der Embryo nun auf taktile Reize reagiert und koordinierte rhythmische Schwimmbewegungen ausführen kann.

3.2.2 Expressionsmuster von *spp*, *spl2* und *spl3*

Den unterschiedlichen, auf morphologischer Ebene beschriebenen Vorgängen der einzelnen Embryonalstadien liegen charakteristische Genexpressionsmuster auf transkriptioneller Ebene zugrunde. Die Expressionsprofile von *spp*, *spl2* und *spl3* wurden an Zebrafisch Embryonen und Larven charakteristischer Entwicklungsstadien durch *in situ* Hybridisierung dargestellt. Als *in situ* Hybridisierungsproben wurde mit Digoxigenin markierte antisense RNA der *spp*, *spl2* und *spl3* Transkripte verwendet. Die entsprechenden sense Proben dienten als Negativkontrolle.

Im 8-Zell Stadium können signifikante Mengen *spl2* und *spl3* mRNA durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Abbildung 18B, C). Transkripte von *spp* ließen sich in diesem Stadium nur mit der sensitiveren RT-PCR Methode nachweisen (Abbildung 18 A, Abbildung 19). Da die zygotische Transkription beim Zebrafisch erst nach der achten bis neunten Zellteilung beginnt, bedeutet dies, dass alle drei Gentranskripte maternal vererbt werden.

Im sphere-, sowie im shield-Stadium sind *spl2* und *spl3* Transkripte ubiquitär durch *in situ* Hybridisierung darstellbar (Abbildung 18 E, F). Ab dem tail bud Stadium sind auch die Transkripte von *spp* durch *in situ* Hybridisierungsproben zu detektieren. Alle drei Gene sind gleichmäßig im gesamten Blastoderm exprimiert (Abbildung 18.G, H, I). Dieses Muster ubiquitärer Expression bleibt während des 5 und 10 Somiten Stadium bestehen. Ab dem 20 Somiten Stadium ist die Expression von *spp* im zentralen Nervensystem besonders prominent (Abbildung 18 J), *spl3* kann zusätzlich in der Epiphyse und an den Somitengrenzen nachgewiesen werden (Abbildung 18. L). In diesem Stadium ist *spl2* noch gleichmäßig ubiquitär exprimiert (Abbildung 18 K). 2 Tage nach Befruchtung ist bei allen drei Transkripten die Expression im zentralen Nervensystem besonders deutlich. Allen drei Genen ist also eine in frühen Stadien gleichmäßige ubiquitäre Expression gemeinsam, die mit fortschreitender Entwicklung im Bereich des ZNS prominent bleibt und sich in anderen Geweben abschwächt. Unterschiede bestehen jedoch im zeitlichen Ablauf dieser Entwicklung. Einzelne umschriebene Bereiche, wie die Epiphyse und die Somiten werden nur durch Hybridisierungsproben gegen *spl3* deutlich markiert.

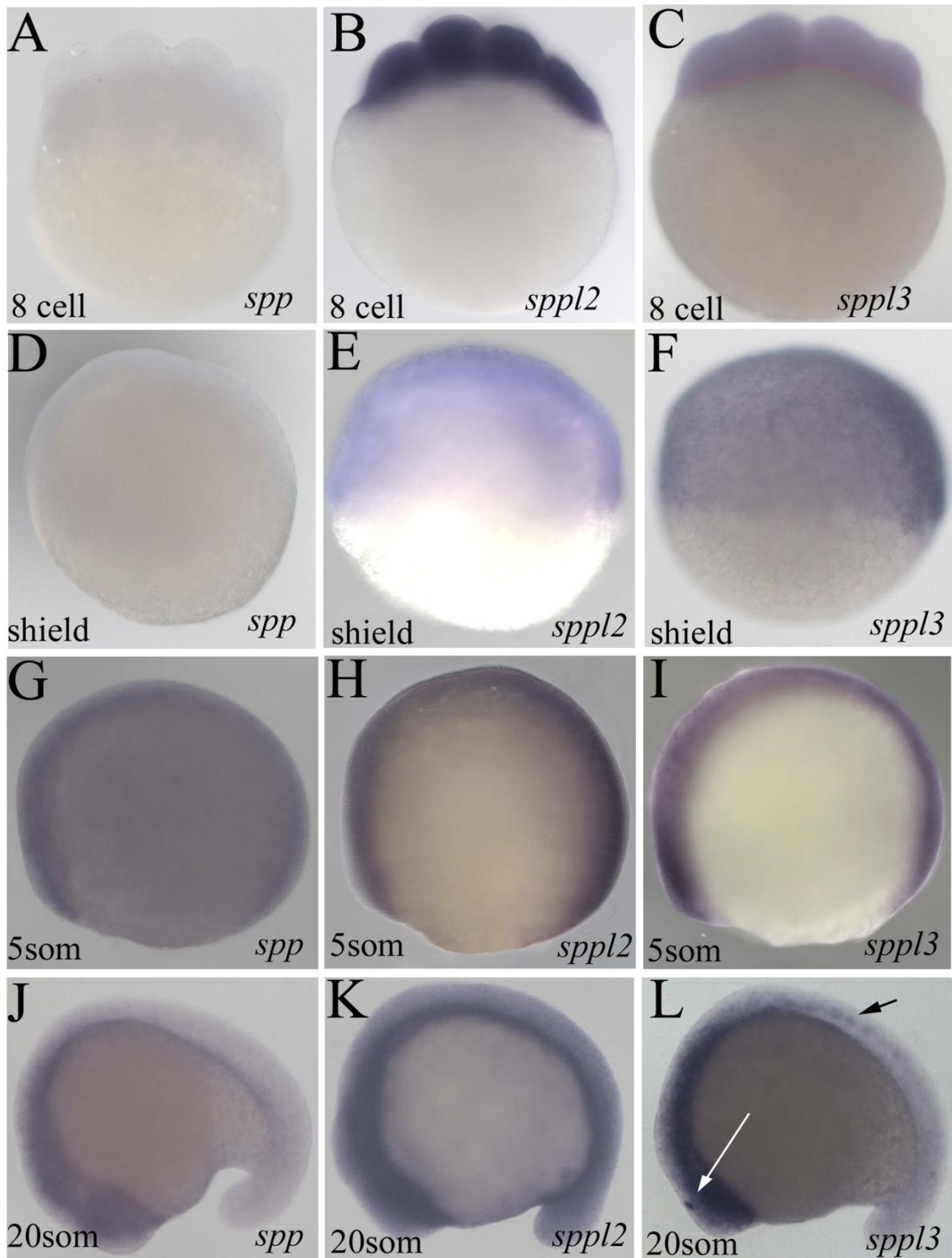


Abbildung 18: Expressionsmuster von *spp*, *sppl2* und *sppl3* in unterschiedlichen Stadien der Zebrafisch Embryogenese sind durch *in situ* Hybridisierung dargestellt. Eine dunkel violette Färbung deutet auf eine hohe Anzahl von Gentranskripten hin. Im 20 Somiten Stadium ist *sppl3* deutlich in der Epiphyse (weißer Pfeil) und an den Somitengrenzen (schwarzer Pfeil) exprimiert.



Abbildung 19: Mittels RT-PCR lassen sich Transkripte von *spp*, *sppl2* und *sppl3* im 8 Zell, shield, und 1 Tagesstadium nachweisen.

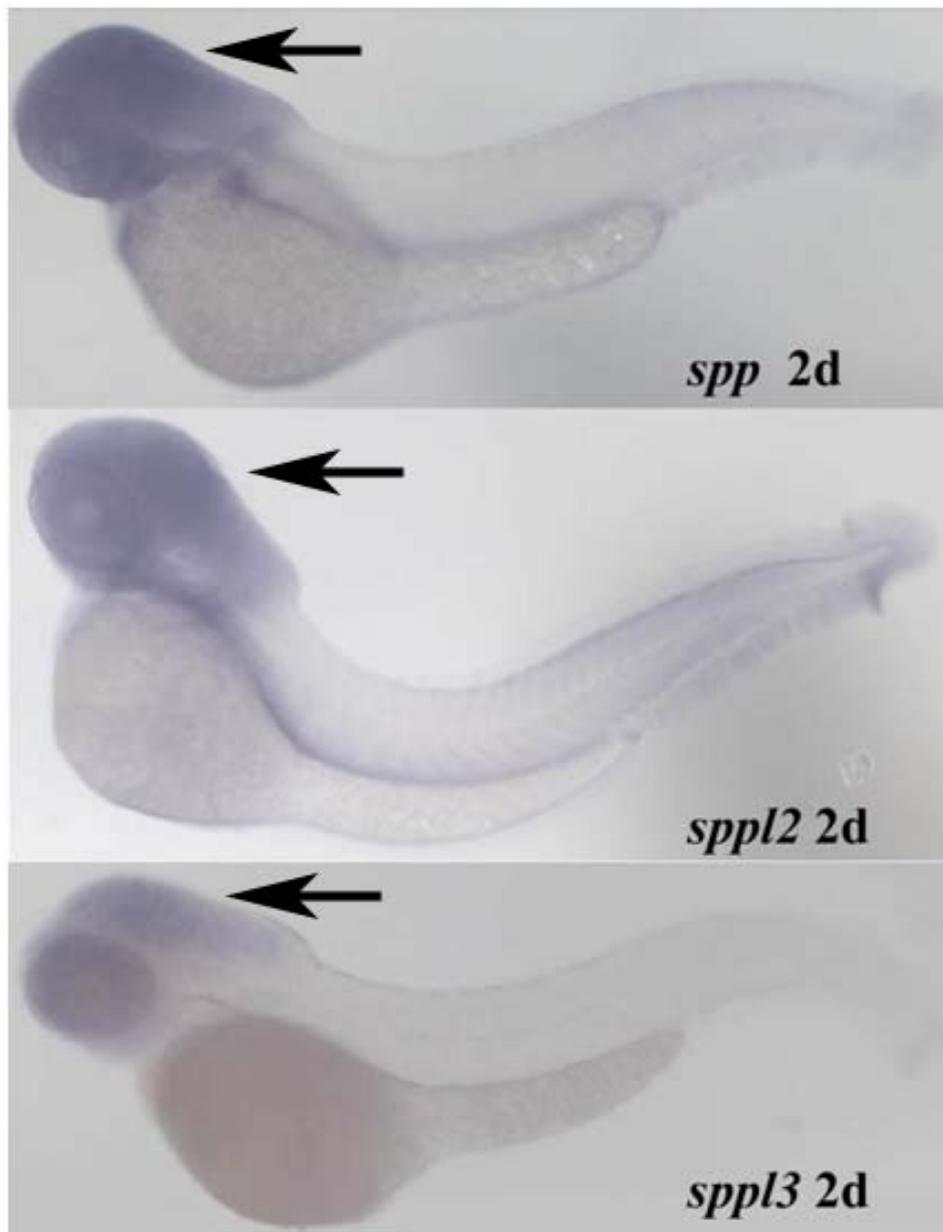


Abbildung 20: Die *spp*, *sppl2* und *sppl3* Expression, dargestellt mittels *in situ* Hybridisierung, ist an Tag 2 besonders prominent im Zentralen Nervensystem.

3.3 Inhibition der Gen Funktion *in vivo*

Oligopeptid Nukleinsäuren (PNAs) können nach dem Prinzip der Watson-Crick-Basenpaarung komplementäre DNA und RNA binden und stabile Duplexe bilden. Duplexe aus mRNA und PNA werden von der Zelle weder gespleißt noch translatiert. Durch Injektion bestimmter PNA Sequenzen ist es daher möglich, die Synthese eines Zielproteins *in vivo* zu inhibieren. Durch dieses Verfahren kann die Funktion eines Gens transient ausgeschaltet werden. Man spricht auch von Genknock down.

3.3.1 Auswahl der GripNAs

Für den Gen knock down im Zebrafisch wurden GripNAs verwendet. Dies sind modifizierte Oligopeptid Nukleotidsäuren. Für jedes Gen kamen dabei zwei verschiedene GripNA Sequenzen zum Einsatz, um die Spezifität des beobachteten Phänotyps zu überprüfen. In der ersten Gruppe wurden die Sequenzen der GripNAs komplementär zu der Region um das AUG Startcodon gestaltet, um die Initiation der Translation zu blockieren (*spp* 1st ATG-Grip, *spp* 2nd ATG-Grip, *sppl2* ATG-Grip und *sppl3* ATG-Grip).

Die zweite Gruppe von GripNAs bindet an Exon-Intron-Übergänge in der prä-mRNA und verhindert so einen korrekten Spleißvorgang (Draper et al, 2001). In dem alternativen Spleißprodukt kann ein Exon fehlen, das Intron nicht herausgespleißt sein, oder es werden abhängig von Intron und Exon Sequenz alternative Spleißstellen genutzt. Die GripNA Sequenzen (*spp* GT-Grip, *sppl2* GT-Grip und *sppl3* GT-Grip) wurden komplementär zu Donor- bzw. Akzeptorspleißstellen von Exonen gewählt, deren Verlust zu einer Verschiebung im Leserahmen führt (Abbildung 17). Die Translation eines solchen Spleißproduktes führt dadurch zu einem Protein, das in seiner Sequenz maßgeblich verändert ist und mit großer Wahrscheinlichkeit seine ursprüngliche Funktion verliert. Als negativ Kontrollen wurden GripNAs verwendet, die sich von den ATG-Grips in drei Basen unterscheiden (*spp* 1st ATG mismatch-Grip, *sppl2* mismatch ATG-Grip und *sppl3* ATG mismatch-Grip). Alle verwendeten GripNA Sequenzen wurden so ausgewählt, dass sich, abgesehen von ihrer Zielsequenz, keine Übereinstimmungen mit anderen Stellen im Zebrafischgenom ergaben.

3.3.2 Auswirkungen eines *spp* bzw. *sppl3* Funktionsverlustes auf die Zebrafischentwicklung

Inhibiert man die korrekte Prozessierung des *spp* Transkriptes, bzw. des *sppl3* Transkriptes, so führt dies zu einem neurodegenerativen Phänotyp. Etwa 20 Stunden nach Befruchtung der Eizelle und Injektion des *spp* 2nd ATG-Grips kann bei 85 % der Zebrafischembryonen ein

massives Absterben von Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) beobachtet werden (Abbildung 21, B). Dieser Phänotyp lässt sich durch Injektion des *spp* GT-Grips reproduzieren (Tabelle 7). Die absterbenden Zellen sind gleichmäßig über das gesamte Gehirn und das Rückenmark verteilt. Der Schwanz ist häufig spiralförmig gekrümmt. Die Embryonen wurden nach dem Ausmaß der Neurodegeneration in Gruppen mit mild, mittel und stark ausgeprägtem Phänotyp eingeteilt. Eine Injektion erhöhter Grip Konzentrationen führt zu einer Zunahme der Embryonen mit stark ausgeprägter neuronaler Degeneration. Zusätzlich weisen Embryonen dieser Gruppe Defekte in der Somitogenese auf, der Schwanz ist häufig nekrotisch und verkürzt. Diese Embryonen sterben vor dem zweiten Entwicklungstag.

Auch die Injektion der *sppl3* Grips führt zu beträchtlichem Zelltod im ZNS (Tabelle 7). Abhängig von der injizierten Dosis kann Neurodegeneration beobachtet werden, die den *spp* knock down Phänotypen sehr ähnlich ist (Abbildung 21, D). Im Vergleich zu dem *spp* knock down ist der Zelltod im *sppl3* knock down in kranialen und kaudalen Regionen des ZNS prominenter. Injiziert man höhere Dosen der *sppl3* Grips (>0,5 mM) kommt es zunehmend zu Störungen der Somitogenese, der Schwanz wirkt verkürzt und die Elongation bleibt unvollständig. Spontane Bewegungen treten deutlich häufiger als bei Wildtyp Embryonen auf. Auch Anfälle tonisch klonischer Muskelkontraktionen können beobachtet werden.

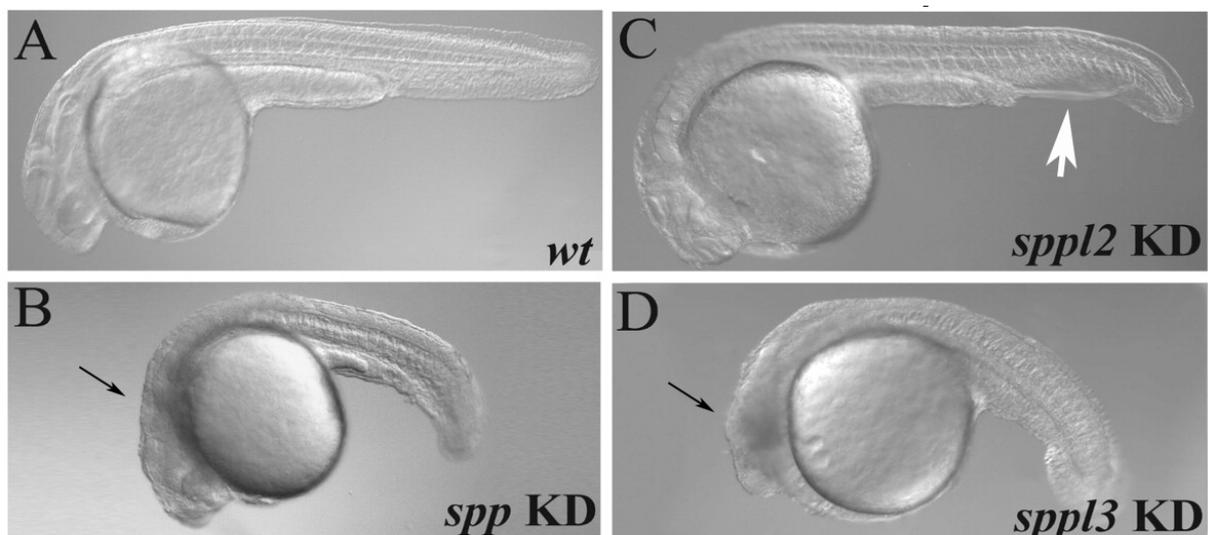


Abbildung 21: Nomarski Aufnahmen eines *wt* Zebrafischembryos und der *spp*, *sppl2* und *sppl3* knock down Phänotypen. Die schwarzen Pfeile deuten auf abgestorbenes Zellmaterial im ZNS der sehr ähnlichen *spp* und *sppl3* Phänotypen. Der *sppl2* Phänotyp ist durch ein Blutgerinnsel in der Schwanzvene charakterisiert (weißer Pfeil).

Zur weiteren Charakterisierung des Zelltods wurde eine TUNEL Färbung durchgeführt. Durch diese Färbung wird gezielt fragmentierte DNA, die typischerweise bei apoptotischem Zelltod

auftritt, angefärbt. Im Zebrafisch tritt Apoptose physiologischer Weise bei der Entwicklung des Nervensystems zwischen dem tail bud- und dem 20 Somiten Stadium auf. In späteren Stadien sind apoptotische Zellen nur noch sehr vereinzelt nachweisbar. Zebrafischembryonen mit einem mild ausgeprägten *spp* bzw. *spp13* Phänotyp wurden 24 h nach Befruchtung angefärbt. Deutlich zu erkennen ist eine Vielzahl apoptotischer Zellen im gesamten ZNS, (Abbildung 22). Im Vergleich hierzu zeigt der im Folgenden beschriebene *spp12* Phänotyp nur vereinzelte apoptotische Zellen und gleicht darin der Wildtyp Kontrolle.

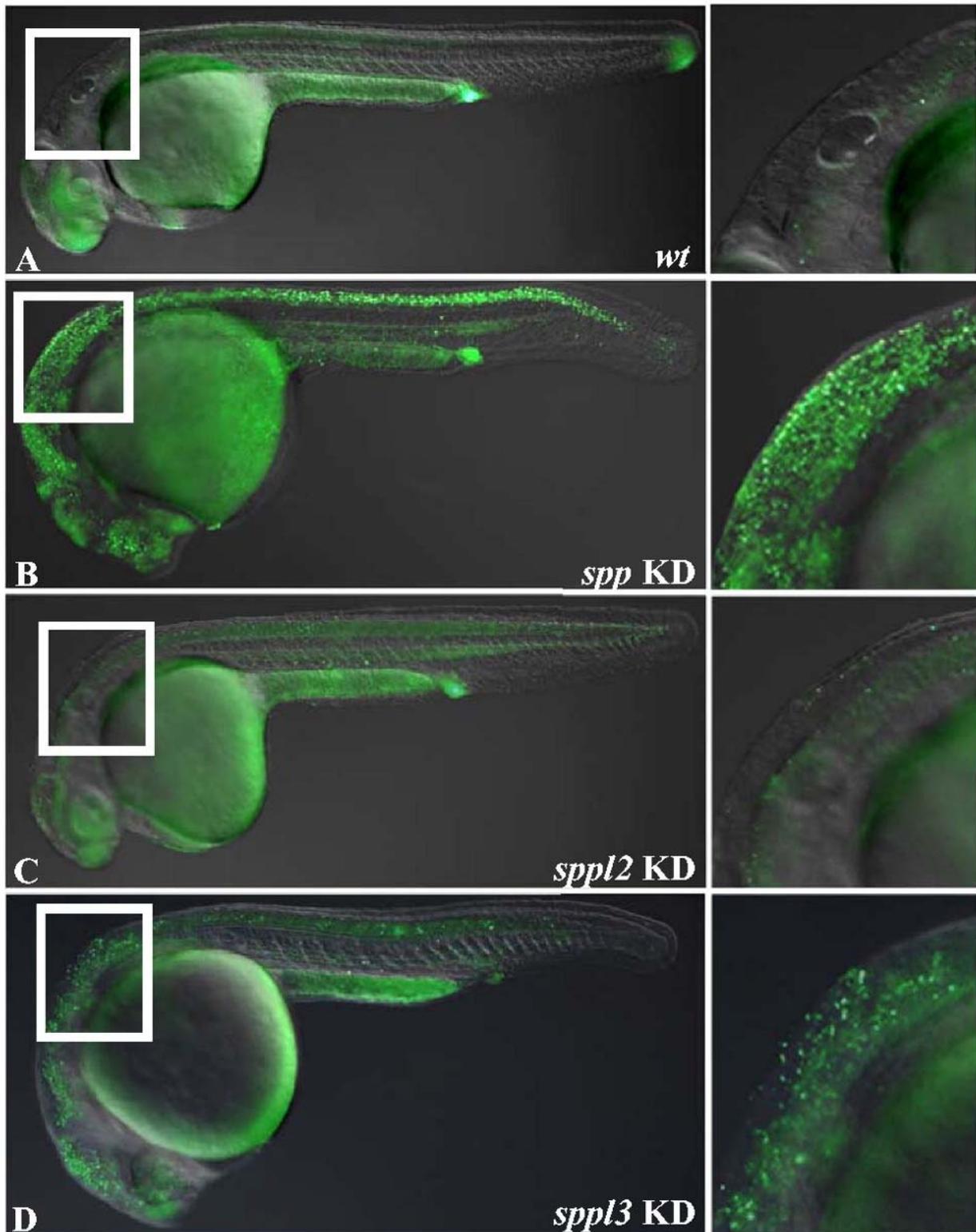


Abbildung 22: TUNEL Färbung von *wt* Embryonen und *spp*, *sppl2* und *sppl3* knock down Embryonen. Im ZNS von *spp* und *sppl3* knock down Embryonen ist eine Vielzahl apoptotischer Zellen zu erkennen. In den Vergrößerungen des Rhombencephalons sind einzeln angefarbte Zellen deutlich abgrenzbar. Die gleichmäßige Fluoreszenz des Dottersacks ist als unspezifischer Hintergrund zu werten. Bei *sppl2* Funktionsverlust weist der Phänotyp hingegen, wie auch der Wildtyp nur vereinzelte apoptotische Zellen auf.

3.3.3 Auswirkung eines *spp12* Funktionsverlustes auf die Zebrafischartwicklung

Nach Injektion der *spp12* Grips läuft die frühe Embryonalentwicklung ungestört ab. Einige Stunden nach Beginn der Zirkulation jedoch, bilden sich Blutgerinnsel in der Schwanzvene (Tabelle 7, Abbildung 25). Erythrozyten sammeln sich im vergrößerten Lumen des Gefäßes an und bringen den Blutfluss in direkt vorgeschalteten Gefäßen zum Erliegen. Teilweise ist die Zirkulation im Schwanzbereich so stark eingeschränkt, dass es zu Nekrosen in der Schwanzspitze kommt. Es wurden fluoreszierende Mikropartikel in die Herzvene (common cardinal vein) injiziert, um die Hämodynamik in kleineren Gefäßen und im Kopfbereich unter dem Mikroskop untersuchen zu können. Alle großen Gefäße sind regelrecht ausgebildet und, abgesehen von der Schwanzvene, entspricht die Blutmenge und Flussgeschwindigkeit, der des Wildtyps.

Im Zebrafisch sind eine Reihe von Genen bekannt, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung des hämatopoetischen Systems und des Gefäßsystems spielen. Die Expressionsmuster dieser Gene und ihr zeitlicher Verlauf sind in Wildtyp Embryonen gut untersucht und in der Literatur beschrieben. Es wurde daher in *spp12* knock down Embryonen mit uasgeprägtem Phänotyp die Expression dieser Marker Gene mittels *in situ* Hybridisierung untersucht. Ein vom Wildtyp abweichendes Expressionsmuster könnte dabei einen Hinweis auf Prozesse geben, in die *spp12* eingebunden ist.

Das Zebrafischgen *flk1* (fetal liver kinase 1) kodiert für ein Rezeptormolekül mit Tyrosinkinase Aktivität und wird ausschließlich auf Endothel Vorläuferzellen exprimiert. Das *flk1/vegfr* Rezeptor-Liganden System spielt eine wichtige Rolle bei der Determinierung endothelialer Zellen (Millauer et al, 1993; Saha et al, 2004). Auch *ephb4* (Ephrin Rezeptor B4) und *flt4* (FMS-like Tyrosine Kinase 4) stammen aus der Familie der Rezeptor Tyrosinkinasen und zeigen ein spezifisches Expressionsmuster in Endothelzellen (Adams & Klein, 2000; Cheng et al, 2002; Lee et al, 1996; Partanen & Paavonen, 2001). Das Expressionsmuster von *flk1*, *ephb4* und *flt4* im vaskulären System von *spp12* knock down Embryonen entspricht dem von Wildtyp Embryonen (Abbildung 23).

Die Stimulation des Rezeptors *flt4* durch seinen Liganden *vegfc* führt zur Proliferation von Endothelgewebe. In *spp12* knock down Embryonen ist ein intensives *flt4* Signal im Bereich der Schwanzvene zu erkennen (Abbildung 23). Bei vereinzelt farbintensiven Zellen im Lumen der Schwanzvene könnte es sich um losgelöste Endothelzellen handeln. Das *flt4* Expressionsmuster ist daher nicht als Abweichung vom Wildtyp zu werten.

T-cell acute lymphocytic leukemia 1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch das Zebrafischgen *scl/tal1* kodiert wird. Dieser Transkriptionsfaktor ist notwendig für die Entwicklung des hämatopoetischen Systems (Begley & Green, 1999; Bloor et al, 2002). Auch das GATA binding protein 2, das durch *gata2* kodiert wird, ist ein Transkriptionsfaktor. *gata2* wird in hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert und ist für die Differenzierung von Erythrozyten erforderlich (Ohneda & Yamamoto, 2002; Perry & Soreq, 2002). Die Blutzellen, die das Gerinnsel in den *spp12* knock down Embryonen bilden, exprimieren *gata2* und *tal1* regelrecht, *spp12* scheint somit deren Regulation nicht zu beeinflussen.

Zusammenfassend kann keine signifikante Änderung im mRNA Expressionsprofil der untersuchten vaskulären und hämatopoetischen Markergene in *spp12* knock down Embryonen festgestellt werden. Obwohl diese Experimente keine Aussage darüber erlauben, ob der *spp12* knock down die beschriebenen Markergene auf der Proteinebene beeinflusst, lässt sich damit eine direkte Beteiligung an der Transkriptionskontrolle dieser Gene ausschließen. Eine Beteiligung von *spp12* an der embryonalen Hämato- und Angiogenese, die daraus abzuleiten wäre, besteht daher nicht.

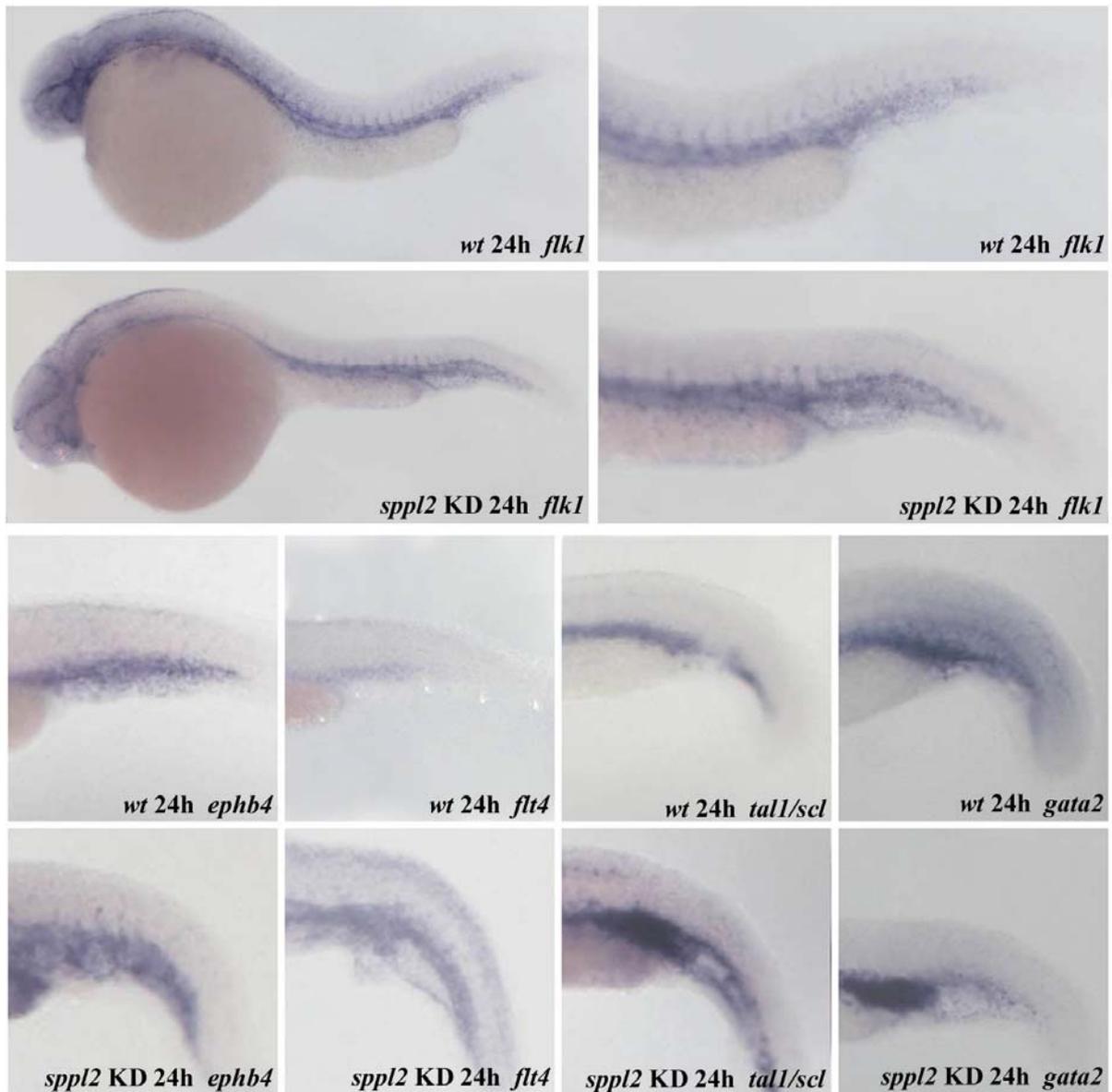


Abbildung 23: Die Gene *flk1*, *ephb4*, *flt4*, *tal1/scl* und *gata2* spielen eine Rolle bei der Entwicklung des hämatopoetischen und vaskulären Systems. Ihre Expression in *spl2* knock down Embryonen gleicht dem Expressionsmuster in Wildtyp Embryonen.

Tabelle 7: Statistik der Grip Injektionen und der Überexpression mutierter mRNA

spp	Konzentration	n	Neuro- degeneration	kein Phänotyp	unspezifisch	p
spp 2nd ATG-grip	0,12mM	97	85%	14%	1%	0,0001
spp GT-grip	1mM	117	70%	28%	2%	0,0001
spp mismatch grip (control)	1mM	47	0%	94%	6%	
spp D268A capped mRNA	0,75µM	110	26%	66%	7%	0,0193
spp wt capped mRNA (control)	1µM	39	5%	85%	10%	

sppl2			Blutgerinnsel	kein Phänotyp	unspezifisch	
sppl2 ATG-grip	1mM	188	76%	22%	4%	0,0001
sppl2 GT-grip	1mM	205	86%	10%	4%	0,0001
sppl2 mismatch grip (control)	1mM	121	4%	95%	1%	
sppl2 GT-grip + sppl2 mRNA	0,75mM +0,36µM	119	41%	54%	5%	0,0001
sppl2 GT-grip (control)	0,36µM	142	86%	8%	5%	
sppl2 D422A mRNA	200pg/nl	123	49%	43%	8%	0,0001
sppl2 wt mRNA (control)	200pg/nl	49	0%	96%	4%	

sppl3			Neuro- degeneration	kein Phänotyp	unspezifisch	
sppl3 ATG-grip	0,5mM	269	84%	14%	2%	0,0001
sppl3 GT-grip	0,5mM	148	70%	27%	3%	0,0001
sppl3 mismatch grip (control)	0,5mM	53	0%	96%	4%	
sppl3 D272A mRNA	0,63µM	159	48%	45%	7%	0,0001
sppl3 wt mRNA (control)	0,63µM	31	0%	94%	6%	

3.3.4 Spezifität und Effektivität der knock down Experimente

Um die Spezifität der knock down Experimente zu zeigen, wurden für jedes Gen zwei in ihrer Sequenz unterschiedliche Grips verwendet. Zusätzlich wurde versucht, den knock down Phänotyp durch Koinjektion der Wildtyp mRNA zu unterdrücken (rescue). Um die Effektivität der knock down Experimente zu beurteilen, wurde die Wirkung der GT-Grips auf mRNA Ebene überprüft.

Bei jeder Injektion wurde in Eizellen desselben Geleges der jeweilige, nicht spezifisch bindende Kontroll Grip als Negativkontrolle injiziert. Auf diese Weise ließen sich unspezifisch veränderte Embryophänotypen, bedingt durch den Injektionsprozess oder eine

eventuelle Toxizität des Grips statistisch herausmitteln. Bei *spp*, *sppl2* und *sppl3* erzeugte sowohl die Injektion eines ATG-Grips, als auch eines GT-Grips den gleichen charakteristischen Phänotyp. Die Injektion des *spp* 1st ATG-Grips hatte keinen Einfluss auf die Zebrafisch Embryonalentwicklung. Der *spp* 2nd ATG-Grip jedoch reproduzierte den charakteristischen Phänotyp, der nach Injektion des *spp* GT-Grips beobachtet wurde. Dabei bindet der *spp* 2nd ATG-Grip an einen Sequenzabschnitt, der fünf Basenpaare weiter in 5'-Richtung liegt, als der Bereich, an den der *spp* 1st ATG Grip bindet. Es ist bekannt, dass einige Grips trotz korrekter Sequenzinformation, nicht den erwünschten Effekt erzielen. Eine mögliche Erklärung hierfür sind bestimmte Sekundärstrukturen der mRNA, die eine Hybridisierung des Grips mit seiner Zielsequenz verhindern.

Die GT-Grips waren so gestaltet, dass sie den korrekten Spleißvorgang verhindern. Aus Embryonen, die mit den GT-Grips injiziert wurden, wurde RNA isoliert. Diese wurde in einer reversen Transkriptase Reaktion in DNA umgewandelt (2.7.1). Anschließend wurde diese cDNA in einer PCR auf die enthaltenen *spp*, *sppl2* und *sppl3* Transkripte untersucht. Die Primer binden an Sequenzabschnitte der Exons, die von dem veränderten Spleißvorgang nicht betroffen sein sollten (Abbildung 17). In *spp* und *sppl3* knock down Embryonen ließen sich PCR Produkte isolieren, die sich in ihrer Länge von den Wildtyp Transkripten unterschieden (Abbildung 24). Die Banden wurden ausgeschnitten, in den Zero Blunt TOPO PCR Vektor kloniert und sequenziert. Der Nachweis von Wildtyp mRNA neben inkorrekt gespleißten Varianten durch GT-Grip Injektion veranschaulicht auch den im Vergleich zu knock out Tiermodellen nur partiellen Funktionsverlust des Gens in knock down Experimenten.

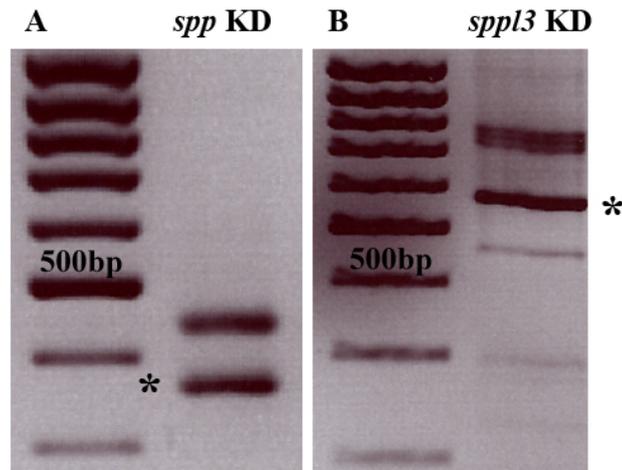


Abbildung 24: In Embryonen, die mit dem *spp* GT-Grip, bzw. mit dem *sppl3* GT-Grip injiziert wurden, lassen sich neben den Wildtyp Transkripten Spleißvarianten nachweisen, die zu einem funktionslosen Protein translatiert werden. (A) In der durch den Sternmarkierten Spleißvariante von *spp* fehlt das Exon 3 sowie ein weiteres 16 Basen langes Fragment. (B) In der durch den Sternmarkierten Spleißvariante von *sppl3* wurde das Intron 3 nicht entfernt.

Der *spp* GT-Grip hybridisiert an das Ende des Exon 3 und an den Anfang des Intron 3. Dieser Exon-Intron Übergang wurde gewählt, da Exon 3 eine Länge von 83 Basen hat (Tabelle 6). Einer Spleißvariante, der dieses Exon fehlt, ist der Leserahmen der folgenden Exons verschoben. In einem Translationsprodukt dieser Spleißvariante würde das GxGD Motiv fehlen. Diese Translationsprodukte würden somit keine katalytische Aktivität mehr besitzen. Um zu überprüfen, ob der GT-Grip den Spleißvorgang beeinflusst, wurde mRNA aus Zebrafisch Embryonen, die mit dem GT-Grip injiziert wurden und den charakteristischen Phänotyp zeigten, isoliert und sequenziert. Tatsächlich zeigten diese Embryonen eine Spleißvariante, in der das Exon 3 fehlt. Darüber hinaus fehlte ein 16 Basen langes Fragment, das zwischen Exon 5 und Exon 6 liegt. Dieses Fragment beginnt mit den Basen GTACG, welche gleichzeitig die ersten fünf Basen des Introns 3 sind, die von dem Grip abgedeckt werden. Das Fragment endet mit den Basen AG, die allgemein als Erkennungssequenz einer Akzeptor Spleißstelle dienen. Das Leseraster dieser Spleißvariante ist nun für Exon 4 und 5 verschoben, hinter dem fehlenden Fragment ergibt sich jedoch das ursprüngliche Leseraster. Trotz partieller Übereinstimmung mit der Wildtyp Sequenz ist ein Funktionsverlust des Translationsproduktes dieser Spleißvariante sehr wahrscheinlich.

Der *sppl3* GT-Grip bindet an den Übergang Exon 5 Intron 5. In Embryonen, die mit diesem Grip injiziert wurden, lässt sich eine Spleißvariante nachweisen in der das komplette Intron 5 nicht herausgeschnitten wurde. Das Intron 5 ist 79 Basenpaare lang, deshalb ist der Leserahmen nach dem Intron 5 verschoben. Die Sequenz des Translationsproduktes weicht

damit in den hinteren zwei Dritteln von der Wildtypsequenz ab. Insbesondere ist damit das GxGD Motiv nicht mehr vorhanden und ein Funktionsverlust erscheint wahrscheinlich.

In Embryonen, die mit dem *sppl2* GT-Grip injiziert wurden, ließ sich mit verschiedenen Primern keine Spleißvariante nachweisen. Wie die Spleißvarianten von *spp* und *sppl3* zeigen, ist das aberrante Spleißprodukt jedoch nur schwer vorherzusagen. Obwohl der funktionelle Nachweis für diesen Grip auf RNA Ebene nicht gelang, erzeugten sowohl der ATG-Grip als auch der GT-Grip die gleichen charakteristischen Phänotypen.

Der partielle Funktionsverlust eines Gens durch knock down kann in einigen Fällen aufgehoben werden, indem man mRNA eines orthologen Proteins koinjiziert. Gelingt diese Genrettung (rescue), so spricht dies für die Spezifität des knock down Experimentes. Wird der knock down durch Injektion eines Spleißstellen Grips erzielt, so lässt sich im rescue Versuch auch die Zebrafisch Wildtyp mRNA verwenden. Der GT- Grip kann nicht an die korrekt gespleißte mRNA binden.

Die cDNA von *spp*, *sppl2* und *sppl3* wurde in den pCS2+ Vektor umkloniert. In einer *in vitro* Transkriptionsreaktion wurde mRNA mit einem 5' cap und einem Poly A Schwanz hergestellt. Genrettungsversuche wurden für alle drei Gene in unterschiedlichen GT-Grip / wt mRNA Konzentrationsverhältnissen durchgeführt. Als Kontrolle wurde Grip ohne mRNA und mRNA ohne Grip in Eier derselben Gelege injiziert.

Bei Injektion von 0,75 mM *sppl2* GT-Grip und 200 ng/µl *sppl2* wt mRNA zeigten 41 % (n=119) der Embryonen das charakteristische Blutgerinnsel in der Schwanzvene. In der 0,75 mM *sppl2* GT-Grip Kontrollgruppe wiesen 86 % (n=142) diesen Phänotyp auf. Die Überexpression mit 200 ng/µl *sppl2* wt mRNA führte zu keinem veränderten Phänotyp. Die Reduktion des *sppl2c* Phänotyps um 45 Prozentpunkte im Vergleich zu Embryonen, die nicht mit der wt mRNA koinjiziert wurden, ist statistisch signifikant (Tabelle 7).

Eine Genrettung der *spp* und *sppl3* Phänotypen gelang nicht in statistisch signifikantem Maße, obgleich das mittlere Überleben der mit Wildtyp mRNA koinjizierten Embryonen höher war (Tabelle 7).

3.4 Der Aspartylrest des GxGD Motivs ist für die Funktion von *spp*, *sppl2* und *sppl3* notwendig

Der transiente partielle Funktionsverlust der Zebrafischgene *spp*, *sppl2* und *sppl3* verursacht die beschriebenen, charakteristischen Phänotypen. Injiziert man hingegen die mRNA dieser Gene in die befruchteten Eizellen, so entwickeln sich normale Embryonen, die den Wildtyp

Kontrollen gleichen. Der Anteil der injizierten mRNA überwiegt den Anteil der jeweiligen von der Zelle synthetisierten mRNA bei weitem. Bei Überexpression von *spp* leitet sich demnach der Großteil der Proteasen aus der Translation der injizierten *spp*mRNA ab. Injiziert man mRNA, die sich von ihrer Wildtypsequenz unterscheidet, so dominiert auf Proteinebene die mutierte *spp* Variante. Eine relative Erhöhung des Anteils funktionsloser Proteasen reduziert den Substratumsatz in Sinne einer kompetitiven Hemmung und ist damit im Effekt einer Runterregulation, wie sie durch knock down Experimente erreicht wird, vergleichbar. Eine *spp* Mutante, die enzymatisch funktionslos ist, sollte somit den in den knock down Experimenten beobachteten Phänotyp reproduzieren können. Aufgrund dieser Überlegung wurde mRNA der Gene *spp*, *spl2* und *spl3*, in denen das Codon für den Aspartylrest des GxGD Motivs gegen ein Codon für einen Alaninrest ausgetauscht ist, injiziert. Die analoge Mutation in der humanen SPP führt zu einem Verlust der Proteaseaktivität (Weihofen et al, 2002). Bei den postulierten Aspartylproteasen *spl2* und *spl3* sollte diese Mutation demnach ebenfalls zu einem Funktionsverlust führen, falls es sich tatsächlich um Aspartylproteasen des GxGD-Typs handelt.

In der *spp* Sequenz wurde das Adenin an Basenposition 803 zu einem Cytosin mutiert, dies führt nach dem Translationsvorgang zu einem Alaninrest statt eines Aspartylrestes an Position 268 des Proteins. 26 % der Embryonen (n=110), die mit einer Konzentration von 300 ng/µl dieser mRNA injiziert wurden, zeigen den *spp* knock down Phänotyp (Abbildung 25, B', B'') (Tabelle 7). In der Sequenz von *spl2* wurde das Adenin an Position 1268 zu einem Cytosin mutiert und damit der Aspartylrest an Position 422 gegen einen Alaninrest ausgetauscht. Bei einer injizierten Konzentration von 200 ng/µl zeigen 49 % (n=123) das charakteristische Blutgerinnsel in der Schwanzvene (Abbildung 25, C', C'') (Tabelle 7). Bei *spl3* wurde der Aspartylrest an Position 272 zu einem Alaninrest mutiert, indem das Adenin an Position 815 durch Cytosin ausgetauscht wurde. Überexpression mit 250 ng/µl dieser mRNA führte bei 48 % der Embryonen (n=159) zu dem typischen neurodegenerativen Phänotyp (Abbildung 25, D', D'') (Tabelle 7). Als Kontrolle wurde jeweils Wildtyp mRNA in gleicher Konzentration injiziert. Diese wirkt sich nicht toxisch auf die Emryonalentwicklung des Zebrafisches aus. Die beobachteten Phänotypen, die denen der knock down Experimente gleichen, sind daher auf einen erhöhten relativen Anteil der Aspartylmutanten zurückzuführen. Die Mutation des Aspartylrestes des hochkonservierten GxGD Motivs führt somit zu einem Funktionsverlust der Proteasen.

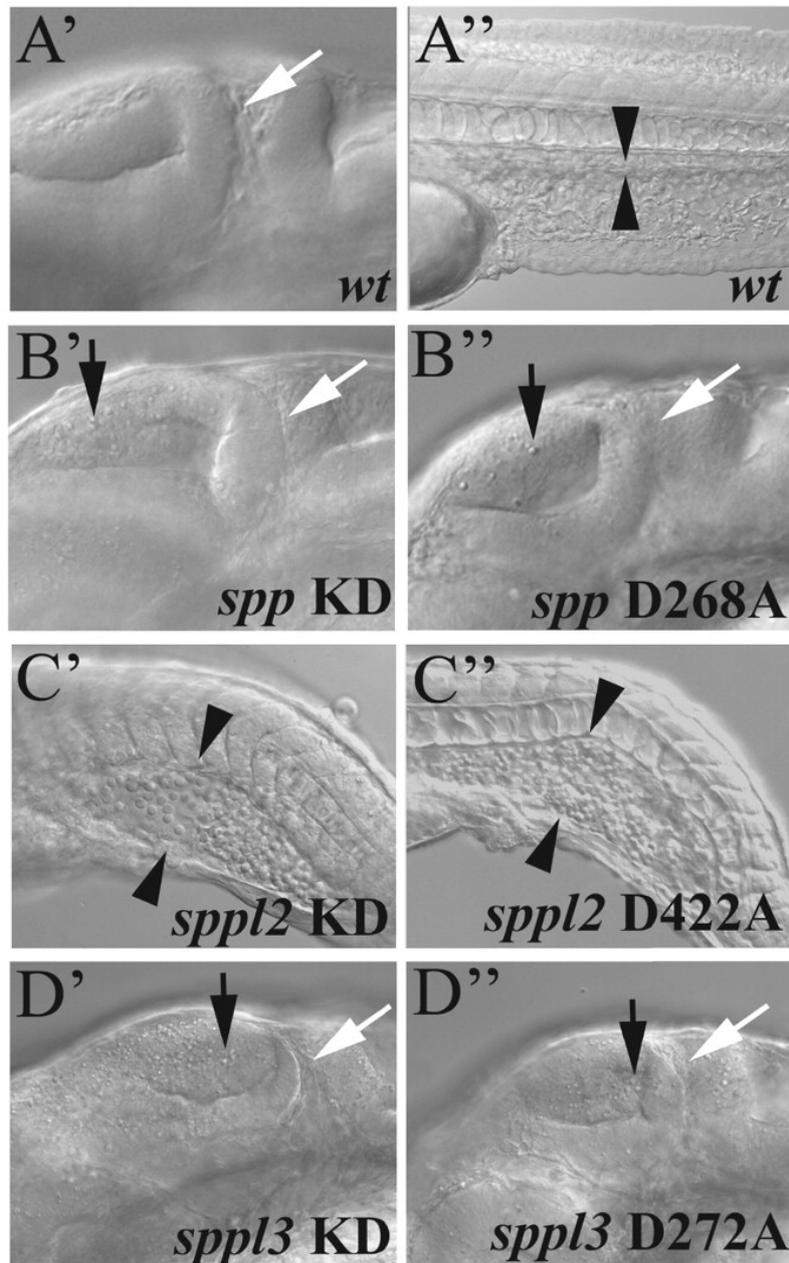


Abbildung 25: Die Injektion von mutierter mRNA reproduziert die knock down Phänotypen. Der weiße Pfeil in B', B'', D' und D'' markiert, zur anatomischen Orientierung, die Grenze zwischen Mesencephalon und Rhombencephalon. Die schwarzen Pfeile markieren in diesen Bildern abgestorbene Zellen, die sich aus dem Zellverband gelöst haben und im Liquor des Ventrikels schwimmen. Als Vergleich dient die Struktur im Wildtyp A'. Die schwarzen Pfeilköpfe in C' und C'' markieren die aufgeweitete Schwanzvene mit dem charakteristischen Gerinnsel, im Gegensatz zur normal großen Vene im Wildtyp A'.

3.4.1 Immunpräzipitation von SPP, SPPL2b und SPPL3 mit einem Aspartylprotease Inhibitor

Die Struktur des katalytisch aktiven Zentrums eines Enzyms kann mithilfe von Protease-Inhibitoren charakterisiert werden, die den Übergangszustand des Enzyms blockieren. Für die γ -Sekretase wurden einige peptidomimetische Inhibitoren entworfen, die in ihrer Struktur Substraten nachempfunden sind (Wolfe et al, 1999b). Der Inhibitor kann dabei mit der Protease einen Enzym-Inhibitor-Komplex eingehen, der dem Enzym-Substrat-Komplex im Übergangszustand gleicht, ohne dass der Inhibitor jedoch geschnitten werden kann. Das Enzym ist somit für den weiteren Substratumsatz blockiert.

In den von Esler *et al.* verwendeten Inhibitoren simuliert die Alkoholgruppe den Übergangszustand, die F-C Bindung kann nicht physiologisch gespalten werden (Abbildung 26) (Esler et al, 2000). Eine andere Klasse von Inhibitoren stellen die von Beher *et al.* verwendeten Hydroxyethylen Dipeptid Isomere dar (Abbildung 26) (Beher et al, 2003; Ripka et al, 2001; Shearman et al, 2000).

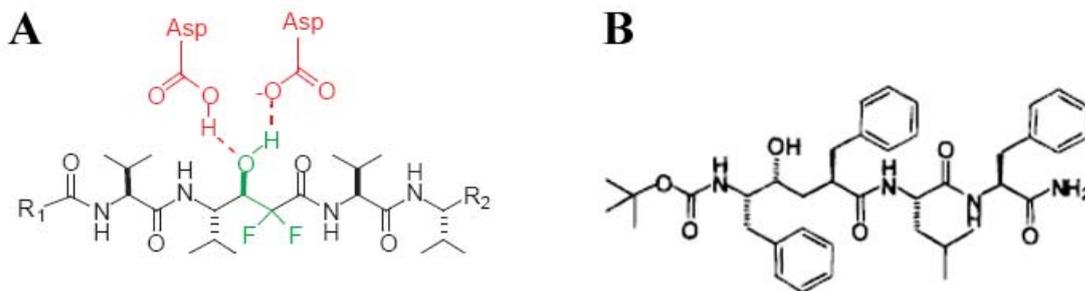


Abbildung 26: Bei der Hemmung der γ -Sekretase-Aktivität kommen peptidomimetische Inhibitoren, die den Übergangszustand des Substrates simulieren, zum Einsatz. Die physiologische Proteolyse wird durch einen Difluor Alkoholanteil (A), oder durch ein Hydroxyethylen Dipeptid isomer (B) verhindert.

Es zeigte sich, dass bei der Wahl der Restgruppen relativ große Variationen möglich sind, ohne dadurch das Bindeverhalten negativ zu beeinflussen. Dieser Spielraum kann genutzt werden, um z.B. biotinylierte Inhibitoren herzustellen, die es ermöglichen, den Enzym-Inhibitor-Komplex zu isolieren.

Die Sequenzähnlichkeit im Bereich der enzymatisch essentiellen Aspartylreste der SPP Familie und der Presenilinkönnte auch eine strukturelle Ähnlichkeit des katalytisch aktiven Zentrums bedingen. Tatsächlich konnte mit Hilfe biotinylierter γ -Sekretase-Inhibitoren ein

SPP-Inhibitor-Komplex isoliert werden (Nyborg et al, 2004; Weihofen et al, 2002). Für andere Mitglieder der SPP Familie wurden derartige Experimente bisher nicht gezeigt.

Mit dem Aspartylprotease-Übergangszustand-Inhibitor Merck A und seiner biotinylierten Variante Merck C, sollte die Präzipitation des SPP-Inhibitor-Komplexes reproduziert und darüber hinaus die Präzipitation eines SPPL2b-Inhibitor- und eines SPPL3-Inhibitor-Komplexes versucht werden.

Hierzu wurden die mit der myc Sequenz markierten humanen Proteine SPP, SPPL2b und SPPL3 in stabil transfizierten HEK293 Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die Membranen präpariert. Diese Membranproteinlösung wurde mit 0,2 μ M Merck C inkubiert. Die Enzym-Inhibitor-Komplexe wurden mit an Streptavidin gekoppelten Sepharose Kügelchen gefällt. Als Negativkontrolle diente eine gleiche Membranproteinlösung, die mit der gleichen Menge Merck C und zusätzlich fünfzigfachem Überschuss an nicht biotinyliertem Merck A inkubiert wurde. Dabei verdrängt der nicht biotinylierte Inhibitor den biotinylierten Inhibitor kompetitiv von seiner Bindungsstelle und reduziert so die Präzipitation des Enzym-Inhibitor-Komplexes etwa um den Faktor fünfzig. Für SPP konnten die Daten aus (Nyborg et al, 2004) reproduziert werden (Abbildung 27). Die Menge an SPPL2b und SPPL3, die sich mit dem Inhibitor Merck C im Präzipitat anreichern ließ, ist im Vergleich zur eingesetzten Protein Menge sehr gering, so dass der Unterschied im Präzipitat im Vergleich zur Negativkontrolle als nicht signifikant zu werten ist.

Geometrische Unterschiede des aktiven Zentrums könnten die verminderte Affinität des Inhibitors zu SPPL2b und SPPL3 erklären. Inwieweit der Inhibitor den Substratumsatz vermindert, muss erst noch in Substratumsatzexperimenten getestet werden.

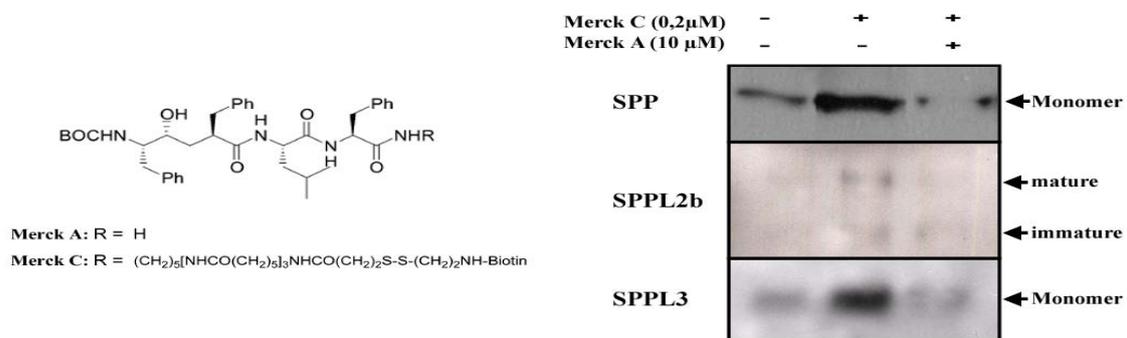


Abbildung 27: Mit dem biotinylierten Aspartylprotease Inhibitor Merck C lassen sich die Enzym-Inhibitor-Komplexe präzipitieren und die Protease kann im Western Blot nachgewiesen werden. Die abgebildeten Western Blot Daten zu SPPL2b und SPPL3 wurden von Dr. R. Flührer zur Verfügung gestellt.

4 Diskussion

Die Expressionsanalysen der SPP Familie während der Embryonalentwicklung des Zebrafisches haben ergeben, dass diese Gene ubiquitär transkribiert werden. Die knock down Experimente belegen, dass *spp*, *sppl2* und *sppl3* essentiell für die Embryogenese sind. Ein Funktionsverlust resultiert in einem charakteristischen Phänotyp. Alle Mitglieder der SPP Familie sind intramembranäre Aspartylproteasen des GxGD Typs: Dominiert die funktionslose Aspartylmutante, so lassen sich die knock down Phänotypen reproduzieren. Diese Ergebnisse sollen in Bezug auf potentielle physiologische Funktionen der Mitglieder der SPP Familie diskutiert werden.

4.1 Expressionsmuster der SPP Familie in anderen Spezies

Die Expression der Signalpeptidase wurde während der Embryonalentwicklung neben dem Zebrafisch auch in der Maus (Urny et al, 2003) und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Casso et al, 2005) untersucht. In der Maus konnten *Spp* Transkripte 6,5 Tage nach Befruchtung durch *in situ* Hybridisierung mit den entsprechenden antisense Proben in allen Keimschichten nachgewiesen werden. 8,5 Tage nach Befruchtung und einen Tag bevor die Bildung des Neuralrohrs abgeschlossen ist, sind Unterschiede in der Expressionsstärke zu erkennen. Das Neuroepithel zeigt deutlichere Signale als das umgebende Mesenchym. Während der weiteren Embryonalentwicklung steigt die Expression von *Spp* auch in nicht neuronalem Gewebe an, besonders deutlich in der Leber. Die Expression im peripheren Nervensystem bleibt die gesamte Embryonalentwicklung hindurch hoch, im zentralen Nervensystem hingegen schwächt sie sich ab. *In situ* Hybridisierungen, die an Gehirnschnitten erwachsener Mäuse durchgeführt wurden, zeigen eine intensive Expression von *Spp* im Hippocampus, der Amygdala, dem plexus piriformis, dem plexus choroideus und dem nucleus arcuatus des Hypothalamus. Höhere Vergrößerungen deuten darauf hin, dass *Spp* in diesen Strukturen vorwiegend in den Nervenzellen exprimiert ist. Verschiedene adulte murine sowie humane Gewebeextrakte wurden im Northern Blot auf *Spp* Expression getestet. Dabei ergaben sich für Leber-, Nieren- und Plazentagewebe die höchsten Expressionslevel (Urny et al, 2003). Die prominente Expression in neuronalem Gewebe stimmt mit den Beobachtungen im Zebrafisch überein.

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* lassen sich während der frühen Stadien der Embryonalentwicklung, einschließlich der Gastrulationsperiode keine *Spp* Transkripte durch

in situ Hybridisierung mit den entsprechenden *Spp* antisense Proben detektieren. *Spp* Transkripte können erstmals während der Keimblatt Extension in einer Region kaudal der stomodealen Invagination nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf ist die Expression in drei tubulären Organen, den Speicheldrüsen, dem Proventrikel (Teil des vorderen Darmrohres kaudal des Ösophagus) und der Trachea prominent. Die Expression von *Spp* in den Speicheldrüsen ist von *Sex combs reduced (Scr)* abhängig, einem homeotischen Gen, das für die Bildung der Speicheldrüsen notwendig ist. Im zentralen und peripheren Nervensystem der Fliege sind keine *Spp* Transkripte nachweisbar (Casso et al, 2005).

Vergleicht man die SPP Expression während der Embryonalentwicklung von Maus, Fruchtfliege und Zebrafisch, so lässt sich kein einheitliches Muster erkennen. Es finden sich zwar Gemeinsamkeiten in der Expressionsdynamik im zentralen Nervensystem von Maus und Zebrafisch, in der Fruchtfliege hingegen ist in diesen Geweben kein intensives Signal nachzuweisen. Ein Vergleich des prominenten Signals in der Trachea der Fruchtfliege ist mangels entsprechender Strukturen in Maus und Zebrafisch nicht möglich. Im Zebrafisch waren in frühen Stadien die *spp* Transkripte nicht durch *in situ* Hybridisierungen nachweisbar (Abbildung 18), ließen sich jedoch mit der sensitiveren RT-PCR detektieren (Abbildung 19). Für die frühen Stadien von Maus und Fruchtfliege, in denen die *in situ* Hybridisierungen negativ ausfielen, wurden keine RT-PCR Reaktionen durchgeführt. Es lässt sich daher noch nicht eindeutig entscheiden, ob SPP in diesen Spezies, wie im Falle des Zebrafischs, maternal vererbt wird.

Zur Expression der anderen Mitglieder der SPP Familie liegen Microarraydaten unterschiedlicher adulter, humaner Gewebe vor (Friedmann et al, 2004). mRNA von SPP, SPPL2a, SPPL2c und SPPL3 lässt sich sowohl in muskulären (Herz), neuronalen (Gehirn, Retina) und fibrodermalen (Haut) Gewebeproben, als auch in unterschiedlichen Organsystemen und exo- und endokrinen Geweben (Lunge, Niere, Lymphknoten, Pankreas, Nebennierenrinde, Hoden, Ovarien, Brustdrüse, Thymus, Schilddrüse) nachweisen. Die Expression von SPPL2b in der Nebennierenrinde und in der Brustdrüse ist prominenter als in den anderen Geweben. Betrachtet man die Expression aller Mitglieder der SPPL2 Subfamilie zusammengenommen, so ist auch hier kein ausgezeichnetes Gewebe erkennbar.

Die Expressionsdaten der humanen Gewebeproben sind mit den embryonalen Zebrafisch Expressionsmustern der *in situ* Hybridisierungsexperimente nur bedingt vergleichbar. Zum einen handelt es sich bei den humanen Gewebeproben um eine Mischung aller in einem Gewebe vorhandenen Zelltypen. Es ist daher nicht möglich zu unterscheiden, ob z.B. die

detektierte mRNA der Gehirngewebeproben aus Neuronen, Mikroglia oder Oligodendrozyten stammt. Zum anderen handelt es sich bei den humanen Proben um adultes Gewebe. Bei den Zebrafischproben wurden hingegen embryonale Stadien bis zum maximal zweiten Tag untersucht. Auch die Sensitivität der Microarray Experimente ist höher als die der *in situ* Hybridisierungsexperimente. Die ubiquitäre Expression der Transkripte *spp*, *spp12* und *spp13* in frühen Stadien der Zebrafischentwicklung ist daher den in humanen Geweben beobachteten Expressionsmustern ähnlich und eine Expression über die beobachteten neuronalen Gewebe hinaus in späteren Stadien ist nicht auszuschließen.

Die beschriebenen Expressionsprofile der SPP Familie in den untersuchten Spezies ergeben kein einheitlich wiederkehrendes, charakteristisches Muster, wie es z.B. von Morphogenen bekannt ist. Vielmehr lässt die frühe ubiquitäre und abundante Expression speziell im zentralen Nervensystem auf eine essentielle Funktion in den unterschiedlichsten Gewebetypen schließen.

4.2 Funktionelle Analyse von SPP in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*

Die korrekte Expression von SPP ist, wie auch im Zebrafisch, notwendig für die Embryonalentwicklung der Fruchtfliege und des Fadenwurms. Wird das *Spp* Gen in *Drosophila melanogaster* gezielt ausgeschaltet, entwickeln sich die Fruchtfliegen nicht über das Larvenstadium hinaus (Casso et al, 2005). Casso und Mitarbeiter konnten zeigen, dass *Spp* loss-of-function Mutanten charakteristische Defekte in Geweben aufweisen, in denen die Expression von *Spp* sehr hoch ist. Während der normalen Embryonalentwicklung wird die Flüssigkeit aus den Lumina der trachealen Tubuli ab einem bestimmten Stadium resorbiert, so dass sie sich mit Luft füllen können. Dieser Schritt bleibt bei den Mutanten aus. Auf der anderen Seite führt die Überexpression von *Spp* zu Entwicklungsdefekten in Regionen, in denen *Spp* physiologisch nur schwach exprimiert ist. In den Flügeln und Extremitäten verursacht eine erhöhte *Spp* Konzentration Malformationen. Die Embryonalentwicklung scheint folglich empfindlich auf Konzentrationsunterschiede im Expressionsmuster zu reagieren.

In der Fruchtfliege ließen sich die Phänotypen der *Spp* loss-of-function Mutanten verhindern, indem eine Kopie des genomischen Fragments, auf dem das *Spp* Gen liegt, künstlich in das Mutantengenom eingefügt wurde. In diesem Genrettungsversuch wird die Expression durch den *Spp* Promoter der Fruchtfliege kontrolliert. In den Genrettungsversuchen, die im

Zebrafisch unternommen wurden, wurde hingegen die Wildtyp mRNA injiziert. Eine gewebespezifische und differenzierte Expression ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Dies erklärt möglicherweise, weshalb die Genrettungsversuche im Zebrafisch den knock down Phänotyp nicht verhindern konnten.

In *Caenorhabditis elegans* wurde *imp-2* (intramembrane protease 2) als das der humanen SPP orthologe Gen identifiziert. Die Funktion dieses Gens ist essentiell in der Embryonalentwicklung des Fadenwurms (Grigorenko et al, 2004). Wird die Translation des Gens im Fadenwurm durch *Ce-imp-2* RNA Interferenz verhindert, können die Häutungen in allen vier Larvenstadien nicht vollständig durchgeführt werden. Die alte Hülle kann nicht komplett abgestreift werden, sondern bleibt noch am Körper haften (ICS = incomplete shedding of cuticle). Ähnliche ICS Phänotypen wurden für Cholesterin defiziente Würmer beschrieben. Auch der Funktionsverlust einiger Gene, die an der Lipid Steroid Homöostase beteiligt sind, verursacht Häutungsdefekte und ICS ähnliche Phänotypen. Die Expression der zytoplasmatischen Domäne von *Ce-lrp-1*, einem orthologen Gen des humanen LRP1 (lipoprotein receptor related protein 1), konnte den durch *Ce-imp-2* verursachten Funktionsverlust ICS Phänotyp zu einem signifikanten Anteil verhindern. Die Familie der LDL Rezeptormoleküle spielt eine große Rolle in der rezeptorvermittelten Endozytose und bei embryogenetisch wichtigen Signaltransduktionsprozessen (Li et al, 2001). Grigorenko weist auf die Möglichkeit einer direkten Beteiligung von *Ce-imp-2* an der Regulation von *Ce-lrp-1* hin (Grigorenko et al, 2004). Die Spp des Fadenwurms könnte somit an der Steroid Homöostase und an Lipoprotein Rezeptor abhängigen Entwicklungsprozessen beteiligt sein. Im Zebrafisch ist bisher keine orthologe Sequenz zu *lrp-1* bekannt, so dass diese Ergebnisse noch nicht im Fischmodell überprüft werden konnten.

Die Phänotypen, die einen Funktionsverlust der SPP in *Drosophila melanogaster* und *C.elegans* erzeugen, unterscheiden sich von dem beschriebenen Phänotyp des Zebrafischs: Der hervorstechende neuronale Gewebeuntergang ist in Fruchtfliege und Fadenwurm nicht zu beobachten. Die Entwicklungsdefekte, die in der Fliege die Flügel betreffen und im Fadenwurm den Häutungsprozess, sind so speziesspezifisch, dass sie sich schwerlich über die Speziesgrenzenvergleichen lassen. Bemerkenswert sind Entwicklungsdefekte, die in *Drosophila melanogaster* durch Überexpression hervorgerufen werden können. Dies spricht eher für eine Funktion in einem Signaltransduktionsmechanismus als für eine alleinige Funktion bei Abbauprozessen.

4.3 Reifungsprozess und subzelluläre Lokalisation von SPP, SPPL2b und SPPL3

Für eine unterschiedliche, nicht redundante biologische Funktion von SPP/SPPL3 und SPPL2b sprechen neben den verschiedenartigen Phänotypen nach knock down auch eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zelle. Der Reifungsprozess und die subzelluläre Lokalisation von SPP und der Homologen SPPL2b und SPPL3 wurden in Zellkulturexperimenten von Dr. R. Fluhrer und Dr. C. Haffner untersucht (Krawitz et al, 2005). Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass SPP und SPPL3 mit ER Markern kolokalisieren (Abbildung 28). Für eine Lokalisation dieser Proteasen im ER spricht darüber hinaus das ER Rückhaltesignal KKXX am C-Terminus (Vincent et al, 1998).

SPPL2b hingegen durchläuft einen posttranslationalen Reifungsprozess mit Glykosylierungen im N-terminalen Bereich der Protease (Friedmann et al, 2004; Krawitz et al, 2005). In der indirekten Immunfluoreszenz kolokalisiert SPPL2b mit lysosomalen und endosomalen Markern (Abbildung 28) (Krawitz et al, 2005).

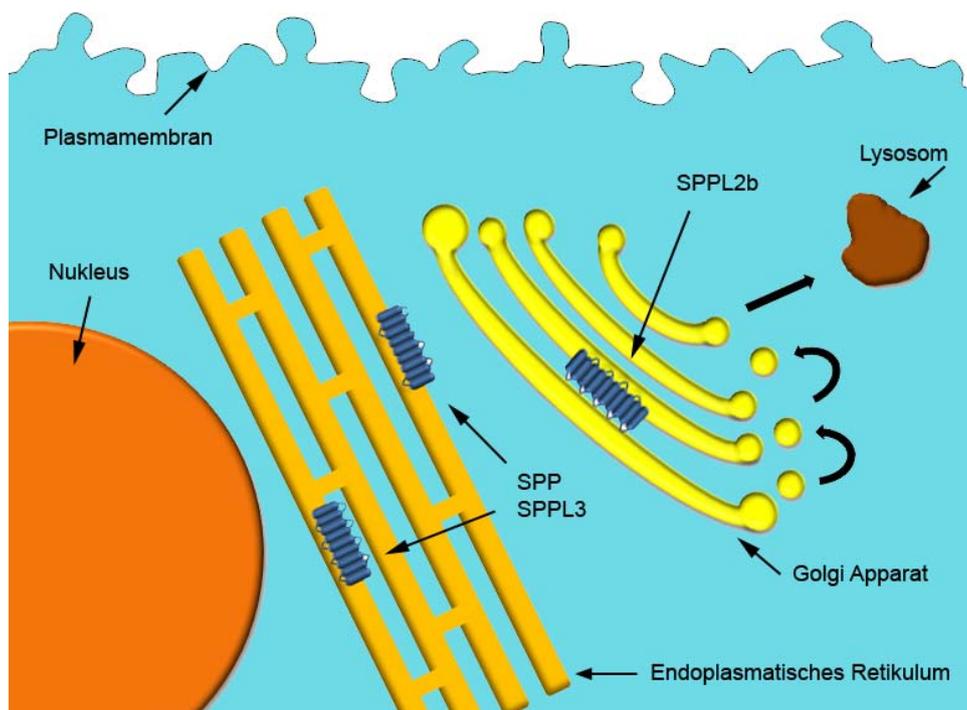


Abbildung 28: Schematische Darstellung der subzellulären Lokalisation. SPP und SPPL3 werden im ER zurückgehalten, während SPPL2b den Golgiapparat durchläuft und mit endosomalen und lysosomalen Markern kolokalisiert.

4.4 Neurodegenerative Phänotypen im Zebrafisch

In Tübingen wurde 1996 ein groß angelegter genetischer Screen durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die die Zebrafiscentwicklung beeinflussen (Haffter et al, 1996). Von den 1163 beschriebenen Mutanten wiesen 19 % einen neurodegenerativen Phänotyp (NED) auf. Beginn, Dauer der Degeneration und Verteilung der sterbenden Zellen sind hierbei spezifische Merkmale der NED Mutanten. Es wurde versucht die Mutanten anhand dieser Parameter in vier Klassen einzuteilen (Furutani-Seiki et al, 1996). Zebrafische der Klasse I zeigen späte fokale Neurodegeneration. Vertreter dieser Klasse zeigen z.B. lokal begrenzte degenerative Veränderungen im Tectum, Tegmentum, im dorsalen Rhombenzephalon oder in der Retina. Oft ist diese Degeneration transient und führt im weiteren Verlauf zu verkleinerten und deformierten Köpfen. Mutanten der Klasse II sind durch frühe fokale neuronale Degeneration charakterisiert. Es kommt zu vorübergehender lokaler Degeneration des Dienzephalon, des Rhombenzephalon oder des Rückenmarks um die zwanzigste Stunde nach Befruchtung, die weitere Entwicklung ist verzögert. In der Klasse III finden sich Mutanten, bei denen sich die Neurodegeneration im Tectum oder dorsalen Rhombenzephalon beginnend über das gesamte Nervensystem ausbreitet. Die Mutanten der Klasse IV weisen frühe Degeneration des gesamten Neuroepithels auf. Nach 30 Stunden ist das gesamte neuroektodermale Gewebe degeneriert und die Embryos sterben. Die Phänotypen, die beim knock down von *spp* und *spl3* beobachtet und beschrieben wurden, lassen sich hinsichtlich des frühen Beginns und des generalisierten Ausmaßes der Neurodegeneration in der von Furutani-Seiki vorgeschlagenen Klassifikation der Klasse IV zuordnen.

Es stellt sich nun die Frage in wieweit die beobachteten Phänotypen die physiologischen Aufgaben, die *spp* und *spl3* in der Zelle ausführen, eingrenzen könnten. In der Literatur wird die physiologische Funktion von SPP noch kontrovers diskutiert. Viele Signalpeptide und weitere Typ II Membranproteine erfüllen die Kriterien, die erforderlich sind, um durch SPP prozessiert zu werden (vgl. 1.3). Das mögliche Substratspektrum ist also sehr groß. In Bakterien reinigt die Endoprotease IV (Ichihara et al, 1986) die Zellmembran von Signalpeptiden und anderen überflüssigen membranständigen Fragmenten. Die Endoprotease IV ist jedoch nicht strukturverwandt mit den SPPs eukaryontischer Organismen und es existieren keine Homologen Proteasen in deren Genomen. Die Vermutung liegt daher nahe, dass auch SPP eine „Membran Reinigungsfunktion“ ausüben könnte und unspezifisch membranständige Proteinfragmente degradiert. Fraglich ist, in wieweit eine solche

Beteiligung am Membranmetabolismus erforderlich ist, um die Struktureigenschaften der Lipidmembran aufrecht zu erhalten.

Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Spaltprodukte vieler Signalpeptide nicht nur reine Abbauprodukte sind, sondern darüber hinaus Bestandteile wichtiger Regelungsmechanismen sein können (Martoglio, 2003; Martoglio & Dobberstein, 1998). Die folgenden zwei bereits aus der Einleitung bekannten Spaltprodukte, sollen noch einmal exemplarisch wiederholen, wie eine Einbindung von SPP in Prozesse der Zell-Zell Interaktion, sowie zellinterne Signalkaskaden vorstellbar wäre.

Das N-terminale Fragment der HLA Signalsequenzen spielt bei der Selbst-Fremd Erkennung durch das Immunsystem eine wichtige Rolle. Diese Fragmente werden über HLA-E Rezeptoren den NKG2A/C Rezeptoren der natürlichen Killerzellen präsentiert und modulieren auf diese Weise deren Aktivität. Eine Störung dieses Mechanismus kann dadurch zu einer autoaggressiven zytotoxischen Reaktion der natürlichen Killerzellen führen. Die natürlichen Killerzellen werden dem angeborenen Immunsystem zugerechnet, einem stammesgeschichtlich betrachtet relativ alten Teil des Immunsystems. Im Zebrafischgenom wurden Gene identifiziert, die für Rezeptormoleküle kodieren, die den humanen natürlichen Killerzellrezeptoren NKG2A/C ähnlich sind (Yoder et al, 2004; Yoder et al, 2001; Yoder et al, 2002). Es ist daher zumindest vorstellbar, dass der *spp* knock down im Zebrafisch zu durch das Immunsystem vermittelten zytotoxischen Reaktionen führen und so den beobachteten Zelltod erklären könnte.

Ein anderes in der Einleitung kurz beschriebenes Spaltprodukt von SPP, ist das Signalpeptid Fragment des Präprolaktin. Das Besondere an diesem Spaltprodukt ist seine basisch amphipathische α -Helixstruktur, die eine Interaktion mit Calmodulin ermöglichen würde. Calmodulin dient in der Zelle als Messfühler der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration und ist an vielen Kalzium abhängigen Signalkaskaden beteiligt (Bole-Feysot et al, 1998).

Der Zusammenhang zwischen der neuronalen Degeneration und dem Funktionsverlust von SPP könnte also zum einen in Störungen des Zellmetabolismus liegen. Das zentrale Nervensystem wäre davon in besonderem Maße betroffen, da dieses Gewebe einen hohen Energieumsatz aufweist und auf aeroben Stoffwechsel angewiesen ist. Zum anderen könnten jedoch auch Defekte in Signalkaskaden, an denen die Signalpeptidpeptidase beteiligt ist, zu Störungen in der Zellteilung oder Differenzierung des neuroepithelialen Gewebes führen.

4.5 Der *sppl2* Funktionsverlust im Zebrafisch

Das charakteristische Merkmal im Phänotyp der Zebrafischembryonen, bei denen ein knock down von *sppl2* durchgeführt wurde, ist die ödematöse Vergrößerung der Schwanzvene und die dortige Ansammlung von Blutzellen. Bei der Entstehung eines Blutgerinnsels können nach Virchow ursächlich drei Faktoren unterschieden werden, die es bei der Aufklärung der Pathogenese zu untersuchen gilt: Eine Endothelalteration, eine Veränderung der Blutströmungsgeschwindigkeit und eine Veränderung der Blutbeschaffenheit oder des Gerinnungssystems.

Die Angiogenese und Hämatogenese während der Embryonalentwicklung wurden mit Hilfe bestimmter Markergene untersucht. In *sppl2* knock down Embryonen konnte dabei keine signifikante Änderung im Expressionsprofil dieser Markergene beobachtet werden. Defekte in der Endothelialisierung und ein verändertes Strömungsverhalten aufgrund einer gestörten Angiogenese sind daher unwahrscheinlich.

Das erst kürzlich von Fluhner, Friedmann *et al.* entdeckte Substrat TNF α der humanen SPPL2a/b ist insbesondere im Hinblick auf den dritten Punkt der Virchow Trias, eine gestörte Koagulation, von Interesse (Fluhner et al, 2006; Friedmann et al, 2006). Wie bereits beschrieben, entspricht den humanen Genen SPPL2a/b/c im Zebrafischgenom die orthologe Sequenz *sppl2*. Es kann daher angenommen werden, dass *sppl2* im Zebrafisch die Funktionen der humanen Proteine SPPL2a/b/c, soweit diese nicht speziesspezifisch sind, erfüllt. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch *sppl2* an der Prozessierung von TNF α Homologen im Zebrafisch beteiligt sein könnte und damit weitere Signaltransduktionswege beeinflusst.

Wie von Friedmann *et al.* gezeigt, löst die intrazelluläre Domäne von TNF α , die durch SPPL2a/b freigesetzt wird, in dendritischen Zellen die Expression von IL 12 aus (Friedmann et al, 2006). Eine Veränderung der Zytokinkonzentrationen, insbesondere auch IL12 steht im Zusammenhang mit einer gestörten Koagulation (Bevilacqua et al, 1986; Naldini et al, 2003; Portielje et al, 2001; Yasim et al, 2008). Möglicherweise beeinflusst daher auch der Funktionsausfall von *sppl2* das Gerinnungssystem im Zebrafisch.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion von SPP und weiteren Mitglieder der SPP Familie. Als Tiermodell wurde hierzu der Zebrafisch, *danio rerio*, verwendet. SPP und ihre Homologen sind Membranproteine mit sieben bis zehn Transmembrandomänen. Alle Mitglieder dieser Familie weisen drei in der Evolution hoch konservierte Aminosäure Motive auf, YD, GxGD und PAL. Diese Motive sind von der intramembranären Aspartylprotease Presenilin, einem Bestandteil der γ -Sekretase, bekannt.

Expressionsanalysen an Zebrafischembryonen ergaben, dass die Transkripte aller drei Gene der SPP Familie im Zebrafisch maternal vererbt werden. Es zeigte sich, dass *spp*, *sppl2* und *sppl3* während der Embryogenese des Zebrafisches in frühen Stadien gleichmäßig ubiquitär exprimiert werden. In späteren Stadien ist die Expression dieser Gene besonders prominent im Bereich des zentralen Nervensystems.

In knock down Experimenten im Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass alle drei Gene eine für die Embryonalentwicklung essentielle Funktion wahrnehmen. Dabei führt der Funktionsverlust von *spp* und *sppl3* zu einem neurodegenerativen Phänotyp, während bei einem Funktionsverlust von *sppl2* ein Zirkulationsdefekt mit Gerinnselbildung in der Schwanzvene auftritt. Dies lässt auf eine nicht redundante Funktion von *spp* und *sppl3* verglichen mit *sppl2* während der Embryonalentwicklung schließen.

Bei allen drei Genen der SPP Familie im Zebrafisch handelt es sich um intramembranäre Aspartylproteasen des GxGD Typs. Dies konnte durch Überexpression mutierter mRNA Konstrukte, in deren Translationsprodukt der Aspartylrest des GxGD Motivs durch ein Alaninrest ersetzt wird, gezeigt werden: Die Mutation des Aspartylrestes des GxGD Motivs führt zu einem Funktionsverlust der Protease, durch den sich die Phänotypen der knock down Experimente reproduzieren lassen.

Aus medizinischer Sicht ist die SPP Familie aus vier Gründen von großem Interesse. Der enzymatische Mechanismus der Substratspaltung weist bei SPP, SPPL2b und vermutlich weiteren Mitgliedern dieser Familie große Ähnlichkeit zum Presenilin der γ -Sekretase auf (Fluhrer & Haass, 2007). Die γ -Sekretase gilt im Kampf gegen die Alzheimer Krankheit als mögliches Ziel einer Protease Inhibitor Therapie. Es ist daher wichtig, zum einen eventuelle Unterschiede im Enzymmechanismus zur SPP Familie aufzudecken, um selektiv wirksame Inhibitoren herstellen zu können, zum anderen müssen die physiologischen Funktionen von SPP und SPPLs weiter aufgeklärt werden, um mögliche Nebenwirkungen durch Kreuzreaktionen von möglichen Alzheimer Therapeutika antizipieren zu können.

Die bekannten Funktionen von SPP und SPPL2a/b selbst bieten mögliche Einsatzgebiete gezielter Pharmakotherapie: Die Inhibition der SPP Funktion scheint eine interessante Option im Kampf gegen den Hepatitis C Virus (Ait-Goughoulte et al, 2006; Heimann et al, 2006; Hope et al, 2006; Majeau et al, 2005). Die physiologische Funktion von SPP und SPPL2a/b bei der Prozessierung von MHC Klasse Ia Signalpeptiden bzw. von TNF α weisen diesen Proteasen auch eine Rolle in immunologischen und inflammatorischen Prozessen zu (Fluhrer et al, 2006; Friedmann et al, 2006; Lemberg et al, 2001), die eventuell modulatorisch ausgenutzt werden könnte.

Die beobachteten Phänotypen in den knock down Experimenten machen den Zebrafisch zu einem vielversprechenden Versuchstier, um z.B. die Wirkung neuer Inhibitorsubstanzen auszutesten.

6 Literaturverzeichnis

- (1995) Genetic nomenclature guide. *Drosophila melanogaster*. *Trends Genet*: 26-29
- Adams RH, Klein R (2000) Eph receptors and ephrin ligands. essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med***10**(5): 183-188
- Ait-Goughoulte M, Hourieux C, Patient R, Trassard S, Brand D, Roingard P (2006) Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *J Gen Virol***87**(Pt 4): 855-860
- Altschul SF, Boguski MS, Gish W, Wootton JC (1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet***6**(2): 119-129
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol***215**(3): 403-410
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science***284**(5415): 770-776
- Beel AJ, Sanders CR (2008) Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci***65**(9): 1311-1334
- Begley CG, Green AR (1999) The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood***93**(9): 2760-2770
- Behr D, Fricker M, Nadin A, Clarke EE, Wrigley JD, Li YM, Culvenor JG, Masters CL, Harrison T, Shearman MS (2003) In vitro characterization of the presenilin-dependent gamma-secretase complex using a novel affinity ligand. *Biochemistry***42**(27): 8133-8142
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol***340**(4): 783-795
- Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. (1986) Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A***83**(12): 4533-4537
- Bloor AJ, Sanchez MJ, Green AR, Gottgens B (2002) The role of the stem cell leukemia (SCL) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification. *J Hematother Stem Cell Res***11**(2): 195-206

- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev***19**(3): 225-268
- Braud V, Jones EY, McMichael A (1997) The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol***27**(5): 1164-1169
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ (1998a) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature***391**(6669): 795-799
- Braud VM, Allan DS, Wilson D, McMichael AJ (1998b) TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol***8**(1): 1-10
- Brown MS, Goldstein JL (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A***96**(20): 11041-11048
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell***100**(4): 391-398
- Casso DJ, Tanda S, Biehs B, Martoglio B, Kornberg TB (2005) Drosophila Signal Peptide Peptidase is an essential protease for larval development. *Genetics*
- Cheng N, Brantley DM, Chen J (2002) The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev***13**(1): 75-85
- Cruts M, Backhovens H, Wang SY, Van Gassen G, Theuns J, De Jonghe CD, Wehnert A, De Voecht J, De Winter G, Cras P, et al. (1995) Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet***4**(12): 2363-2371
- Davies DR (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem***19**: 189-215
- Davisson MT (1995) Genetic nomenclature guide. Mouse. *Trends Genet*: 35-38
- De Strooper B (2005) Nicastrin: gatekeeper of the gamma-secretase complex. *Cell***122**(3): 318-320
- Draper BW, Morcos PA, Kimmel CB (2001) Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis***30**(3): 154-156
- Du H, RAF, J. Li, A. Corkan, J. S. Lindsey (1998) PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochemistry and Photobiology***68**: 141-142

Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*5(5): 486-488

Efimov VA, Buryakova AA, Chakhmakhcheva OG (1999) Synthesis of polyacrylamides N-substituted with PNA-like oligonucleotide mimics for molecular diagnostic applications. *Nucleic Acids Res*27(22): 4416-4426

Efimov VA, Choob MV, Buryakova AA, Kalinkina AL, Chakhmakhcheva OG (1998) Synthesis and evaluation of some properties of chimeric oligomers containing PNA and phosphono-PNA residues. *Nucleic Acids Res*26(2): 566-575

Eissner G, Kolch W, Scheurich P (2004) Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev*15(5): 353-366

Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Diehl TS, Moore CL, Tsai JY, Rahmati T, Xia W, Selkoe DJ, Wolfe MS (2000) Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol*2(7): 428-434

Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Ye W, Diehl TS, Selkoe DJ, Wolfe MS (2002) Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*99(5): 2720-2725

Fluhrer R, Grammer G, Israel L, Condrón MM, Haffner C, Friedmann E, Bohland C, Imhof A, Martoglio B, Teplow DB, Haass C (2006) A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat Cell Biol*8(8): 894-896

Fluhrer R, Haass C (2007) Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family? *Neurodegener Dis*4(2-3): 112-116

Friedmann E, Hauben E, Maylandt K, Schlegler S, Vreugde S, Lichtenthaler SF, Kuhn PH, Stauffer D, Rovelli G, Martoglio B (2006) SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol*8(8): 843-848

Friedmann E, Lemberg MK, Weihofen A, Dev KK, Dengler U, Rovelli G, Martoglio B (2004) Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J Biol Chem*279(49): 50790-50798

Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM (2004) The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med*199(12): 1607-1618

Furutani-Seiki M, Jiang YJ, Brand M, Heisenberg CP, Houart C, Beuchle D, van Eeden FJ, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Nusslein-Volhard C (1996) Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development***123**: 229-239

Gallio M, Sturgill G, Rather P, Kylsten P (2002) A conserved mechanism for extracellular signaling in eukaryotes and prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A***99**(19): 12208-12213

Grigorenko AP, Moliaka YK, Korovaitseva GI, Rogaev EI (2002) Novel class of polytopic proteins with domains associated with putative protease activity. *Biochemistry (Mosc)***67**(7): 826-835

Grigorenko AP, Moliaka YK, Soto MC, Mello CC, Rogaev EI (2004) The *Caenorhabditis elegans* IMPAS gene, *imp-2*, is essential for development and is functionally distinct from related presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A***101**(41): 14955-14960

Gumbel EJ (1958) *Statistics of extremes*, New York,: Columbia University Press.

Haass C (2004) Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J***23**(3): 483-488

Haass C, Steiner H (2002) Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol***12**(12): 556-562

Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nusslein-Volhard C (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development***123**: 1-36

Heimann M, Sosa GR, Martoglio B, Thiel HJ, Rumenapf T (2006) Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol***80**(4): 1915-1921

Henikoff S, Henikoff JG (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A***89**(22): 10915-10919

Henikoff S, Henikoff JG (2000) Amino acid substitution matrices. *Adv Protein Chem***54**: 73-97

Henricson A, Kall L, Sonnhammer EL (2005) A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence. *Febs J***272**(11): 2727-2733

Hodgkin J (1995) Genetic nomenclature guide. *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet*: 24-25

Hope RG, McElwee MJ, McLauchlan J (2006) Efficient cleavage by signal peptide peptidase requires residues within the signal peptide between the core and E1 proteins of hepatitis C virus strain J1. *J Gen Virol***87**(Pt 3): 623-627

Huang X (1994) On global sequence alignment. *Comput Appl Biosci***10**(3): 227-235

Ichihara S, Suzuki T, Suzuki M, Mizushima S (1986) Molecular cloning and sequencing of the sppA gene and characterization of the encoded protease IV, a signal peptide peptidase, of *Escherichia coli*. *J Biol Chem***261**(20): 9405-9411

Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM (2001) The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol***230**(2): 278-301

Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J***9**(10): 3153-3162

Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol***121**(2): 317-333

Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci***23**(10): 403-405

Kaether C, Capell A, Edbauer D, Winkler E, Novak B, Steiner H, Haass C (2004) The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. *Embo J***23**(24): 4738-4748

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn***203**(3): 253-310

Koonin EV, Makarova KS, Rogozin IB, Davidovic L, Letellier MC, Pellegrini L (2003) The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol***4**(3): R19

Krawitz P, Haffner C, Fluhrer R, Steiner H, Schmid B, Haass C (2005) Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. *J Biol Chem***280**(47): 39515-39523

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature***227**(5259): 680-685

Laudon H, Hansson EM, Melen K, Bergman A, Farmery MR, Winblad B, Lendahl U, von Heijne G, Naslund J (2005) A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem***280**(42): 35352-35360

LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem***278**(39): 37213-37222

LaVoie MJ, Selkoe DJ (2003) The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem***278**(36): 34427-34437

Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A***93**(5): 1988-1992

Lemberg MK, Bland FA, Weihofen A, Braud VM, Martoglio B (2001) Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *J Immunol***167**(11): 6441-6446

Lemberg MK, Martoglio B (2002) Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell***10**(4): 735-744

Lemberg MK, Martoglio B (2004) On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane. *FEBS Lett***564**(3): 213-218

Li Y, Cam J, Bu G (2001) Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction. *Mol Neurobiol***23**(1): 53-67

Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H (2003) PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem***278**(10): 7850-7854

Ma X (2001) TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes Infect***3**(2): 121-129

Majeau N, Gagne V, Bolduc M, Leclerc D (2005) Signal peptide peptidase promotes the formation of hepatitis C virus non-enveloped particles and is captured on the viral membrane during assembly. *J Gen Virol***86**(Pt 11): 3055-3064

Martin L, Fluhrer R, Reiss K, Kremmer E, Saftig P, Haass C (2008) Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem***283**(3): 1644-1652

Martoglio B (2003) Intramembrane proteolysis and post-targeting functions of signal peptides. *Biochem Soc Trans***31**(Pt 6): 1243-1247

Martoglio B, Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol***8**(10): 410-415

- Martoglio B, Graf R, Dobberstein B (1997) Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *Embo J***16**(22): 6636-6645
- McAlpine P (1995) Genetic nomenclature guide. Human. *Trends Genet*: 39-42
- McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res***32**(Web Server issue): W20-25
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J***21**(15): 3980-3988
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell***72**(6): 835-846
- Mott R (1997) EST_GENOME: a program to align spliced DNA sequences to unspliced genomic DNA. *Comput Appl Biosci***13**(4): 477-478
- Mullins M (1995) Genetic nomenclature guide. Zebrafish. *Trends Genet*: 31-32
- Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, Nusslein-Volhard C (1994) Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol***4**(3): 189-202
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol***155**: 335-350
- Muskavitch MA (1994) Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol***166**(2): 415-430
- Naldini A, Aarden L, Pucci A, Bernini C, Carraro F (2003) Inhibition of interleukin-12 expression by alpha-thrombin in human peripheral blood mononuclear cells: a potential mechanism for modulating Th1/Th2 responses. *Br J Pharmacol***140**(5): 980-986
- Nyborg AC, Kornilova AY, Jansen K, Ladd TB, Wolfe MS, Golde TE (2004) Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed gamma-secretase inhibitor. *J Biol Chem***279**(15): 15153-15160
- O'Neil KT, DeGrado WF (1990) How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem Sci***15**(2): 59-64
- Ohneda K, Yamamoto M (2002) Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol***108**(4): 237-245

- Paetzel M, Karla A, Strynadka NC, Dalbey RE (2002) Signal peptidases. *Chem Rev***102**(12): 4549-4580
- Partanen TA, Paavonen K (2001) Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech***55**(2): 108-121
- Perry C, Soreq H (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis. Fine tuning of combinatorial multi-domain elements. *Eur J Biochem***269**(15): 3607-3618
- Ponting CP, Hutton M, Nyborg A, Baker M, Jansen K, Golde TE (2002) Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum Mol Genet***11**(9): 1037-1044
- Portielje JE, Kruit WH, Eerenberg AJ, Schuler M, Sparreboom A, Lamers CH, Bolhuis RL, Stoter G, Huber C, Hack C (2001) Interleukin 12 induces activation of fibrinolysis and coagulation in humans. *Br J Haematol***112**(2): 499-505
- Prokop S, Haass C, Steiner H (2005) Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem***94**(1): 57-62
- Prokop S, Shirotani K, Edbauer D, Haass C, Steiner H (2004) Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem***279**(22): 23255-23261
- Ripka AS, Satyshur KA, Bohacek RS, Rich DH (2001) Aspartic protease inhibitors designed from computer-generated templates bind as predicted. *Org Lett***3**(15): 2309-2312
- Saha MS, Cox EA, Sipe CW (2004) Mechanisms regulating the origins of the vertebrate vascular system. *J Cell Biochem***93**(1): 46-56
- Schroeter EH, Ilagan MX, Brunkan AL, Hecimovic S, Li YM, Xu M, Lewis HD, Saxena MT, De Strooper B, Coonrod A, Tomita T, Iwatsubo T, Moore CL, Goate A, Wolfe MS, Shearman M, Kopan R (2003) A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A***100**(22): 13075-13080
- Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci***26**: 565-597
- Selkoe DJ (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science***275**(5300): 630-631
- Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, 3rd, Sudhof T, Yu G (2005) Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell***122**(3): 435-447

Shearman MS, Beher D, Clarke EE, Lewis HD, Harrison T, Hunt P, Nadin A, Smith AL, Stevenson G, Castro JL (2000) L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry***39**(30): 8698-8704

Steiner H, Haass C (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol***1**(3): 217-224

Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B, Hardy J, Capell A, Meyn L, Grim ML, Baumeister R, Fichteler K, Haass C (2000) Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol***2**(11): 848-851

Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A, Kostka M, Haass C (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem***277**(42): 39062-39065

Struhl G, Adachi A (2000) Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell***6**(3): 625-636

Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature***422**(6930): 438-441

Targett-Adams P, Hope G, Boulant S, McLauchlan J (2008) Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem*

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res***22**(22): 4673-4680

Tomita T, Watabiki T, Takikawa R, Morohashi Y, Takasugi N, Kopan R, De Strooper B, Iwatsubo T (2001) The first proline of PALP motif at the C terminus of presenilins is obligatory for stabilization, complex formation, and gamma-secretase activities of presenilins. *J Biol Chem***276**(35): 33273-33281

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity***19**(5): 641-644

Urban S, Freeman M (2003) Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell***11**(6): 1425-1434

Urny J, Hermans-Borgmeyer I, Gercken G, Schaller HC (2003) Expression of the presenilin-like signal peptide peptidase (SPP) in mouse adult brain and during development. *Gene Expr Patterns***3**(5): 685-691

Vincent MJ, Martin AS, Compans RW (1998) Function of the KKXX motif in endoplasmic reticulum retrieval of a transmembrane protein depends on the length and structure of the cytoplasmic domain. *J Biol Chem***273**(2): 950-956

von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol***184**(1): 99-105

Wang J, Beher D, Nyborg AC, Shearman MS, Golde TE, Goate A (2006) C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J Neurochem***96**(1): 218-227

Weihofen A, Binns K, Lemberg MK, Ashman K, Martoglio B (2002) Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science***296**(5576): 2215-2218

Weihofen A, Martoglio B (2003) Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol***13**(2): 71-78

Wolfe MS, De Los Angeles J, Miller DD, Xia W, Selkoe DJ (1999a) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry***38**(35): 11223-11230

Wolfe MS, Kopan R (2004) Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science***305**(5687): 1119-1123

Wolfe MS, Xia W, Moore CL, Leatherwood DD, Ostaszewski B, Rahmati T, Donkor IO, Selkoe DJ (1999b) Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry***38**(15): 4720-4727

Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999c) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature***398**(6727): 513-517

Yasim A, Kilinc M, Aral M, Oksuz H, Kabalci M, Eroglu E, Imrek S (2008) Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology***23**(1): 15-20

Ye J, Dave UP, Grishin NV, Goldstein JL, Brown MS (2000) Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A***97**(10): 5123-5128

Yoder JA, Litman RT, Mueller MG, Desai S, Dobrinski KP, Montgomery JS, Buzzeo MP, Ota T, Amemiya CT, Trede NS, Wei S, Djeu JY, Humphray S, Jekosch K, Hernandez Prada JA, Ostrov DA, Litman GW (2004) Resolution of the novel immune-type receptor gene cluster in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A***101**(44): 15706-15711

Yoder JA, Mueller MG, Wei S, Corliss BC, Prather DM, Willis T, Litman RT, Djeu JY, Litman GW (2001) Immune-type receptor genes in zebrafish share genetic and functional properties with genes encoded by the mammalian leukocyte receptor cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6771-6776

Yoder JA, Nielsen ME, Amemiya CT, Litman GW (2002) Zebrafish as an immunological model system. *Microbes Infect* **4**(14): 1469-1478

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer's Disease <i>Alzheimer Krankheit</i>
AICD	β APP Intracellular Domain <i>Intrazelluläre Domäne des βAPP</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampizillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosyltriphosphat
A β	Amyloid β -Peptid
BACE	Beta-site APP Cleaving Enzyme
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin <i>Rinderserumalbumin</i>
<i>C.e.</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary DNA <i>komplementäre DNA</i>
CNS	Central nervous system <i>Zentralnervensystem</i>
ZNS	<i>Zentralnervensystem</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus eines Proteins
CTP	Cytidintriphosphat
<i>D.m.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D.r.</i>	<i>Danio rerio</i> <i>Zebrafisch</i>
Da	Dalton
DAPT	N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine <i>t</i> -Butyl Ester
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>e</i>	Eulersche Zahl, $e = \lim_{n \rightarrow \infty} \left(1 + \frac{1}{n}\right)^n = 2,7172 \dots$
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor <i>Epidermaler Wachstumsfaktor</i>

ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal calf serum <i>Fötales Kälberserum</i>
GFP	Green Fluorecent Protein <i>Grün-fluoreszierendes Protein</i>
GTP	Guanidyltriphosphat
HEK	Human embryonic kidney cell line <i>Humane embryonale Nierenzelllinie</i>
HRP	Horseradish peroxidase <i>Meerrettichperoxidase</i>
ICD	Intracellular Domain <i>Intrazelluläre Domäne</i>
I-Clip	Intramembrane cleaving protease <i>Intramembranprotease</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
mRNA	Messenger ribonucleic acid <i>Boten-Ribonukleinsäure</i>
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline <i>Phosphat gepufferte Kochsalzlösung</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction <i>Polymerasekettenreaktion</i>
Pen2	Presenilin Enhancer 2
RIP	Regulated intramembrane proteolysis <i>Regulierte Intramembran- Proteolyse</i>
RNA	Ribonucleic acid <i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	Rotations per minute <i>Umdrehungen pro Minute</i>
RT	Raumtemperatur
S2P	Site-two-protease
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SPP	Signal peptide peptidase <i>Signalpeptidpeptidase</i>
SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c	Signal peptide peptidase like 2 a, b, c
SPPL3	Signal peptide peptidase like 3

SREB	sterol regulatory element binding protein
TM	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosisfaktor α
UTR	Untranslated region <i>nicht-translatierte Region</i>
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
wt	Wildtyp-Form eines Gens, Proteins, Phänotyps
β APP	β -Amyloid Precursor Protein <i>β-Amyloid Vorläufer Protein</i>

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

In dieser Arbeit wurden die üblichen Konventionen zur Gen und Protein Nomenklatur verwendet (1995; Davisson, 1995; Hodgkin, 1995; McAlpine, 1995; Mullins, 1995) :

Species	Gene	Protein
Caenorhabditis elegans	<i>Spp</i>	SPP
Danio rerio	<i>spp</i>	Spp
Drosophila melanogaster	<i>Spp</i>	Spp
Homo sapiens	<i>SPP</i>	SPP
Mus musculus	<i>Spp</i>	SPP

In Kapiteln, in denen Gene oder Proteine unterschiedlicher Spezies diskutiert werden, ist die Abkürzung in Großbuchstaben, also z.B. SPP für Signalpeptidpeptidase speziesübergreifend zu verstehen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Christian Haass für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in die hervorragende Arbeitsatmosphäre seines Labors.

Für die kontinuierliche Betreuung und die ausgezeichnete Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meiner Betreuerin Dr. Bettina Schmid ausdrücklich danken. Ein großer Dank gilt auch Dr. Regina Fluhner und Dr. Christof Haffner bei der Betreuung der Protein Arbeiten.

Ferner gilt mein Dank den Mitdoktoranden Sylvia Fischer, Peer-Hendrik Kuhn, Susanne Schöbel, Stephanie Neumann und technischen Assistenten des gesamten Labors für die herzliche Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende ideelle Unterstützung während meiner Studien.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Adresse: Peter Michael Krawitz
 Prinzenweg 13a
 82319 Starnberg
 Email: peter.krawitz@gmail.com

Geburt: 19. August 1980 in Augsburg

Staatsbürgerschaft: deutsch

Promotion:

Seit Aug. 2003 Doktorarbeit in Humanmedizin im Labor für Neurodegenerative Erkrankungen, Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Haass, LMU
 Titel: funktionelle Analyse der Signalpeptidpeptidase und homologer Proteine im Zebrafisch

Studium:

Medizin:

Apr. 2003-Jun. 2008 Humanmedizin, klinischer Abschnitt
 Technische Universität München

Feb. 2007-Feb. 2008 Praktisches Jahr:
 Nuklearmedizin: Universidad de Buenos Aires, Hospital Britanico,
 Innere Medizin: Cornell, New York Presbyterian Hospital
 Chirurgie: TUM, Klinikum rechts der Isar

Apr. 2001-März 2003 Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt
 Ludwig-Maximilians- Universität München

Physik:

Okt. 2001-Feb.2007 Diplom Physik (Note: 1,0)
 Ludwigs-Maximilians-Universität München

März 2006-Feb.2007 Diplomarbeit am Institute for Systems Biology in Seattle
Titel: Entropy in random Boolean Networks

Zivildienst:

Aug. 2000-Apr. 2001 Zivildienst im Labor für Leukämiediagnostik, Klinikum Großhadern, Prof. Dr. med. Dr. phil. Torsten Haferlach

Schulbildung

Juli 2000 Abitur am Gymnasium Starnberg (Note: 1,0)

Stipendien:

Apr. 2001-Jun. 2008 Stipendiat der Bayerischen Hochbegabten Förderung

März 2006-Feb. 2007 Auslandsstipendium des Max Weber Programms der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Veröffentlichungen

Krawitz P, Shmulevich I, *Boolean Modeling of Biological Networks*, Buchkapitel in Encyclopedia of Complexity, Springer, in press (2008)

Krawitz P, Shmulevich I, *Entropy of complex relevant components of Boolean networks*, Physical Review E, **76**, 036115, 1-7 (2007)

Krawitz P, Shmulevich I, *Basin Entropy in Boolean Networks Ensembles*, Physical Review Letters, **98**, 158701, 1-4 (2007)

Krawitz P, Haffner C, Fluhrer R, Steiner H, Schmid B, Haass C, *SPPL2b and SPPL3: Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues*, Journal of Biological Chemistry, **280**, 39515-23 (2005)

Schoch C, Kern W, Krawitz P, Dugas M, Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W, *Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype*, Blood, **98**, 3500 (2001)

Differential Localization and Identification of a Critical Aspartate Suggest Non-redundant Proteolytic Functions of the Presenilin Homologues SPPL2b and SPPL3*

Received for publication, February 11, 2005, and in revised form, April 6, 2005. Published, JBC Papers in Press, July 5, 2005, DOI 10.1074/jbc.M501645200

Peter Krawitz¹, Christof Haffner¹, Regina Fluhrer¹, Harald Steiner, Bettina Schmid², and Christian Haass³

From the Adolf-Butenandt-Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstrasse 44, 80336 Munich, Germany

Signal peptide peptidase (SPP) is an unusual aspartyl protease that mediates clearance of signal peptides by proteolysis within the endoplasmic reticulum (ER). Like presenilins, which provide the proteolytically active subunit of the γ -secretase complex, SPP contains a critical GXGD motif in its C-terminal catalytic center. Although SPP is known to be an aspartyl protease of the GXGD type, several presenilin homologues/SPP-like proteins (PSHs/SPPL) of unknown function have been identified by data base searches. We now investigated the subcellular localization and a putative proteolytic activity of PSHs/SPPLs in cultured cells and in an *in vivo* model. We demonstrate that SPPL2b is targeted through the secretory pathway to endosomes/lysosomes, whereas SPP and SPPL3 are restricted to the ER. As suggested by the differential subcellular localization of SPPL2b compared with SPP and SPPL3, we found distinct phenotypes upon antisense gripNA-mediated knockdown in zebrafish. *spp* and *sppl3* knockdowns in zebrafish result in cell death within the central nervous system, whereas reduction of *sppl2b* expression causes erythrocyte accumulation in an enlarged caudal vein. Moreover, expression of D/A mutations of the putative C-terminal active sites of *spp*, *sppl2*, and *sppl3* produced phenocopies of the respective knockdown phenotypes. Thus, our data suggest that all investigated PSHs/SPPLs are members of the novel family of GXGD aspartyl proteases. Furthermore, SPPL2b is shown to be the first member of the SPP/PSH/SPPL family that is not located within the ER but in endosomal/lysosomal vesicles.

Intramembrane proteolysis is mediated by a class of novel polytopic proteases that have their active centers located within the hydrophobic transmembrane domains (1, 2). Members of these proteases include the site-two protease (1), rhomboids (3, 4), γ -secretase (5), and signal peptide peptidase (SPP)⁴ (6, 7). Although the site-two protease and rhom-

boids belong to the class of metallo- and serine proteases, respectively, γ -secretase and SPP are aspartyl proteases (2, 8, 9). Intramembrane-cleaving cysteine proteases have so far not been identified. It should, however, be noted that the precise cleavage sites of the site-two protease, rhomboids, and SPPs have not yet been directly determined; thus, it remains possible that cleavage could also occur at or close to the membrane.

The catalytic core of γ -secretase is provided by either of the two homologous presenilins (PS1 or PS2). Co-factors including anterior pharynx defective 1 (APH-1), presenilin enhancer (PEN)-1, PEN-2, and Nicastrin are absolutely required to generate a functional γ -secretase complex (10–14). PS1- or PS2-containing γ -secretase complexes can both mediate the intramembrane cleavage of the β -amyloid precursor protein (APP), Notch, and probably many other type I-oriented substrates as well (8, 15–18), suggesting functional redundancy. Moreover, several distinct species of APH-1 also appear to be functionally redundant at least with respect to γ -secretase-mediated cleavage of β -amyloid precursor protein fragments (19, 20). However, recent evidence (21) suggests that γ -secretase complexes containing different APH-1 species may have tissue-specific activities. In addition, differential activities of individual complexes within different subcellular compartments can also not be excluded.

The C-terminal critical aspartate of PSs is located within a conserved GXGD motif (22), whereas the N-terminal aspartate is embedded within a YD sequence segment. The GXGD signature motif is highly conserved in SPP, an unrelated polytopic aspartyl protease (2, 7, 23, 24), as well as in the type four prenilin peptidases (22, 25). Moreover, mutagenesis of the corresponding aspartate residue blocks the proteolytic activity of SPP (7), PS1 (5), PS2 (15, 26), and type four prenilin peptidases (25). This strongly suggests that the aspartate within the GXGD motif comprises the C-terminal active site of these proteases. Furthermore, SPP can also be targeted with highly specific γ -secretase inhibitors, demonstrating the similarity of the catalytic centers of SPP and γ -secretase (27–29). Further similarities are observed between PSs, SPP, and type four prenilin peptidases, which also include a PXL motif within the C-terminal domain. SPP is required for the removal of signal peptides (2). In addition, SPP is also involved in immune surveillance and processing of the hepatitis C viral core protein (7), suggesting a more general role of SPP in the liberation of bioactive peptides (2, 7, 23, 24). Besides SPP, a family of homologous proteins was identified by data base searches (2, 7, 23, 30, 31). These proteins were named SPPL (SPP-like) 2 (a, b, c) and 3 (in yeast an additional SPPL, SPPL4, exists) (7) or PS homologues 1–5 (30). For clarity, we will use the term SPPL throughout this manuscript. Although SPPLs share some homology with SPPs, it is not known if they exhibit any proteolytic activity (24).

We now investigated the subcellular distribution and catalytic function of SPP and SPPLs in human cells and in zebrafish and suggest that

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (the DFG Priority program "Cellular Mechanisms of Alzheimer Disease" (to C. Haass, H. Steiner, and C. Haffner) and SFB 596 "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration" (to C. Haass and B. Schmid), the Leibniz Award (to C. Haass), the APOPIs Program funded by the European Union under the Sixth Framework Programme; Contract LSHM-CT-2003-503330 (to C. Haass), and the Molecular Medicine Program of the Ludwig-Maximilians-University (FöFoLe) (to P. Krawitz). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AY926458 (*spp*), AY926457 (*sppl2*) and AY926459 (*sppl3*).

¹ These authors contributed equally.

² To whom correspondence may be addressed. Tel.: 49-89-2180-75453; Fax: 49-89-2180-75415; E-mail: beschmid@med.uni-muenchen.de.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 49-89-2180-75471; Fax: 49-2180-75415; E-mail: Christian.Haass@med.uni-muenchen.de.

⁴ The abbreviations used are: SPP, signal peptide peptidase; SPPL, SPP-like proteins; PS, presenilin; APP, β -amyloid precursor protein.

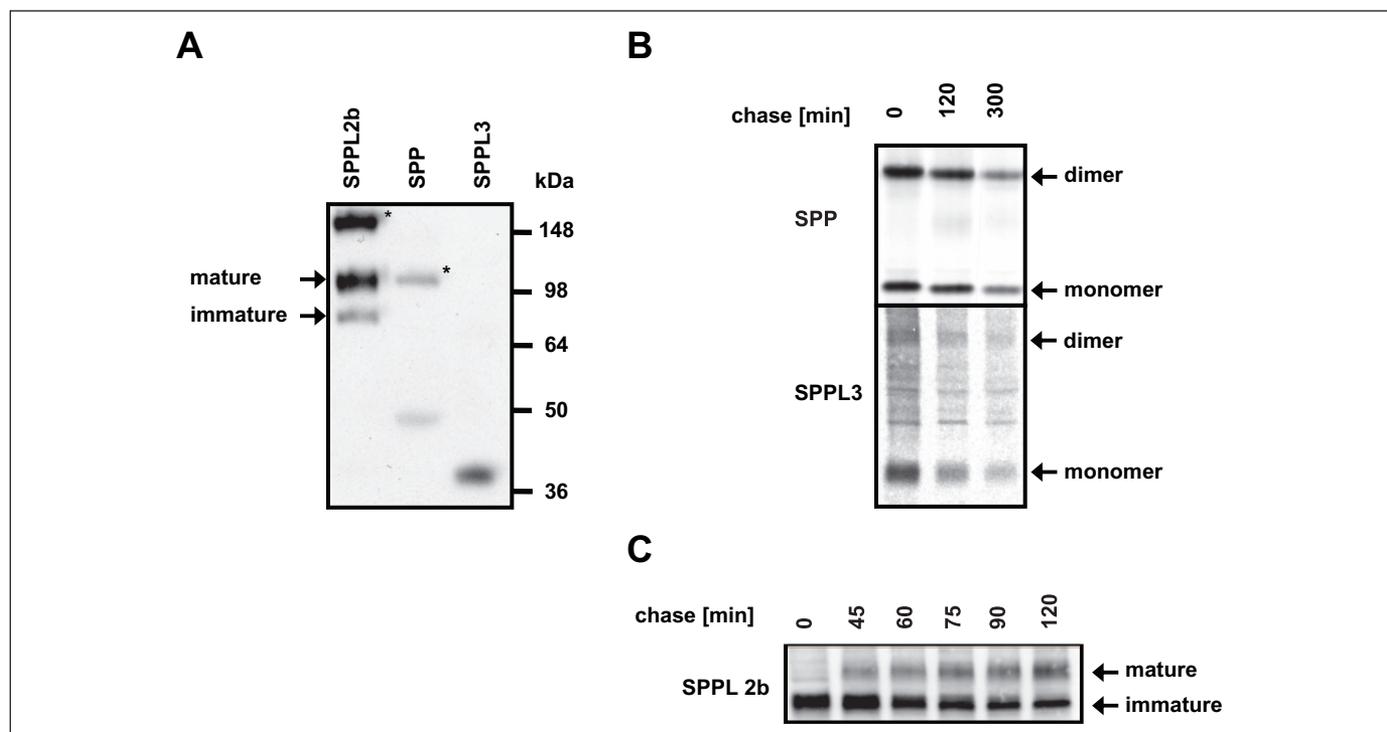


FIGURE 1. Expression and maturation of SPP and SPPLs. *A*, lysates of HEK293 cells stably transfected with Myc-tagged SPPL2b (lane 1), SPP (lane 2), or SPPL3 (lane 3) were immunoprecipitated with antibodies N159, 2812, or 4a, respectively. Immunoprecipitated SPP or SPPLs were identified with the anti-Myc antibody 9E10. Mature and immature forms of SPPL2b are indicated by *arrows*. Bands marked with an *asterisk* (*) represent the putative dimeric forms of the respective protein. Note that tags do not affect expression and membrane orientation of SPP/SPPL (38). *B*, HEK293 cells stably expressing SPP and SPPL3 were pulse-labeled with [³⁵S]methionine/cysteine for 15 min and chased for the time points indicated. Proteins were immunoprecipitated using the 9E10 antibody and detected by autoradiography. Note that neither SPP nor SPPL3 undergoes a molecular weight shift during the chase period. *C*, HEK293 cells stably expressing SPPL2b were pulse-labeled with [³⁵S]methionine/cysteine for 15 min and chased for the time points indicated. Proteins were immunoprecipitated using the 9E10 antibody and detected by autoradiography. Note that SPPL2b undergoes a molecular weight shift during the chase period.

SPPLs are novel members of the family of aspartyl proteases of the GXGD type. Moreover, by demonstrating an endosomal/lysosomal localization of SPPL2b, we provide first evidence that the function of these proteases may not be necessarily restricted to the ER and the removal of signal peptides within the early secretory pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture, cDNAs, and Transfection—HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with Glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen). SPP, SPPL2b, and SPPL3 cDNAs were amplified by PCR from a human brain cDNA library using the following primers: SPP, 5'-CGCGAATTCGCCACCATGGACTCGGCCCTCAGC-3' and 5'-CGCCTCGAGTTTCTCTTTCTTCTCCAGCC-3'; SPPL2b, 5'-CGCGAATTCGCCACCATGGCGGCAGCGGTGGCGGCTG-3' and 5'-CGCCTCGAGCTAGGCCGAGGCGCCAGGCTGG-3'; SPPL3, 5'-CGCGAATTCGCCACCATGGCGGAGCAGACCTACTCGT-3' and 5'-CGCCTCGAGTACTTCCAGGAATCGGGAGCTG-3'.

SPP and SPPL3 were subcloned into the pcDNA4/TO/Myc-His vector and transfected into HEK293 TR cells (Invitrogen). SPPL2b was subcloned into pcDNA4/Myc-His (Invitrogen) and transfected into a HEK293 cell line stably overexpressing APP 695 containing the Swedish mutation (32, 33). Transfection of cells was carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the supplier's instructions, and single cell clones were generated by selection in 200 μ g/ml zeocin (Invitrogen). To induce expression of SPP and SPPL3, cells were incubated with 1 μ g/ml doxycycline added to the cell culture medium for 48 h.

Antibodies, Metabolic Labeling, Immunoprecipitation, and Immunoblotting—The polyclonal anti-SPP antibody 2812 (against amino acids 201–377 of human SPP) and polyclonal anti-SPPL3 antibody 4a (against amino acids 370–384 of human SPPL3) were obtained from Memorec Biotech GmbH (Cologne). The polyclonal anti-SPPL2b antibody N159 was generated by immunization of rabbits with a synthetic peptide representing the amino acids 213–227 of human SPPL2b coupled to keyhole limpet hemocyanin (Eurogentec, Seraing, Belgium). The monoclonal anti-Myc antibody 9E10 and the monoclonal anti-LAMP2 antibody were obtained from the hybridoma bank, the monoclonal anti-BiP antibody was from Stressgen, and the polyclonal anti-calreticulin antibody was from Calbiochem. Pulse-chase experiments, cell lysis, and immunodetection were carried out as described before (34).

Deglycosylation Experiments—For the deglycosylation experiments cell lysates were denatured with 1% SDS for 10 min at 65 °C, diluted 1:10 in assay buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.2, 12 mM EDTA, 0.4% Nonidet-P40) to a protein concentration of \sim 1 μ g/ μ l, and treated overnight at 37 °C with 50 milliunits/ml *N*-glycosidase F (Roche Applied Science) or 0.25 milliunits/ μ l endoglycosidase H (Roche Applied Science).

Immunofluorescence Microscopy—Cells were grown on polylysine-coated coverslips, fixed for 20 min with phosphate-buffered saline (PBS), 3.7% paraformaldehyde, permeabilized for 20 min with PBS, 0.2% Triton X-100, and blocked with PBS, 1% bovine serum albumin. Antibody incubations were performed for 1 h at room temperature in phosphate-buffered saline followed by incubation with Alexa 488- and Alexa 594-coupled secondary antibodies (Molecular Probes), and mounted samples were analyzed with a Zeiss Axioplan fluorescent microscope.

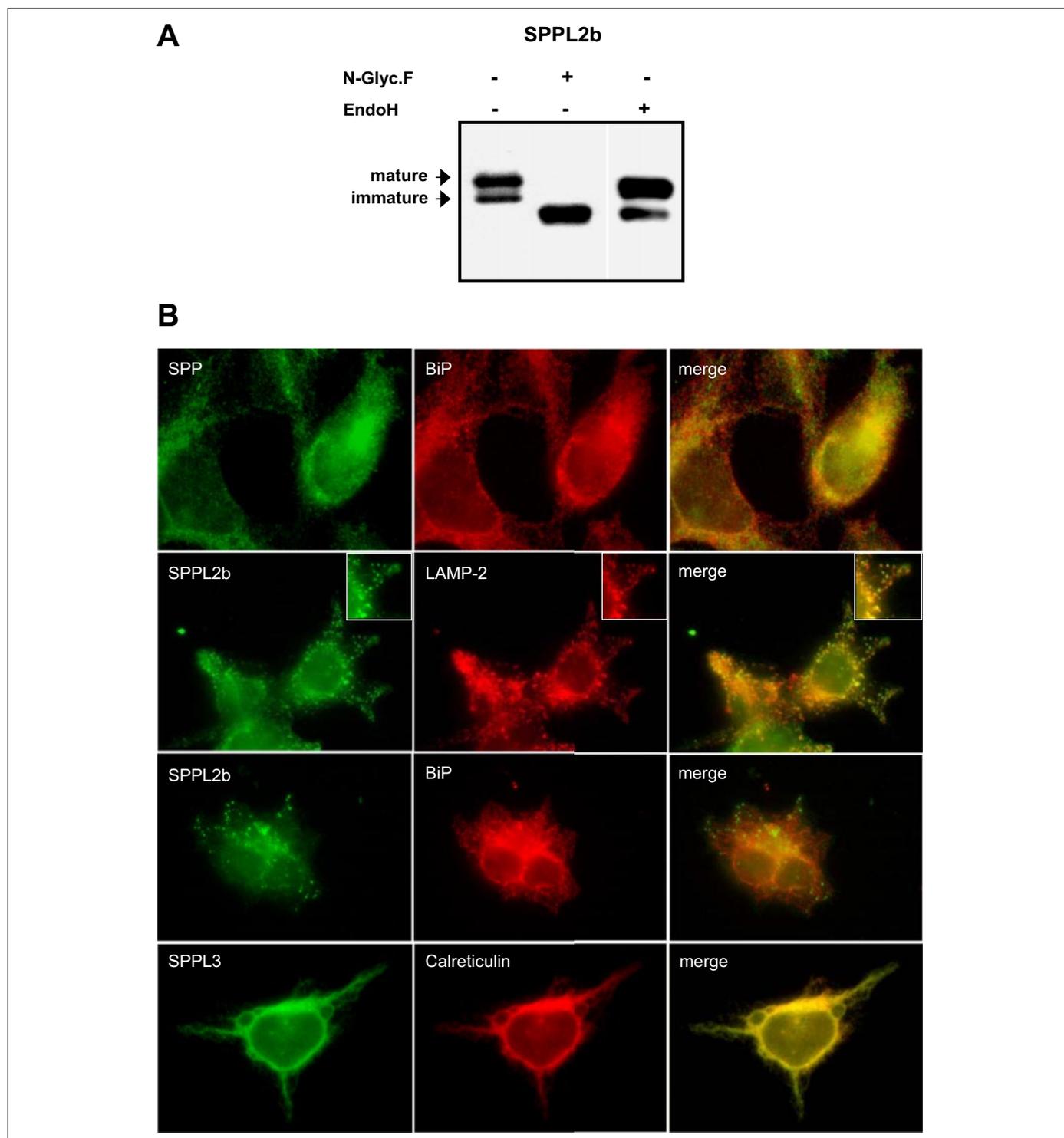


FIGURE 2. Posttranslational maturation and endosomal localization of SPPL2b. *A*, SPPL2b is a glycoprotein that undergoes complex glycosylation. Protein extracts of HEK293 cells stably transfected with SPPL2b were treated with *N*-glycosidase F (*N*-Glyc.F) or endoglycosidase H (*EndoH*). SPPL2b was detected with the anti-Myc antibody 9E10. In untreated extracts monomeric SPPL2b appears as two bands of 90 and 110 kDa. Whereas treatment with *N*-glycosidase F shifts both bands completely to a single band of 65 kDa, treatment with endoglycosidase H causes only a very minor shift of the upper band, suggesting that this species is partially endoglycosidase H-resistant. *B*, subcellular localization of SPP and SPPLs. Immunofluorescence microscopy reveals that SPP and SPPL3 colocalize to a large extent with the ER-resident proteins BiP and calreticulin. In contrast, SPPL2b staining shows significant overlap with LAMP-2, a marker for late endosomes/lysosomes, whereas very little co-localization is observed with BiP. *Insets* show extensive co-localization of SPPL2b with LAMP-2-positive vesicles.

Fish Maintenance and Breeding—Zebrafish were maintained, mated, and raised as described (35). Embryos were kept at 28 °C and staged as described (36). The wild type line AB was used for all experiments.

In Situ Hybridization and Acridine Orange Staining—*In situ* hybridizations were carried out as described elsewhere (37) with slight modi-

fications. The single-stranded RNA probes were labeled with digoxigenin-UTP (Roche Applied Science). The second antibody was preincubated overnight with zebrafish embryos. All washing steps were carried out at 65 °C. Washes were as follows: 2× 30 min in 50% formamide, 2× SSCT (standard saline citrate + 0.1% Tween); 1× 15 min in

SPP-like Proteins Are Aspartyl Proteases of the GXGD Type

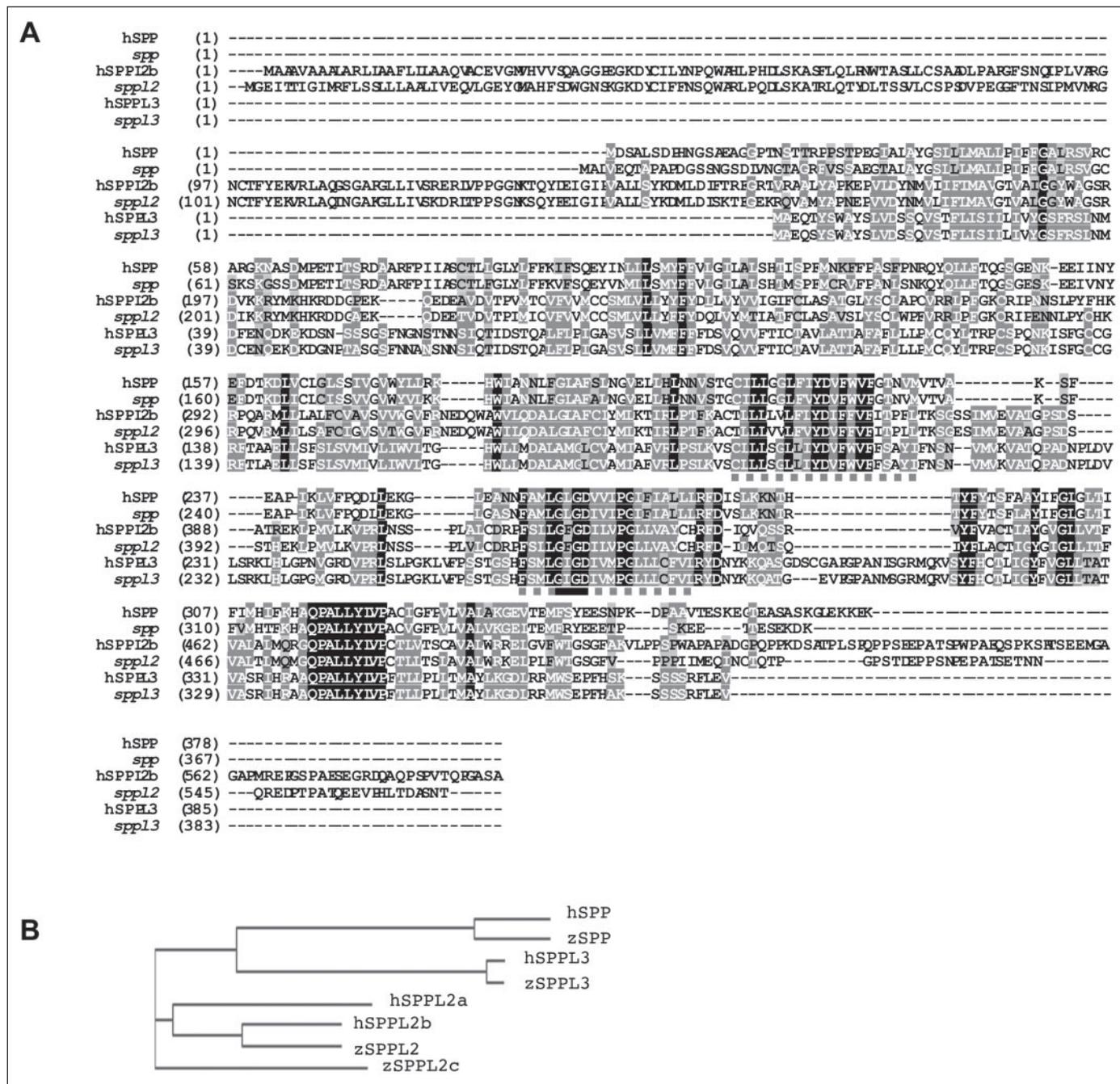


FIGURE 3. Amino acid sequence alignment of members of the SPP family. A, amino acid sequence alignment of human (h-) SPP/SPPLs and their zebrafish homologues. Black shading indicates complete conservation in all proteins, and gray shading indicates biochemically similar residues. Dotted lines highlight the predicted active site transmembrane domains, and the bar highlights the GXGD motif. B, phylogenetic tree based on the neighbor joining algorithm showing the evolutionary distances.

2x SSCT; 2x 30 min in 0.2x SSCT. To reduce endogenous phosphatase activity, 0.25 mg/ml levamisole was added to the staining buffer. Dechorionated embryos were incubated alive in 2 mg/ml acridine orange in E3 medium for 30 min at room temperature. Stained embryos were analyzed after 3 wash steps of 5 min with E3 medium.

Antisense gripNAs and Microinjection of Zebrafish Embryos—Antisense gripNAs of 18 nucleotides in length were obtained from Active Motif. For *spp* and the *spl* genes we used a grip designed against the ATG-start codon (ATG-grip) to block translational start (the ATG site is in bold) and an independent gripNA hybridizing to an exon-intron junction, resulting in a nonsense splicing product (GT-grip). As controls, three bases of the ATG-grip were modified (underlined below). In

the case of *spp* the ATG control grip is shifted five nucleotides further upstream in addition to the two modified nucleotides: *spp* ATG-grip, 5'-CTGCTCCACATCCGCCAT-3'; *spp* GT-grip, 5'-CGTACCTCATTTGTGTGAG-3'; *spp* ATG-control grip, 5'-CTACATTCGCCATGCTTC-3'; *spl2* ATG-grip, 5'-TGTGATCTCCCCATCCG-3'; *spl2* GT-grip, 5'-CTTACTTTTCTCTGCC-3'; *spl2* ATG-control grip, 5'-TATGATCTCGCCATACG-3'; *spl3* ATG-grip, 5'-CTCTGCTCCGCCATGTCA-3'; *spl3* GT-grip, 5'-CGCACCGTCCATGAGCA-3'; *spl3* ATG-control grip, 5'-CTCGGCTCCGCAATGCCA-3'.

Embryos were microinjected with a Femto Jet Microinjector (Eppendorf) at the one-cell stage with gripNA concentrations varying from 0.12 to 1.0 mM depending on the severity of the observed phenotype.

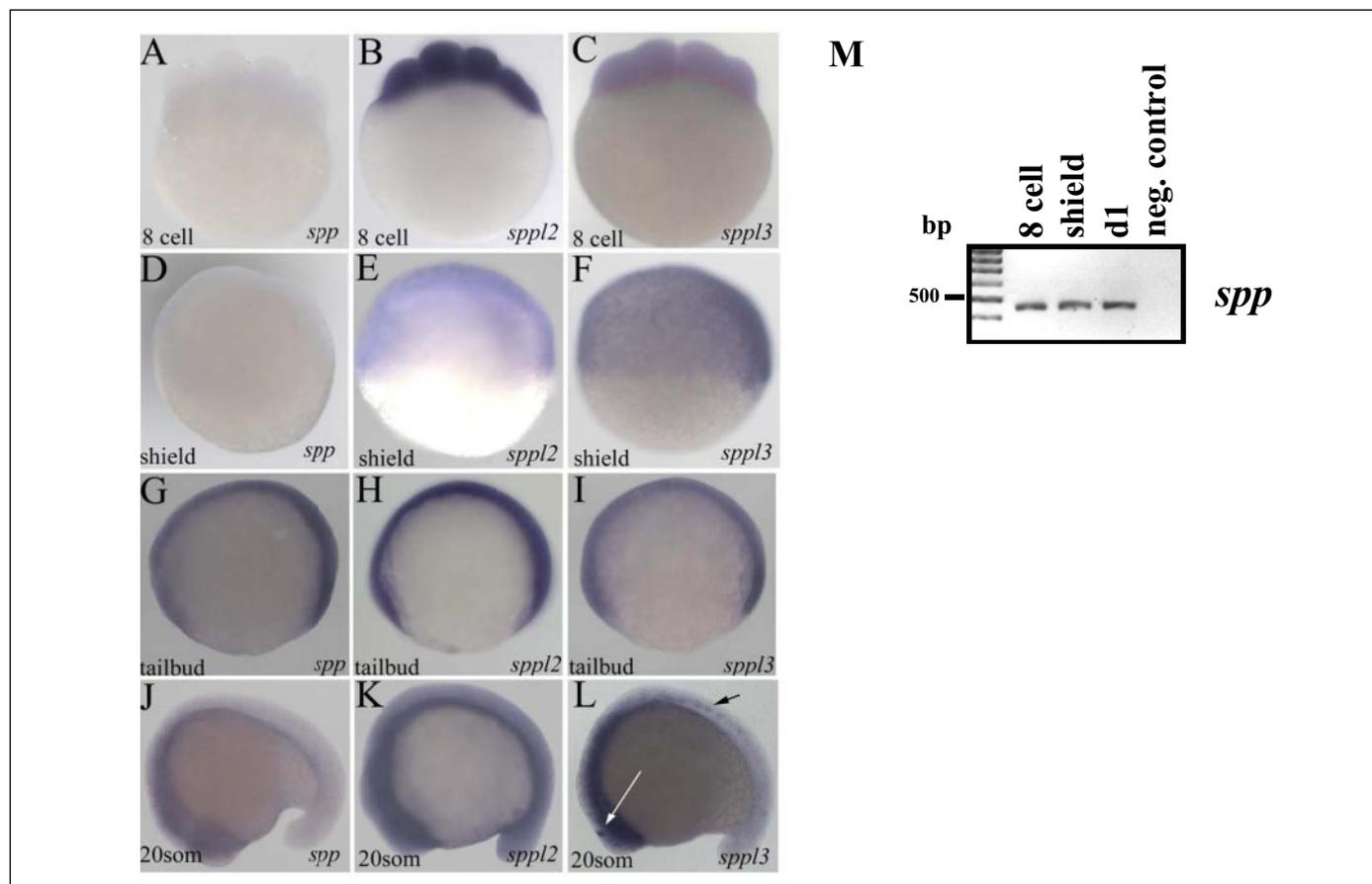


FIGURE 4. Expression profiles of *spp*, *sppl2*, and *sppl3* during early zebrafish development and somitogenesis revealed by whole mount *in situ* hybridization. Ubiquitous expression of *sppl2* and *sppl3* at the eight-cell and shield stage is observed (B, C, E, and F). *spp*, although maternally inherited (as detected by reverse transcription-PCR; M), is not detectable in these stages by *in situ* hybridization (A and D). Ubiquitous expression of all three genes at the tail-bud stage (G, H, and I). At the 20-somite stage expression of *spp* and *sppl3* becomes largely restricted to the central nervous system (J and L), whereas *sppl2* expression remains ubiquitous (K). L, the additional signal of *sppl3* transcripts in the epiphysis (white arrow) and somites (som) (black arrow). M, analysis of early expression of *spp* by reverse transcription-PCR. d1, day 1; neg. control, negative control. Embryos are shown in lateral view; D–I, ventral to the left; J–L, anterior to the left.

The injected volume was 2–4 pl. After injection the embryos were maintained in embryo medium at 28 °C.

Zebrafish cDNA Constructs, mRNA Synthesis, and Generation of Mutant mRNA—cDNA clones encoding *spp* (MPMGp637A0723Q2), *sppl2* (MPMGp609O0125Q8), and *sppl3* (MPMGp637N1021Q2) were obtained from the German Resource Centre for Genome Research (RZPD) (www.rzpd.de). Sequences were submitted to GenBank™ (accession numbers are AY926458 for *spp*, AY926457 for *sppl2* and AY926459 for *sppl3*). Full-length *spp*, *sppl2*, and *sppl3* were subcloned into the pCS2+ (sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors) expression vector. mRNA was synthesized using the mMMESSAGE MACHINE kit (Ambion) and polyadenylated using a polyadenylation kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. The codon encoding the critical aspartate was mutagenized to an alanine codon after the QuikChange (Stratagene) protocol. Successful mutagenesis was verified by DNA sequencing.

RESULTS

Differential Subcellular Localization of SPPLs—Besides SPP itself, the SPP family comprises four additional members of unknown function in mammals, two of which, SPPL2b and SPPL3, are conserved in all vertebrates ((7, 30); see also Fig. 3). They were, therefore, chosen for a functional analysis in cultured cells and in zebrafish as a model system. As a first step we examined expression and maturation of Myc-tagged human SPPL2b (the only SPPL2 present in the zebrafish genome; see

Fig. 3) and SPPL3 in comparison to SPP in HEK293 cells. Clones stably expressing SPP/SPPLs were generated, and expression levels were analyzed (Fig. 1A). As shown previously, two major SPP bands were detected, which may represent monomeric and dimeric variants (28, 38). SPPL2b was expressed as two bands of 90 and 110 kDa (Fig. 1A), molecular masses considerably higher than predicted (64.7 kDa). In addition, a higher molecular mass band was also observed, again suggesting oligomerization to a variable degree (Fig. 1A (38)). SPPL3 was observed as an ~40-kDa protein (Fig. 1A). As for SPP and SPPL2b, dimers and higher molecular mass oligomers of SPPL3 were sometimes observed (see also Fig. 1B; lower panel).

To investigate whether the two immunoreactive bands of SPPL2b result from posttranslational modification, pulse-chase experiments were performed. Whereas SPP and SPPL3 showed no posttranslational maturation (as monitored by the absence of a molecular mass shift during the chase period; Fig. 1B), SPPL2b is expressed at time point 0 min as a single band, which during the chase period is reduced at the expense of a higher molecular mass protein (Fig. 1C). This may suggest that SPPL2b posttranslationally matures by glycosylation during its targeting through the secretory pathway. Putative glycosylation of SPPL2b was, therefore, further investigated by selective removal of *N*-linked sugar side chains (Fig. 2A). *N*-Glycosidase F treatment of cell lysates from SPPL2b-expressing cells resulted in the detection of a single band of ~70 kDa, which roughly corresponds to the calculated molecular mass of SPPL2b (64.7 kDa). In contrast, endoglycosidase H treat-

SPP-like Proteins Are Aspartyl Proteases of the GXGD Type

TABLE ONE

Phenotypic effects of knockdown and loss-of-function variants of *spp/sppl*

p value is derived from χ^2 test against the control group, wt, wild type.

<i>spp</i>	Concentration	<i>n</i>	Neuronal degeneration	No phenotype	Unspecific	<i>p</i>
			%	%	%	
<i>spp</i> ATG-grip	0.12 mM	97	85	14	1	0.0001
<i>spp</i> GT-grip	1 mM	117	70	28	2	0.0001
<i>spp</i> ATG-control grip	1 mM	47	0	94	6	
<i>spp</i> D268A capped mRNA	0.75 μ M	110	26	66	7	0.0193
<i>spp</i> wt capped mRNA	1 μ M	39	5	85	10	
<i>sppl2</i>	Concentration	<i>n</i>	Blood clot	No phenotype	Unspecific	<i>p</i>
			%	%	%	
<i>sppl2</i> ATG-grip	1 mM	188	76	22	4	0.0001
<i>sppl2</i> GT-grip	1 mM	205	86	10	4	0.0001
<i>sppl2</i> ATG-control grip	1 mM	121	4	95	1	
<i>sppl2</i> GT-grip	0.75 mM	142	86	8	5	
<i>sppl2</i> GT-grip + <i>sppl2</i> wt mRNA	0.75 mM + 0.36 μ M	119	41	54	5	0.0001
<i>sppl2</i> D422A mRNA	0.36 μ M	123	49	43	8	0.0001
<i>sppl2</i> wt mRNA	0.36 μ M	49	0	96	4	
<i>sppl3</i>	Concentration	<i>n</i>	Neuronal degeneration	No phenotype	Unspecific	<i>p</i>
			%	%	%	
<i>sppl3</i> ATG-grip	0.5 mM	269	84	14	2	0.0001
<i>sppl3</i> GT-grip	0.5 mM	148	70	27	3	0.0001
<i>sppl3</i> ATG-control grip	0.5 mM	53	0	96	4	
<i>sppl3</i> D272A mRNA	0.63 μ M	159	48	45	7	0.0001
<i>sppl3</i> wt mRNA	0.63 μ M	31	0	94	6	

ment caused only a minor shift of the upper band to a lower molecular mass (Fig. 2A), whereas the lower molecular weight variant of SPPL2b was fully endoglycosidase H-sensitive (Fig. 2A). This demonstrates that the upper band of SPPL2b becomes partially endoglycosidase H-resistant (as observed for example for nicastrin (39–41)) and strongly suggests passage through the Golgi apparatus. This is somewhat surprising since proteins of the SPP family may have been expected to be located within early secretory compartments, namely the ER, where signal peptide cleavage occurs (7, 42). Accordingly, SPP even appears to be actively retained within the ER by a KKXX ER retrieval signal (7).

To further substantiate trafficking of SPPL2b through the secretory pathway, an indirect immunofluorescence analysis was performed. As expected (7) SPP co-localized with the ER marker BiP (Fig. 2B). In cells overexpressing SPPL3, a similar staining pattern was observed that again overlapped with an ER marker (Fig. 2B), suggesting that SPPL3 also localizes to the ER. In contrast, SPPL2b was found predominantly in vesicular structures, which were positive for LAMP-2 (Fig. 2B), a marker for late endosomes/lysosomes (43). Co-staining with the ER marker BiP showed little co-localization, demonstrating that SPPL2b does not accumulate within the ER (Fig. 2B). The small amounts of SPPL2b found in the ER may be due to immature SPPL2b transported through the early secretory pathway. Thus, the data from indirect immunofluorescence are consistent with our observation from the pulse-chase and deglycosylation experiments (Figs. 1, B and C and 2A) and demonstrate that SPPL2b, in contrast to SPP and SPPL3, is targeted through the entire secretory pathway to endosomes/lysosomes. These data demonstrate that not all proteins of the SPP family are restricted to the early secretory compartment, indicating functional diversity.

Identification and Developmental Expression of Zebrafish SPPLs—To investigate putative individual proteolytic functions of SPPLs *in vivo*, we turned to zebrafish as a model system. We have used this system previ-

ously to study γ -secretase function *in vivo* and to elucidate the function of the Nicastrin-like protein Nicalin (44–46). Sequence comparison of zebrafish *spp* and *sppls* revealed a significant homology to the human counterparts (Fig. 3A). Interestingly, we found only one *sppl2* homologue within the zebrafish genome, which shares highest sequence identity with SPPL2b (66% compared with 50% with SPPL2a and 45% with SPPL2c (Fig. 3, A and B)). We refer to this gene as *sppl2* for the remainder of the manuscript (according to the Zebrafish Nomenclature Committee).

To gain first insight into *spp* and *sppl* function, we visualized mRNA localization by whole mount *in situ* hybridization during development. Significant amounts of *sppl2* and *sppl3* mRNAs were detectable before zygotic transcription at the eight-cell stage, revealing maternal inheritance (Fig. 4, B and C). *sppl2* and *sppl3* are ubiquitously expressed until tail-bud stage (Fig. 4, H and I). Transcripts of *spp* became first detectable by whole mount *in situ* hybridization at tail-bud stage (Fig. 4G). However, we expected *spp* to also be expressed early during development since SPP has been shown to clear signal peptides (7), a process most likely required at all stages of development. Analysis of early stage embryos by a more sensitive reverse transcription-PCR approach revealed the expected maternal inheritance of *spp* and expression at all stages analyzed (Fig. 4M). Transcripts of *spp*, *sppl2*, and *sppl3* are ubiquitously expressed at the five-somite stage (data not shown). From the 20-somite stage onward, expression of *spp* and *sppl3* becomes restricted to the central nervous system, whereas *sppl2* appears to be more ubiquitously expressed (Fig. 4, J–L). *sppl3* transcripts are additionally detected in the epiphysis and in somites at the 20-somite stage (Fig. 4L). All *spp* and *sppl* transcripts are continuously expressed throughout the brain from day 1 until day 3 post-fertilization (data not shown).

Knockdown of Zebrafish *spp* and *sppl*—To gain further insight into the *in vivo* function of *spp* family members, we transiently knocked

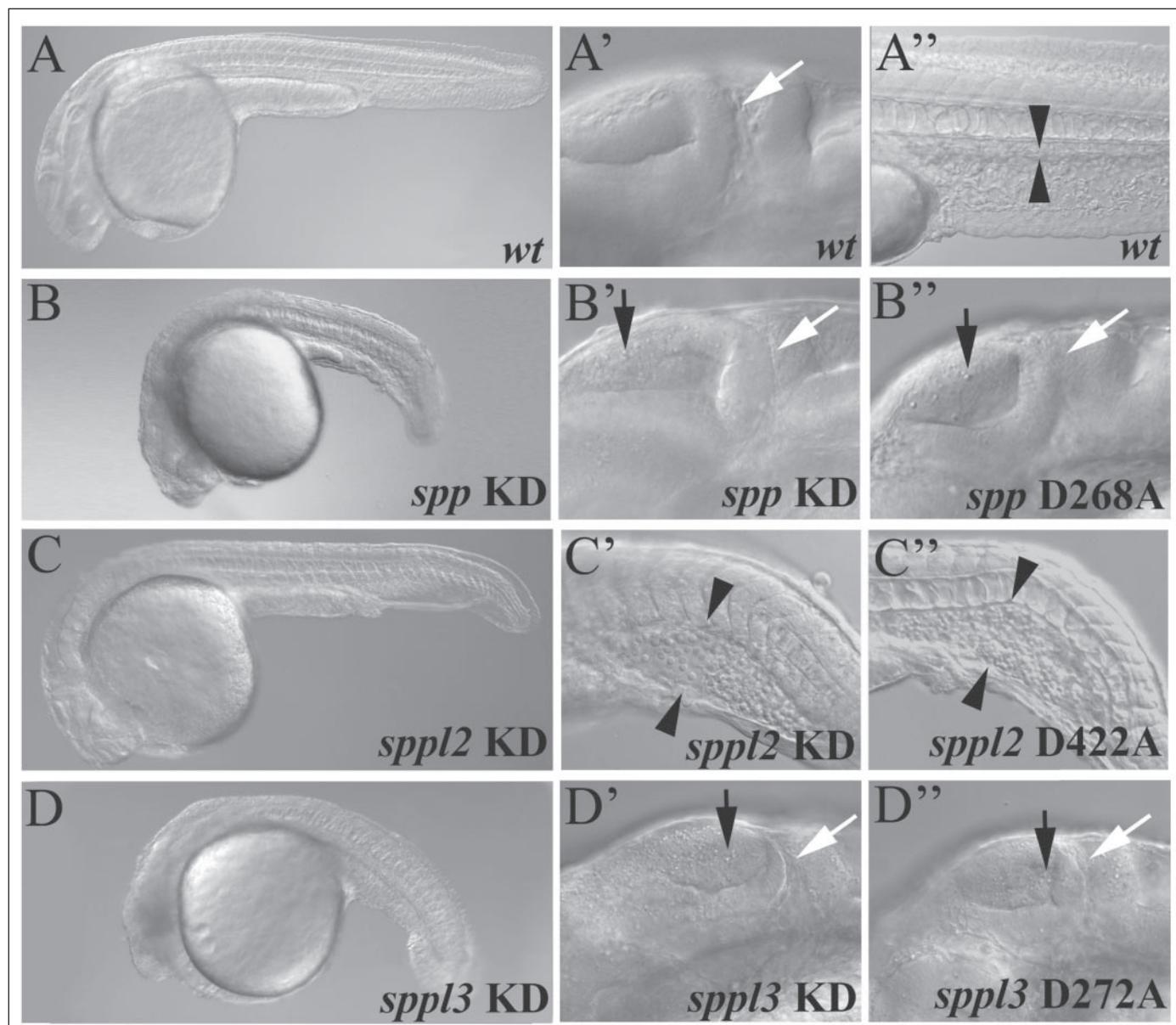


FIGURE 5. Loss-of-function phenotypes of *spp* and *sppl* in zebrafish. Uninjected embryo at 24 h post-fertilization (A) showing the normal midbrain-hindbrain boundary (A', white arrow) and a wild type (wt) caudal vein (A'', arrowheads). Knockdown (KD) of *spp* (ATG-grip) results in cell death within the nervous system (B and B'). Dead cells are visible in the midbrain and are clearly distinguishable by their round morphology (black arrows in B' and B''). Overexpression of *spp* D268A mRNA phenocopies the *spp* knockdown phenotype (B''). Embryos injected with *sppl2* ATG-grip show erythrocyte accumulation in the enlarged caudal vein (arrowheads in C'). Embryos injected with *sppl2* D422A mRNA show the *sppl2* knockdown phenotype (C''). Injection of *sppl3* ATG-grip results in broad cell death within the nervous system (D and D'). Dead cells are present throughout the central nervous system (black arrows in D' and D''). Overexpression of *sppl3* D272 mRNA phenocopies the *sppl3* knockdown phenotype (D''). White arrows mark the midbrain-hindbrain boundary. All embryos are oriented with anterior to the left and posterior to the right. Higher power views in B', B'', D', and D'' show less severely affected embryos compared with embryos shown in B and D.

down *spp* and *sppls* by injection of antisense gripNAs into one-cell stage zebrafish embryos. Injection of a gripNA targeting the start codon of *spp* (referred to as *spp* ATG-grip) led to a cell death phenotype within the nervous system (85% of cases, $n = 97$; TABLE ONE; Fig. 5, B and B'). An indistinguishable phenotype was obtained by injection of a *sppl3* ATG-grip (84% of cases, $n = 269$) (Fig. 5, D and D'). In contrast, knockdown of *sppl2* by injection of a *sppl2* ATG-grip resulted in a distinct phenotype with an enlarged caudal vein accumulating blood (76% of the cases; $n = 188$) (Fig. 5, C and C'). To rule out defects in endothelial and hematopoietic differentiation, several *in situ* markers were tested (*flt4*, *krox20*, *scl*, *ephB4*, *flk1*, *gata1*). None of these markers revealed differences compared with uninjected control embryos (data not shown).

To demonstrate the cell death phenotype in *spp* and *sppl3* knockdown embryos more directly, we used the cell death marker acridine orange (47). Staining of non-injected embryos did not show cell labeling above background levels (Fig. 6A). In contrast, staining of *spp*-grip- and *sppl3*-grip-injected embryos resulted in the massive labeling of cells in the brain and the spinal cord (Fig. 6, B and D). In both cases we observed a range of phenotypes of different strength. Figs. 5, B and D, show more strongly affected embryos, demonstrating pronounced cell death. We selected less severely affected embryos for Figs. 5, B' and D', and 6 to visualize individual dying cells. Acridine orange staining of *sppl2* knockdown embryos did not result in significant cell labeling, demonstrating the absence of cell death (Fig. 6C).

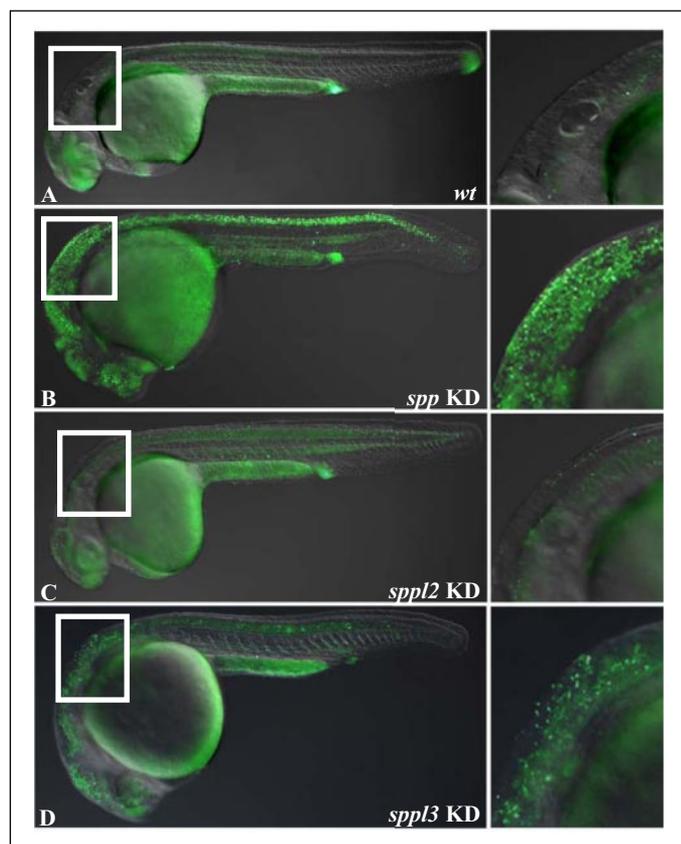


FIGURE 6. Cell death in *spp* and *spp3* loss-of-function phenotypes. Acridine orange stains dying cells. In wild type (*wt*) embryos only a few dying cells are seen at 24 h post-fertilization (A). In *spp* knockdown (*KD*) embryos (GT-grip) dead cells are seen evenly distributed throughout the central nervous system and spinal cord (B). *spp2* knockdown embryos (GT-grip) do not show significantly elevated cell death compared with wild type embryos (C). *spp3* knockdown embryos (ATG-grip) show cell death throughout the brain (D). The white rectangles mark the areas of the higher power magnifications shown on the right. In B and D less severely affected embryos are shown to allow visualization of individual cells. Autofluorescence of the yolk is observed in A–D.

A number of control experiments were performed to demonstrate the specificity of the observed phenotypes. Injection of control gripNAs did not lead to significant defects (TABLE ONE). Moreover, the individual phenotypes were reproduced by injection of independent gripNAs targeting splice donor sites of *spp*, *spp2*, and *spp3* transcripts (referred to as GT-grips; TABLE ONE). The *spp2* GT-grip-induced knockdown phenotype could additionally be rescued by coinjection of wild type *spp2* mRNA. The percentage of embryos showing a phenotype could be significantly reduced from 86% ($n = 142$) to 41% ($n = 119$) (TABLE ONE), again demonstrating its specificity. Taken together, we have generated knockdown phenotypes of *spp* and *spp3* by two independent gripNAs, targeting the start codons and splice donor sites, revealing distinct phenotypes for *spp2* and *spp3*.

Overexpression of Dominant Negative Mutants Phenocopies the Knockdown Defects—We next wanted to analyze if the observed *spp* knockdown phenotype can be correlated to its catalytic function. One possibility to examine this is the expression of loss-of-function mutants. Weihofen *et al.* (7) have shown that mutagenesis of the aspartate within the GXGD motif (Asp-265 in human SPP) to alanine abolishes proteolytic activity of SPP. We, therefore, generated the corresponding D268A mutation in *spp* and injected the mRNA into one-cell stage embryos. This resulted in a neuronal cell death phenotype very similar to that seen in the *spp* knockdown embryos (Fig. 5, compare B' and B''; TABLE ONE). Thus, the observed knockdown phenotype is not only specific but is most likely caused by a loss of *spp* activity. Like SPP, all members

of the SPPL family contain a GXGD motif at the corresponding positions of their transmembrane domains (Fig. 3A) and might, therefore, also represent GXGD type aspartyl proteases. Analogous to SPP, we therefore mutagenized the corresponding aspartates to alanine and injected the mutant mRNAs into one-cell stage embryos. *spp2* D422A mRNA injection led to blood clots in 49% of cases ($n = 123$) (Fig. 5, compare C' and C''), whereas injection of wild type *spp2* mRNA of the same concentration did not cause any phenotype (TABLE ONE). Similarly, injection of *spp3* D272A mRNA but not wild type mRNA phenocopied the *spp3* knockdown phenotype in 48% of the injected embryos ($n = 159$) (Fig. 5, compare D' and D'') (TABLE ONE). Taken together, these data confirm the corresponding knockdown phenotypes and suggest that *spp2* and *spp3* are also likely to function as aspartyl proteases of the GXGD type.

DISCUSSION

Upon the identification of SPP, data base searches revealed a family of SPP homologues, the SPPLs/PSHs (7, 30). However, it remained unknown whether these proteins are proteolytically active and whether they are functionally redundant to SPP. We have addressed these questions by studying the biochemical and functional properties of SPPL2b and SPPL3 in comparison to SPP. Already the analysis of their subcellular localization in cultured cells by indirect immunofluorescence, pulse-chase, and deglycosylation experiments revealed striking differences. Whereas SPPL3, like SPP, localizes to the ER, SPPL2b is predominantly found in endosomes/lysosomes. This by itself may already suggest a non-redundant function of SPPL2b. To test this hypothesis, we used the zebrafish as a model system for a functional characterization of SPP and SPPLs *in vivo*. Analysis of their expression patterns during embryogenesis and the phenotypes caused by antisense-mediated knockdown also revealed similarities between SPP and SPPL3. Both are strongly expressed in the nervous system, and their knockdown appears to cause neuronal degeneration. In contrast, SPPL2b is expressed more ubiquitously, and its knockdown results in an enlarged caudal vein without any detectable cell death. These results demonstrate that SPP and SPPLs have important functions during zebrafish embryogenesis. Moreover, they are in agreement with our cell culture data and suggest functional redundancy between SPP and SPPL3. SPPL2b, however, appears to have a role distinct from the other family members.

We then asked the question of whether the knockdown phenotypes are caused by a loss of proteolytic activity. One possibility to address this is the analysis of dominant negative mutants. For SPP, mutagenesis of the aspartate within the GXGD motif to alanine (D265A) has been shown to cause loss of enzymatic activity (7). We, therefore, tested the effect of the corresponding mutation in zebrafish *spp* (D268A) and found that its overexpression in zebrafish embryos results in a phenocopy of the *spp* knockdown phenotype. This suggested that active site mutations in SPP act in a dominant negative manner. Importantly, the corresponding mutations in the GXGD motifs of *spp2* and *spp3* also caused a phenocopy of the respective knockdown phenotypes, indicating that they represent active site mutations as well. These data led us to conclude that SPPL2b and SPPL3 are likely to represent active members of the SPP protease family. Moreover, we suggest that SPPL2b is an endosomal GXGD type aspartyl protease, which exerts a function distinct from the ER-located SPP and SPPL3.

Deficiency of the *Caenorhabditis elegans imp-2* gene, which corresponds to vertebrate SPP, also caused a severe developmental phenotype, which could be mimicked by reduced cholesterol concentrations or the disruption of *Ce-Irp-1* (48). *Ce-Irp-1* is a homologue of the vertebrate lipoprotein receptor-related protein. Interestingly, interference

with lipoprotein receptor-related proteins appears to result in neurodegeneration in mice (49), a phenotype also observed upon down-regulation of *spp* in zebrafish.

Based on the severity of the observed phenotypes, all investigated SPPLs appear to have important biological functions throughout development. This is supported by their maternal inheritance and rather ubiquitous expression. However, in the absence of specific substrates for SPPLs, one can only speculate about the physiological functions of SPPLs. The endosomal/lysosomal localization of SPPL2b suggests that it may be involved in removal of signal peptides, which escaped SPP-mediated cleavage within the ER. However, the loss-of-function phenotypes may suggest additional, more essential functions for SPPL2b. These may include generation of bioactive signaling peptides, as has been observed for SPP (7). One may even assume that intracellular cytoplasmic domains of type II transmembrane proteins may be released upon reinternalization of the substrate from the plasma membrane.

Taken together, proteolysis by GXGD-type aspartyl proteases within or close to the membrane indeed appears to be an "increasing scheme of variation" (24), which during evolution was fine-tuned to allow a regulated release of a variety of important signaling molecules by a number of different proteases. In addition to these essential signaling functions, some members of the SPP family may also be required to remove proteolytically generated small peptides located within the membrane of the ER or endosomes/lysosomes. A similar rather general degradation activity may also be provided by γ -secretase. However, this activity may be selective to small intramembrane stubs of type I proteins, whereas SPPs (2) and probably SPPLs as well may selectively remove proteolytically generated stubs in a type II membrane orientation.

Acknowledgments—We thank Dr. B. Martoglio and the Memorec Biotech GmbH (Cologne) for cDNAs and antibodies and S. Topp and B. Sperl for technical support.

REFERENCES

- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000) *Cell* **100**, 391–398
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 71–78
- Urban, S., Lee, J. R., and Freeman, M. (2001) *Cell* **107**, 173–182
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., and Freeman, M. (2001) *Cell* **107**, 161–171
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **398**, 513–517
- Weihofen, A., Lemberg, M. K., Ploegh, H. L., Bogyo, M., and Martoglio, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30951–30956
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002) *Science* **296**, 2215–2218
- Selkoe, D., and Kopan, R. (2003) *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 565–597
- Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Trends Cell Biol.* **12**, 556–562
- Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003) *Nature* **422**, 438–441
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6382–6387
- Kim, S. H., and Sisodia, S. S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 1992–2001
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichtler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28669–28673
- Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., and Yankner, B. A. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 463–465
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., and De Strooper, B. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 461–462
- De Strooper, B. (2003) *Neuron* **38**, 9–12
- Shirovani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C., and Steiner, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 41340–41345
- Ma, G., Li, T., Price, D. L., and Wong, P. C. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 192–198
- Serneels, L., DeJaegere, T., Craessaerts, K., Horre, K., Jorissen, E., Tousseyn, T., Hebert, S., Coolen, M., Martens, G., Zwijssen, A., Annaert, W., Hartmann, D., and De Strooper, B. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1719–1724
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. G., Baumeister, R., Fichtler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
- Martoglio, B., and Golde, T. E. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 201–206
- Wolfe, M. S., and Kopan, R. (2004) *Science* **305**, 1119–1123
- LaPointe, C. F., and Taylor, R. K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1502–1510
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3173–3178
- Weihofen, A., Lemberg, M. K., Friedmann, E., Ruegger, H., Schmitz, A., Paganetti, P., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16528–16533
- Nyborg, A. C., Kornilova, A. Y., Jansen, K., Ladd, T. B., Wolfe, M. S., and Golde, T. E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 15153–15160
- Kornilova, A. Y., Das, C., and Wolfe, M. S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16470–16473
- Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., and Golde, T. E. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1037–1044
- Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Korovaitseva, G. I., and Rogaev, E. I. (2002) *Biochemistry (Mosc)* **67**, 826–835
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **360**, 672–674
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **359**, 322–325
- Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condron, M. M., Teplow, D. B., Haass, C., and Walter, J. (2002) *J. Neurochem.* **81**, 1011–1020
- Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., and Nusslein-Volhard, C. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 189–202
- Kimmel, C. B., Ballar, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995) *Dev. Dyn.* **203**, 253–310
- Schulte-Merker, S., Ho, R. K., Herrmann, B. G., and Nusslein-Volhard, C. (1992) *Development* **116**, 1021–1032
- Friedmann, E., Lemberg, M. K., Weihofen, A., Dev, K. K., Dengler, U., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50790–50798
- Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8666–8671
- Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1127–1136
- Leem, J. Y., Vijayan, S., Han, P., Cai, D., Machura, M., Lopes, K. O., Veselits, M. L., Xu, H., and Thinakaran, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19236–19240
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1998) *Trends Cell Biol.* **8**, 410–415
- Chen, J. W., Murphy, T. L., Willingham, M. C., Pastan, I., and August, J. T. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 85–95
- Leimer, U., Lun, K., Romig, H., Walter, J., Grunberg, J., Brand, M., and Haass, C. (1999) *Biochemistry* **38**, 13602–13609
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., and Haass, C. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 688–694
- Haffner, C., Frauli, M., Topp, S., Irmeler, M., Hofmann, K., Regula, J. T., Bally-Cuif, L., and Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 3041–3050
- Furutani-Seiki, M., Jiang, Y. J., Brand, M., Heisenberg, C. P., Houart, C., Beuchle, D., van Eeden, F. J., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Kelsch, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., and Nusslein-Volhard, C. (1996) *Development* **123**, 229–239
- Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Soto, M. C., Mello, C. C., and Rogaev, E. I. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14955–14960
- Van Uden, E., Mallory, M., Veinbergs, I., Alford, M., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 9298–9304