

Charakterisierung von SAP47 in *Drosophila melanogaster* und der
dazugehörigen Proteinfamilie

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Dr. med. Saskia Huber

geboren in Frankfurt am Main

Würzburg 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung (S.1)

- 1.1. *Drosophila melanogaster* als Modellsystem
- 1.2. Synaptische und synapsenassoziierte Proteine
- 1.3. Der Zyklus synaptischer Vesikel
- 1.4. Synapsine
- 1.5. Cystein-String-Protein (CSP)
- 1.6. SAP47
- 1.7. HSAP, das humane Homolog von SAP47
- 1.8. Aufgabenstellung

2. Material (S.10)

- 2.1. Chemikalien und Enzyme
- 2.2. Reaktionskits
- 2.3. Immunglobuline
- 2.4. Lebendmaterial
- 2.5. DNA-Material
- 2.6. Puffer und Lösungen
- 2.7. Geräte und sonstiges Material

3. Methoden (S.13)

- 3.1. Molekularbiologische Methoden
 - 3.1.1. Präparative Methoden von DNA
 - 3.1.2. Herstellung und Transformation von elektrokompetenten Zellen
 - 3.1.3. Sequenzierung von DNA
 - 3.1.4. Linker-PCR
 - 3.1.5. Gal4-UAS-System

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Biometra

3.2.2. Fastblot nach Biometra

3.2.3. Spezifische Proteinfärbung mittels Antikörpern und ECL-Detektion (Amersham)

3.2.4. Proteinlokalisierung durch Zellfraktionierung

3.2.5. Dichtegradientenzentrifugation

3.2.6. Immunpräzipitation

3.2.6.1. Prinzip der Immunpräzipitation

3.2.6.2. Protein G Sepharose Säule (Amersham Pharmacia)

3.2.6.3. Protein A Agarose Beads (Boehringer Mannheim)

3.3. Histochemische Methoden

3.3.1. Prinzip der Immunhistochemie (IHC)

3.3.2. IHC an Gefrier- und Vibratomschnitten von Maus- und Rattengehirnen

3.3.3. IHC an Gefrierschnitten von Fliegenhirnen

3.4. Drosophilazucht

3.4.1. Standardkultur

3.4.2. Keimbahntransformation und Einzelkreuzungen

3.5. Bioinformatik

3.5.1. BLAST

3.5.2. CLUSTALW

3.5.3. Hidden Markov Modelle

4. Ergebnisse (S.20)

4.1. Charakterisierung und Identifizierung des nc46 Antigens in Vertebraten

4.2. Lokalisierung von HSAP in Vertebraten

4.3. Überexpression von SAP47

4.4. Rescue von black-pearl in Doppelmutanten

4.5. Immunpräzipitation von SAP47

4.6. Neue Domäne

4.7. Neues von SAP47

5. Diskussion (S.74)

6. Perspektiven (S.88)

7. Zusammenfassung (S.89)

8. Literaturverzeichnis (S.91)

9. Anhang

1. Einleitung

1.1. *Drosophila melanogaster* als Modellsystem

Das menschliche Gehirn ist die komplexeste bekannte Struktur des Universums. Es ist das Ergebnis einer Jahrtausenden andauernden Evolution. Noch sind wir weit davon entfernt, zu verstehen, wie Daten erfasst, weiter verarbeitet und gespeichert werden. Aufgrund der unglaublichen Komplexität ist die direkte Erforschung des menschlichen Gehirns nahezu unmöglich. Seit Jahrzehnten dient daher die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Modellsystem. Die kurze Generationszeit, die leichte Züchtbarkeit, und ein übersichtliches Netzwerk aus rund 200 000 Neuronen machen *Drosophila* seit ca. 80 Jahren zum klassischen Objekt der Genetik.

Aufgrund der Tatsache, dass grundlegende Bauelemente und Prozesse der Informationsverarbeitung in der Evolution hochkonserviert sind, ist es möglich mit Hilfe dieses Modellsystems wichtige Erkenntnisse über das menschliche Gehirn zu gewinnen.

1.2. Synaptische und synapsenassoziierte Proteine

Vor ca. 100 Jahren prägte Sherrington den Begriff Synapse, um den Ort der Kommunikation von Neuronen zu beschreiben. Mittlerweile sind einige synaptische und synapsenassoziierte Proteine identifiziert und die Rollen einzelner Proteine während der Transmitterfreisetzung aufgeklärt.

Man geht aber davon aus, dass 50-100 Proteine an dem synaptischen Vesikelzyklus beteiligt sind. Ein Großteil dieser Proteine ist noch unbekannt.

Südhof et al. teilten 1995 die synapsenassoziierten Proteine in vier Hauptgruppen ein:

- a) Proteine der synaptischen Vesikel,
- b) Proteine, die mit synaptischen Vesikeln assoziieren,
- c) Proteine der synaptischen Plasmamembran,
- d) Proteine, die reversibel mit der Plasmamembran assoziieren.

Von der funktionellen Seite aus betrachtet unterscheidet man zwei Hauptgruppen, Transportproteine (transport proteins), beteiligt an der Neurotransmitteraufnahme und Verkehrsproteine (traffic proteins), welche den synaptischen Vesikelzyklus hauptsächlich vermitteln.

1.3. Der Zyklus synaptischer Vesikel

Der Zyklus synaptischer Vesikel an der Nervenendigung besteht im Wesentlichen aus der Vesikelexozytose, Endozytose und Regeneration von neuen Vesikeln. Von allen bekannten zellulären Transportwegen, ist der Zyklus synaptischer Vesikel der schnellste und der am aufwendigsten regulierte.

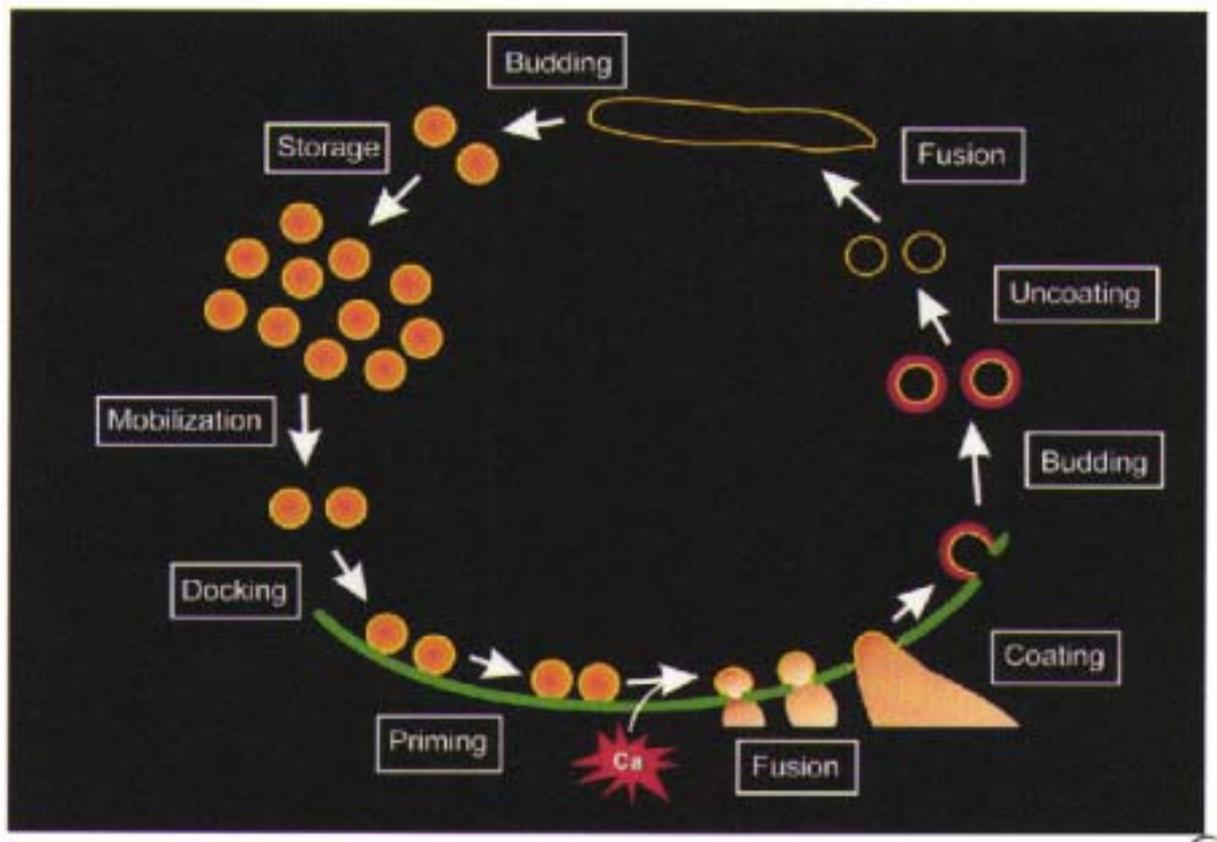


Abb. 1.1: Zyklus synaptischer Vesikel (Augustine et al., 1999).

Im ersten Schritt werden mit Neurotransmitter gefüllte synaptische Vesikel im Bereich der aktiven Zone lokalisiert (Mobilization, Docking). Die aktive Zone ist der Bereich der präsynaptischen Membran, welcher dem synaptischen Spalt genau gegenüber liegt. Hierbei spielen Rab-Proteine (GTP-bindende Proteine) und deren Effektoren Rabphilin und Rim eine

Rolle. Die angedockten Vesikel durchlaufen einen Reifungsprozess (Priming), welcher sie kompetent macht für eine schnelle Calcium vermittelte Fusion mit der präsynaptischen Membran. Die sogenannten SNAREs (Synaptobrevin, SNAP25 und Syntaxin) bringen durch ein Vierhelixbündel, an welchem SNAP25 mit zwei Helices beteiligt ist, die Vesikelmembran und die präsynaptische Membran in räumliche Nähe zueinander (Bajjalieh, 1999).

Nach der Reifung der Vesikel kommt es zur Calcium ausgelösten Exocytose. NSF und SNAP sollen ATP-vermittelt das Vierhelixbündel sowohl vor der Fusion als auch nach der Fusion wieder auflösen (Brunger, 2001). Der Calciumeinstrom bei Depolarisation der präsynaptischen Membran während eines Aktionspotentials erfolgt über spannungsgesteuerte Calciumkanäle, welche in der aktiven Zone konzentriert vorliegen.

Synaptotagmin, ein Calcium bindendes Protein der Vesikelmembran, ist der wichtigste Kandidat, derjenige Calciumrezeptor zu sein, welcher die Änderung der Calciumkonzentration in ein Signal zur Membranfusion umwandelt. Dennoch ist der Prozess der Calcium gesteuerten Fusion derart komplex, dass eine Vielzahl von Proteinen daran beteiligt sind. Beispielsweise sei auch das Cystein-String-Protein CSP erwähnt, welches als Teil eines Chaperonkomplexes hier eine Rolle spielt. Es ist nach wie vor unklar, wie die Vesikelfusion durch Calcium gebundenes Synaptotagmin ausgelöst wird. Es wird vorgeschlagen, dass auch hier eine Interaktion von SNARE-Proteinen von Bedeutung sein könnte (siehe Übersicht, Bajjalieh, 2001).

Nach der Exozytose werden leere Vesikelmembranen schnell wieder mittels Endozytose über Clathrin und seine Adaptormoleküle in die Synapse aufgenommen. Nach Verlust des Clathrinmantels kommt es vermutlich bei einem Teil der leeren Vesikel zur Translokation zu frühen Endosomen. Bei der endosomalen Fusion scheinen wiederum NSF und SNAP eine Rolle zu spielen. Nach der Knospung erfolgt die erneute Neurotransmitteraufnahme und anschließend die Translokation zur aktiven Zone. Der Zyklus kann von vorne beginnen.

Bei der Aurerhaltung eines Reservepools in der Nähe der aktiven Zone scheinen Synapsine eine wichtige Rolle zu spielen.

Im folgenden sollen einige synaptische und synapsenassoziierte Proteine, die für diese Arbeit von Bedeutung sind, näher vorgestellt werden.

1.4. Synapsine

Synapsine sind neuronale Phosphoproteine, die mit synaptischen Vesikelmembranen assoziieren, an Cytoskelettelemente binden und denen eine regulatorische Funktion in der Neurotransmitterfreisetzung zugeschrieben wird. In Vertebraten konnten bislang drei Synapsin-Gene kloniert werden (Südhof et al., 1987, 1989; Südhof, 1990; Hosaka und Südhof, 1998; Kao et al., 1998). Aus den beiden Genen Synapsin I und Synapsin II gehen vier Isoformen durch alternatives Spleißen hervor (Synapsin Ia, Ib, IIb, IIc), aus dem dritten Gen gehen drei Isoformen (Synapsin IIIa,b,c) hervor. Die häufigste Form ist Synapsin Ib, es ist in fast allen Synapsen enthalten (Südhof et al., 1989). Der N-Terminus aller Synapsine beinhaltet die konservierten Domänen A, B und C, der Carboxy-Terminus die variablen Domänen D, F, G, H und J sowie die konservierte Domäne E.

1.5. Cystein-String-Protein (CSP)

Das Cystein-String-Protein, ursprünglich als synapsenassoziiertes Protein in *Drosophila* beschrieben (Zinsmaier et al., 1990), ist ein allgemein mit sekretorischen Vesikeln assoziiertes Protein und hoch konserviert von Invertebraten bis zum Menschen. Genetische Studien in *Drosophila* haben gezeigt, dass CSP sowohl für die Lebensfähigkeit der Tiere als auch für eine regulierte Neurotransmitterfreisetzung von Bedeutung ist. CSP-Nullmutanten in *Drosophila* zeigen einen Temperatur-sensitiven, paralytischen Phänotyp (Zinsmaier et al., 1994). Es wird vermutet, dass CSP als Teil eines Chaperonkomplexes Schutzfunktionen wahrnimmt. Das Substrat dieses Komplexes ist nicht bekannt.

1.6. SAP47

Um neue synaptische Proteine in *Drosophila melanogaster* zu identifizieren wurden Mäuse mit *Drosophilagehirnhomogenat* immunisiert. Nach Herstellung monoklonaler Antikörper wurden diese in immunocytochemischen Färbungen an *Drosophilagehirnschnitten* ausgetestet (Hofbauer, 1991). Ein Antikörper mit der Bezeichnung MAK nc46 zeigte eine einheitliche Färbung des gesamten Neuropils mit Ausnahme der Lamina (deutliche Färbung nur in einer distalen Schicht) und der Medulla (deutlich schwächere Färbung in einem Bereich distal des Cucatti-Bündels, Abb. 1.2).

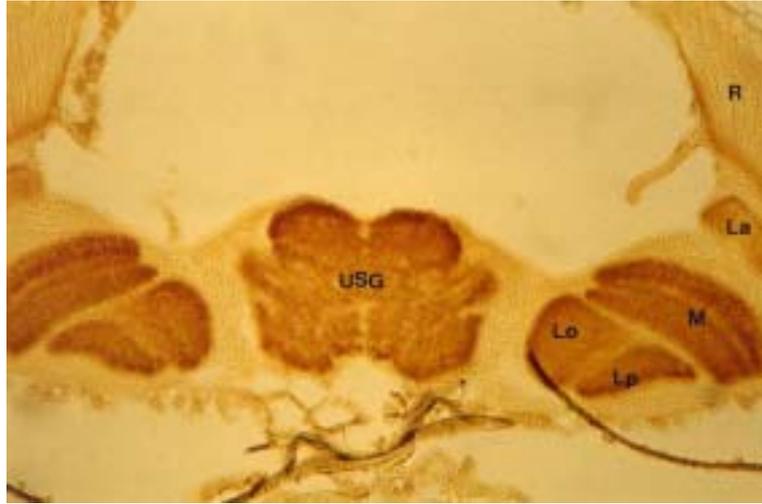


Abb. 1.2: Horizontaler Gefrierschnitt durch einen Kopf von *Drosophila melanogaster*, gefärbt mit dem MAK nc46 (Verdünnung 1:100). USG = Unterschlundganglion, R = Retina, La = Lamina, M = Medulla, Lo = Lobula, Lp = Lobulaplatte (aus Maier, 1995).

In immunhistochemischen Nerv-Muskel-Präparaten des dritten Larvenstadiums färben sich synaptische Boutons an (Abb. 1.3).



Abb. 1.3: Nerv-Muskelpräparat einer 3. Instar-Larve von *Drosophila melanogaster*, gefärbt mit dem MAK nc46 (Verdünnung 1:100). Zu sehen sind synaptische Boutons der Typen 1s (1), 1b (2) und 2s (3), zur Verfügung gestellt von D. Reisch.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Immunogoldfärbungen an Schnitten durch motorische Endplatten larvaler Muskelpräparate zeigen eine homogene Verteilung des Antigens im Cytosol (Reisch, 2000).

Im Westernblot erkennt der Antikörper eine spezifische Bande bei 47kD in *Drosophilagehirnhomogenaten*. Aufgrund der Lokalisation an der Synapse und des Molekulargewichtes erhielt das MAK nc46-Antigen den Namen synapsenassoziiertes Protein SAP47.

In einem Westernblot mit Gehirnhomogenaten verschiedener Spezies sind in *Xiphophorus maculatus* eine Bande bei 52kD, in *Mus musculus* und *Homo sapiens* jeweils eine Doppelbande bei 78 bzw. 83kD detektierbar.

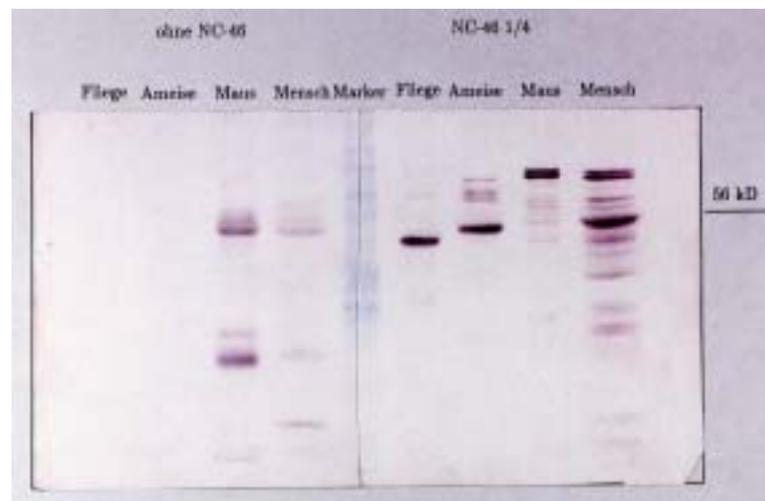


Abb. 1.4: Westernblotanalysen von Gehirnhomogenaten verschiedener Spezies. Die Färbung wurde mit dem MAK nc46 bei einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt (Reisch, 1994).

Durch Screenen verschiedener Expressionsbibliotheken (Debel, 1989; Benz, 1991; Reichmuth, 1993) fand sich das vollständige Leseraster des SAP47-Proteins (Reichmuth et al., 1995). Das zugehörige Gen wurde in die Region 89A8-B3 auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms lokalisiert. Der gesamte genomische Bereich erstreckt sich über eine Länge von ca. 25kb und besteht aus sieben Introns und acht Exons, wobei die beiden letzten Exons in zwei Spleißvarianten alternativ genutzt werden.

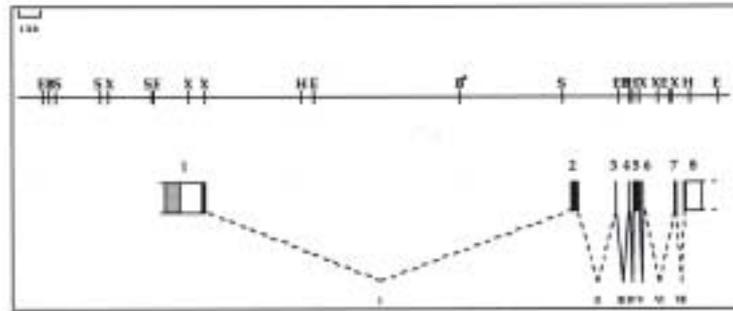


Abb. 1.5: Exon-Intron-Organisation des Sap47-Gens.

Der klonierte genomische Bereich von Sap47 besteht aus sieben Introns und acht Exons, wobei die beiden letzten alternativ genutzt werden (aus Becker, 1997).

Die beiden alternativ gespleißten Transkripte kodieren für zwei nahezu identische Proteine mit jeweils 347 bzw. 351 Aminosäuren (Becker, 1993; Reichmuth et al., 1995).

Die Funktion des SAP47-Proteins sowie die genaue ultrastrukturelle Lokalisierung an der Synapse ist noch nicht bekannt.

1.7. HSAP, das humane Homolog von SAP47

Mit der Sequenz von SAP47 wurden die verfügbaren Datenbanken nach humanen EST-Klonen durchsucht. Es fanden sich eine Reihe von EST-Klonen mit signifikanter Ähnlichkeit zu SAP47. In Kombination mit eigenen Sequenzen aus dem Screen einer cDNA-Bibliothek humaner Retina konnte eine vorläufige Sequenz von 2059 bp abgeleitet werden (Brunner, 1999). Vermutlich ist diese Sequenz sowohl am 5' als auch am 3' Ende unvollständig. Auf Aminosäureebene besitzen das humane SAP und SAP47 aus *Drosophila* eine Ähnlichkeit von 44%.

Die vorläufige Exon/Intron-Struktur, abgeleitet von der Sequenz eines humanen PAC-Klones, enthält acht Exons.

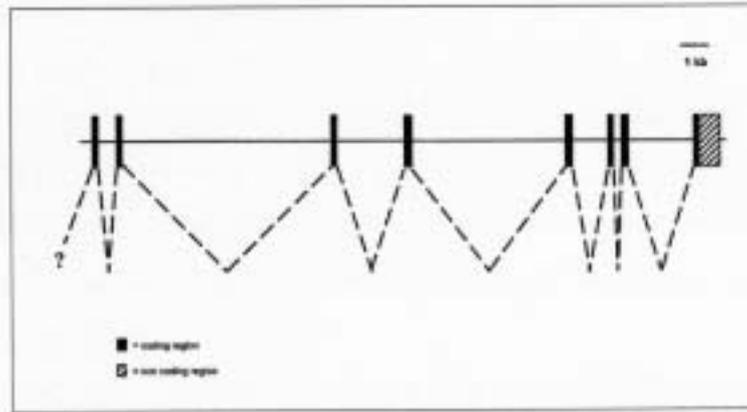


Abb. 1.6: Vorläufige Exon/Intron-Struktur des hsp-Gens (aus Becker et al., 1999).

Mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung wurde das humane Homolog von SAP47 auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms in die Region Xp22.2 lokalisiert (Reich, 1997).

Im Gegensatz zu SAP47 in *Drosophila* ist das humane Homolog nicht gehirnspezifisch. Zahlreiche EST-Klone aus den verschiedensten Geweben sowie ein 1999 in der Arbeitsgruppe von Nils Brose durchgeführter Northernblot zeigte zwei SAP-Transkripte in den untersuchten Geweben.

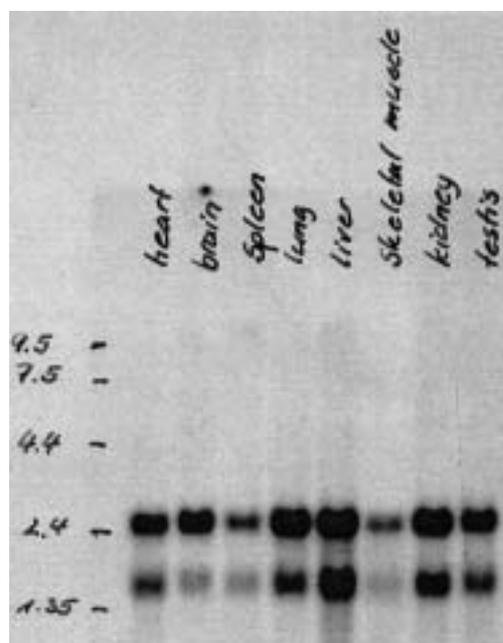


Abb. 1.7: Northernblot. Die poly-A RNA aus verschiedenen Rattengeweben (Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden) wurden mit einer hsp-cDNA-Sonde auf das Vorhandensein der Sap-RNA geprobt (aus Becker et al., 1999).

Über die Funktion und die Lokalisation des humanen Homologs von SAP47 ist ebenfalls nichts bekannt.

1.8. Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es, das SAP47-Protein aus *Drosophila* und die zugehörige Proteinfamilie näher zu charakterisieren. Mit Hilfe einer Überexpressions- und einer Nullmutante für SAP47 in *Drosophila* sollten Hinweise auf die Funktion des Proteins gewonnen werden. Parallel dazu wurde durch Co-Immunpräzipitation nach Interaktionspartnern gesucht.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass der monoklonale Antikörper, welcher zur Identifizierung von SAP47 in *Drosophila* führte, in Vertebraten ebenfalls ein gehirnspezifisches Protein erkennt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, herauszufinden, ob es sich hierbei um das humane Homolog von SAP47 handelt.

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen das humane Homolog von SAP47 sollte Aufschluss über Funktion und Lokalisierung dieses Proteins gewonnen werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da sich in der Region Xp22.2, in welcher das humane Homolog kartiert, einige sehr interessante Erbkrankheiten befinden. Zu erwähnen sind vor allem X-gebundene mentale Retardierungen, deren molekulare Ursache ungeklärt ist.

2. Material

2.1. Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Amersham, Applichem, GIBCO BRL, ICN, Merck, Roth und Sigma in p.a. Qualität bezogen und verwendet.

Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme stammen von den Firmen GIBCO BRL, Boehringer Mannheim (Roche) und New England Biolabs (NEB).

2.2. Reaktionskits

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Perkin Elmer)

DNA Labelling Kit (MBI Fermentas)

ECL Western Blotting analysis Sytem (Amersham Pharmacia)

QIAquick Gelextraction Kit (QIAgen)

QIAquick PCR Purification Kit (QIAgen)

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAgen)

QIAgen Plasmid Midi Kit (QIAgen)

Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories)

2.3. Immunglobuline

MAK nc46, MAK nc82, MAK ab49, MAK 3C11 (A. Hofbauer)

PAK DSYT (Dianova)

MAK anti-Synapsin (R. Jahn)

goat anti-mouse Ig HRP Conjugate (BioRad)

PAK rabbit anti-lacZ (Cappel)

goat anti-rabbit Ig Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes)

goat anti-mouse Ig Cy3 conjugate (Dianova)

goat ant-HRP FITC conjugate (Cappel)

anti-BIP (Dianova)

2.4. Lebendmaterial

2.4.1. Bakterienstämme

Alle verwendeten Stämme sind in Sambrook et al., 1989, beschrieben.

E. coli XL1-Blue

E. coli DH5 α

2.4.2. Fliegenstämme

W1118 (Arbeitsgruppe Buchner)

WT Berlin (Arbeitsgruppe Buchner)

TM3/TM6 (Arbeitsgruppe Buchner)

Rhodopsin-Gal4 (A. Keller)

Elav-Gal4 (A. Keller)

Hs-Gal4 (M. Schwärzel)

Actin-Gal4 (M. Schwärzel)

2.4.3. Mäuse und Ratten

Balb/c, weibl., 8-12 Wochen alt

Wistar, weibl., 8-12 wochen alt

2.5. DNA-Material

2.5.1. Vektoren:

pBluescript KS (Stratagene)

pPUAST (Stratagene)

pOT2 (Stratagene)

2.5.2. EST-Klone

Sämtliche verwendeten EST-Klone (Synapsin, BiP) wurden am Ressourcenzentrum in Berlin bestellt und sind dort beschrieben.

2.5.3. Primer (alle von MWG)

T7: 5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG- 3'

T3: 5' -CAA TTA ACC CTC ACT AAA G- 3'

Sap-sense: 5' -CCT ACT AGA TCT CCA ACA TGT TTT CGG GCC TAA- 3'

Sap-antisense: 5' -CTT AAC GCG GCC CAT TCA ATC TTC ATC TTC- 3'

Blp-forward: 5' -GGA AGA TCT AAA ATT TAC CTG AAG GAC G- 3'

Blp-reverse: 5' -CCG GTA CCT TAT TTT CAA ACC CCA AG- 3'

2.6. Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen entsprechen den Angaben in den jeweiligen Protokollen der Reaktionskits oder den angegebenen Referenzen.

2.7. Geräte und sonstiges Material

ABI PRISM Sequencer (Perkin Elmer)

Glashomogenisatoren

Fastblot-Kammern (Biometra)

Kryostat (Reichert-Jung)

Mini-Gel Apparatur (Biometra)

Maxi-Gel Apparatur (Biometra)

Mupid-Gelelektrophoresekammer (Eurogentec)

Tischzentrifugen (Eppendorf)

Ultrazentrifuge, sowie Einsätze und Polyallomerröhrchen (Beckmann)

Vibratom

3. Methoden

Allgemeine und grundlegende Methoden wie DNA-Verdau, Ligation, Gelelektrophorese von Proteinen und DNA, Westernblot, Konzentrationsbestimmungen, Transformation von kompetenten Bakterien, etc sind, soweit nicht anders angegeben, den Laborhandbüchern Maniatis et al. (1982) und Sambrook et al. (1989) entnommen. Bei Verwendung von Enzymen und Reaktionskits wurden die Angaben der Hersteller befolgt.

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Präparative Methoden von DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979), oder nach dem Protokoll von Qiagen mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit beziehungsweise für größere Mengen mit dem Plasmid Midi Kit.

Die Elution einzelner DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte mithilfe des Gel Extraction Kit der Firma Qiagen.

3.1.2. Herstellung und Transformation von elektrokompentenen Zellen

Für die Herstellung und Transformation elektrokompentener Zellen wurden die Bakterienstämme E.coli XL1-blue und E.coli DH5 α verwendet. Die Herstellung erfolgte nach dem Protokoll von Dower et al. (1988).

3.1.3. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgt nach der Sanger-Methode mithilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix und anschließender Analyse im ABIprism Sequencer von Perkin Elmer.

3.1.4. Linker-PCR

Ist die Klonierung von DNA zunächst durch das Fehlen von Restriktionsschnittstellen nicht möglich, können durch entsprechende Primersequenzen Restriktionsschnittstellen angehängt werden. Dabei sollte der Überhang im Vergleich zu der komplementären Primersequenz nicht zu lang sein und trotzdem ein Schneiden der Restriktionsenzyme erlauben. Die Schmelztemperatur sollte bei ca. 70°C liegen und der Primer sollte nicht selbstkomplementär sein.

3.1.5. Gal4-UAS-System

Das Gal4-UAS-System wurde 1993 von Brand und Perrimon entwickelt. Es nutzt den Transkriptionsaktivator Gal4 aus der Hefe zur gezielten gewebsspezifischen Genexpression eines Transgens. Das Enhancerelement UAS, im Konstrukt dem Transgen vorgeschaltet, ist hierbei die Erkennungssequenz für Gal4. Nach erfolgreicher Insertion des Konstruktes im Genom einer Fliege kann diese nun mit einem Stamm verkreuzt werden, welcher gewebsspezifisch Gal4 exprimiert. Gal4 bindet an UAS, die Transkription des Transgens wird aktiviert.

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Biometra

Die Gele wurden nach den Angaben des Herstellers Biometra gegossen und in der Elektrophoresekammer eingespannt. Die Proben für die Analyse wurden 5min bei 68°C aufgeköcht. Unter Kühlung wurde die Elektrophorese bei 25-50mA pro Gel durchgeführt.

3.2.2. Fastblot nach Biometra

Während des Semi-dry-Blotting-Verfahrens (Khyse-Anderson, 1984) werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt, die zuvor in Transferpuffer getränkt wurde. Bei einer konstanten Stromstärke von maximal 5mA/cm² Gelfläche über eine Dauer von einer Stunde sollte die maximale Leistung von 6 Watt nicht überschritten werden.

3.2.3. Spezifische Proteinfärbung mittels Antikörpern und ECL-Detektion (Amersham)

Der Nachweis einzelner Proteine aus Gewebehomogenaten auf der Nitrozellulosemembran erfolgte mit dem „ECL Western blotting analysis System“ der Firma Amersham.

3.2.4. Proteinlokalisierung durch Zellfraktionierung

Durch Zentrifugation von Zellhomogenaten lassen sich einzelne Zellbestandteile auftrennen. Mäuse- und Rattengehirne (2-40) wurden sofort nach Entnahme in Homogenisierungspuffer (enthält Proteinaseinhibitoren der Firma Boehringer Mannheim) aufgenommen. Für einen Ansatz Fliegenhirnhomogenat wurden ca. 10ml Fliegen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Köpfe von anderen Teilen durch Schütteln über Siebe getrennt. Sämtliche Gehirne beziehungsweise Fliegenköpfe wurden in einem Glashomogenisator homogenisiert.

Nach der Homogenisierung lassen sich im ersten Zentrifugationsschritt bei 1 000g für 10min bei 4°C Detritus und Kerne (Pellet 1) von allen übrigen Bestandteilen (Überstand 1) trennen. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 100 000g für eine Stunde bei 4°C trennen sich die cytosolischen Proteine (Überstand 2) von Membran- und Cytoskelettproteinen (Pellet 2). Durch Behandlung des Pellet 2 mit Detergenzien kann ein Großteil der membranständigen Proteine aus der Membran herausgelöst werden. Im anschließenden Zentrifugationsschritt bei 100 000g für eine Stunde bei 4°C finden sich gelöste Membranproteine im Überstand 3. Zur Analyse im Westernblot werden einzelne Proben mit denaturierendem Lämmli-Puffer versetzt.

3.2.5. Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe eines Glycerindichtegradienten ist eine weitere Auftrennung in leichtere (synaptische Vesikelmembranen) und schwerere Membranen (Plasmamembranen) möglich. Dafür wird das mit Detergenzien behandelte Pellet 2 auf eine Schichtung verschiedener Glycerinkonzentrationen (25%, 20%, 15%, 10%, 5%) auf ein 50% Sucrosekissen gegeben und anschließend bei 100 000g und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Hierbei verteilen sich die unterschiedlichen Membranfraktionen aufgrund ihrer spezifischen Dichte im Gradienten.

3.2.6. Immunpräzipitation

3.2.6.1. Prinzip der Immunpräzipitation

Unter Immunpräzipitation versteht man die Anreicherung eines Antigens und gegebenenfalls dessen Interaktionspartner über einen spezifischen Antikörper. Durch Bindung des konstanten Teils des Antikörpers an Protein A oder Protein G können die Antigen-Antikörper-Komplexe aus einem Gewebehomogenat aufgereinigt werden.

3.2.6.2. Protein G Sepharose Säule (Amersham Pharmacia)

Das Gewebehomogenat wurde in einem Verhältnis von 1:1 über Nacht bei 4°C mit dem Antikörper (Hybridoma-Überstand) bei einem pH von 6,8 inkubiert. Im nächsten Schritt wird die Antigen-Antikörperlösung durch die mit Natriumphosphatpuffer auf pH 6,8 eingestellte Säule bei 4°C gespült. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers werden nach mehreren Waschschritten die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Natriumcitrat (pH 2,7) von der Säule eluiert. Die einzelnen Elutionsfraktionen können anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung und Westernblot analysiert werden.

3.2.6.3. Protein A Agarose Beads (Boehringer Mannheim)

Nach Angaben des Herstellers wird die Antigen-Antikörperlösung über Nacht bei 4°C mit 30µl Protein A Agarose Beads inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wird nach Abzentrifugieren der Beads der Überstand entfernt. Die Beads samt der gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe werden in Lämmliprobenpuffer aufgenommen. Nach Erhitzen für drei Minuten bei 65°C können die Beads abzentrifugiert werden. Der Überstand enthält dann den Antikörper und die präzipitierten Proteine.

3.3. Histochemische Methoden

3.3.1. Prinzip der Immunhistochemie (IHC)

Das Prinzip der IHC basiert auf der Erkennung eines fixierten Antigens durch ein spezifisch gegen dieses gerichteten primären Antikörper. Ein zweiter biotinylierter Antikörper, welcher gegen Immunglobulin der Spezies gerichtet ist, der der Primärantikörper entstammt, bindet an letzteren. Durch Zusetzen eines Komplexes aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase und anschließender Zugabe des Substrates DAB (Diaminobenzidintetrahydrochlorid) als Chromogen kann der Antigen-Antikörperkomplex sichtbar gemacht werden.

3.3.1.1. IHC an Gefrier- und Vibratomschnitten von Maus- und Rattengehirnen

Die Mäuse und Ratten wurden mit Trockeneis betäubt, dekapitiert und die Gehirne entnommen. Für die IHC an Gefrierschnitten wurden die Gehirne in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Isopentan eingefroren. Das Gewebe wurde bei -80°C aufbewahrt. 2-10µm dicke Schnitte wurden mit Hilfe eines Kryostaten bei -20°C angefertigt, auf Objektträger montiert und anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Für die IHC an Vibratomschnitten wurden die Gehirne in 4% Paraformaldehyd fixiert und zur Kryoprotektion zuerst in 15%-ige dann in 30%-ige Sucroselösung gegeben. 100µm dicke Schnitte wurden mit Hilfe eines Vibratoms angefertigt und in TRIS-Puffer aufgefangen.

3.3.1.2. IHC an Gefrierschnitten von Fliegengehirnen

2-5 Tage alte Fliegen wurden wie in Buchner et al. (1986) beschrieben auf Eis betäubt, die Gehirne präpariert und in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach Kryoprotektion in 25%-iger Saccharose in *Drosophilaringer* für 12 Stunden wurden Serienschnitte des Fliegengehirns am Kryostaten angefertigt.

Alle Färbungen wurden mit dem Vectastain ABC Kit durchgeführt und die dort vorgeschlagenen Anweisungen befolgt. Nach halbstündigem Blocken der endogenen Peroxidase mit 0,3% Wasserstoffperoxid, mehrmaligem Waschen in Puffer und Vorinkubation in normalem Blockserum werden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper, verdünnt in Puffer, inkubiert. Am nächsten Tag werden die Schnitte nach dem Waschen für eine Stunde bei 37°C mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen werden die Schnitte der Peroxidasesubstratlösung so lange ausgesetzt, bis die gewünschte Farbeintensität erreicht ist. Die Reaktion wird in Wasser abgestoppt und die Schnitte mit erwärmter Glycerollösung eingedeckelt.

3.4. Drosophilazucht

3.4.1. Standardkultur

Die Fliegen werden entweder bei 18°C oder bei 25°C in durchsichtigen, mit Nährmedium gefüllten, Schaumstoff verschlossenen Plexiglasgefäßen gehalten.

3.4.2. Keimbahntransformation und Einzelkreuzungen

Durch Keimbahntransformation können *in vitro* hergestellte DNA-Fragmente in das Genom von *Drosophila* eingebracht werden (Spradling und Rubin, 1982). Die Versuche wurden nach dem von Körner (1995) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Nach dem Verbreitern von w1118 Fliegen werden diese zum Abeiern auf mit Hefe bestrichene Eiablageplatten gesetzt. 30min alte Embryonen werden abgesammelt, in 7% Natriumhypochlorid dechorioniert und in gleicher Orientierung aufgereiht. Für die Keimbahntransformation werden 60µg Transformationsvektor und 20µg Helferplasmid (pUCHsπΔ2-3) in den posterioren Pol der Embryonen injiziert. Sind die Embryonen nicht älter als 90min, so befinden sie sich noch im Stadium des syncytialen Blastoderms. Somit kann der P-Element-Vektor zusammen mit dem Transgen in die embryonale Keimbahn eingebracht werden. Nach dem Schlüpfen erster Larven werden diese in mittelgroße Breigläser überführt. Geschlüpfte Fliegen werden einzeln mit drei anders geschlechtlichen w1118 Fliegen verpaart. Da der Transformationsvektor einen roten Augenfarbenmarker trägt, können die Nachkommen mit erfolgreicher Insertion des P-Elementes selektioniert werden. Eine markertragende Fliege wird wiederum mit drei anders geschlechtlichen w1118 Fliegen einzeln verpaart. Sind in der nächsten Generation alle Männer weißäugig, so hat die Insertion auf dem X-Chromosom stattgefunden. Ist dies nicht

der Fall, werden rotäugige Fliegen mit dem Balancerstamm TM3/TM6 verkreuzt, um die Insertion auf dem zweiten oder dritten Chromosom auszumachen.

3.5. Bioinformatik

Im Zuge der Sequenzierung kompletter Genome steht eine immer größer werdende Datenmenge über das Internet zur Verfügung.

Zu den wichtigsten öffentlich zugänglichen Datenbanken für DNA gehören die Datenbank am EMBL (European Molecular Biology Laboratory), GenBank (Nordamerika) und DDBJ (DNA Databank of Japan), für Proteine sind dies Swiss-Prot und TrEMBL (Translate EMBL).

Eine typische Fragestellung zum Durchsuchen dieser Datenbanken ist die Suche nach Sequenzähnlichkeiten, um zum Beispiel Hinweise auf die Funktion unbekannter Proteine zu bekommen.

Zum Durchsuchen dieser Datenbanken wurden „Suchmaschinen“ entwickelt. Das Prinzip der zugrundeliegenden Suchalgorithmen ist der Vergleich der eingegebenen Sequenz mit allen in der Datenbank vorhandenen Sequenzen. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Algorithmen in der Sensitivität und der Geschwindigkeit.

3.5.1. BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ist ein einfacher aber extrem schneller heuristischer Algorithmus. Die Geschwindigkeit geht auf Kosten der Präzision der Ergebnisse. Auf diese Weise können marginale, aber dennoch signifikante Ergebnisse fehlen. Die Statistik, die in diesem Algorithmus enthalten ist, basiert auf den Arbeiten von Karlin und Altschul (1990). Sie bietet eine Schätzung der statistischen Signifikanz der gefundenen Treffer und wird als E-Wert angegeben.

3.5.2. CLUSTALW

CLUSTALW wurde von Thompson, Higgins und Gibson 1994 entwickelt und ist ein progressives multiples Alignmentprogramm. Der Algorithmus vollzieht drei Schritte: im ersten werden alle Sequenzen paarweise aligniert, im zweiten wird dasjenige Alignment bestimmt mit der höchsten Punktzahl aufgrund größter Ähnlichkeit, im dritten werden alle weiteren Sequenzen nacheinander zu diesem ausgewählten Alignment hinzugefügt. Obwohl manchmal mehrere paarweise Alignments gleich gut sein können, wird an dieser Stelle nur

ein Alignment ausgewählt, mit welchem weiter fortgefahren wird. Das kann zu Fehlern führen, die nicht mehr korrigiert werden können.

3.5.3. Hidden Markov Modelle

Eine der interessantesten Entwicklungen auf dem Gebiet der Sequenzanalysealgorithmen beinhaltet die Benutzung einer bestimmten Klasse statistischer Methoden, genannt Hidden Markov Modelle (HMMs). Einfach gesprochen ist ein HMM die genaue Beschreibung einer Verteilung von Wahrscheinlichkeiten über eine endliche Anzahl von Sequenzen (Eddy, 1996). Programme wie HMMer durchsuchen Datenbanken mit Profilen, beruhend auf der Verteilung von Wahrscheinlichkeiten. Programme dieser Art sind daher sehr sensitiv aber extrem langsam.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung und Identifizierung des nc46 Antigens in Vertebraten

Darstellung des Vertebraten-nc46-Antigens im Westernblot

Wie bereits in der Einleitung beschrieben erkennt der monoklonale Antikörper nc46 im Westernblot von *Drosophilagehirnhomogenat* eine spezifische Bande, das SAP47 Protein. Auch in Vertebratengehirnhomogenaten wird ein gehirnspezifisches Protein von dem Antikörper erkannt.

In der folgenden Abbildung 4.1 ist ein Westernblot mit Homogenaten aus verschiedenen Geweben der Maus zu sehen.

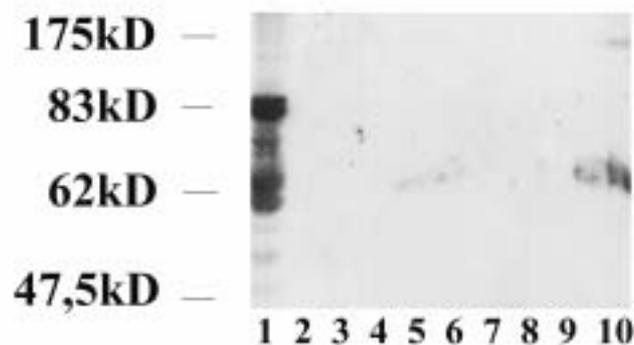


Abb. 4.1: Westernblot mit verschiedenen Maushomogenaten, Verdünnung des Antikörpers nc46 1:100, Spuren 1: Gehirn, 2: frei, 3: Marker, 4: Leber, 5: Milz, 6: Niere, 7: Herz, 8: Skelettmuskel, 9: Lunge, 10: Magen. Jeweils ca. 100mg Gewebe wurden in 200 μ l 2x Lämmli-Puffer homogenisiert. Pro Spur wurden 5 μ l aufgetragen.

Lediglich im Gehirnhomogenat ist eine Doppelbande bei 83kD zu erkennen. Bei den darunter liegenden Spuren handelt es sich um Abbauprodukte.

In Gehirnhomogenaten anderer Vertebraten z.B. der Ratte, des Schweines und des Menschen findet sich ebenfalls eine Doppelbande auf der Höhe von 83kD (Daten nicht gezeigt).

Proteinlokalisierung durch Zellfraktionierung

Für die spätere Aufreinigung des nc46-Antigens ist die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle von Bedeutung. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob es sich um ein cytoplasmatisches oder ein membrangebundenes Protein handelt.

In der folgenden Abbildung 4.2 ist die subzelluläre Fraktionierung von Mausgehirnhomogenat im Westernblot dargestellt.

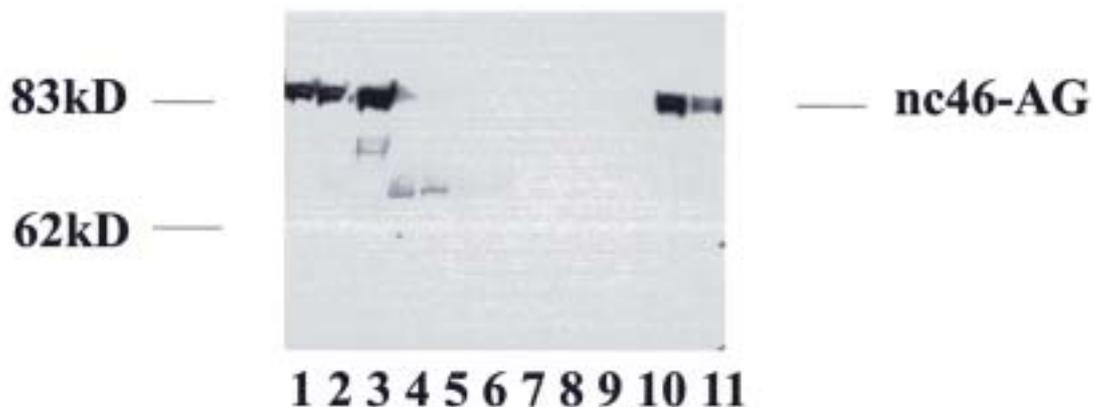


Abb. 4.2: Westernblot von Mausgehirnhomogenat, Verdünnung des Antikörpers nc46 1:100, Spuren 1: Gehirnhomogenat als Kontrolle, 2: Pellet 1 (Zellkerne und Debris von 100mg Gehirnen homogenisiert in 1ml Homogenisierungspuffer, nach 10min Zentrifugation bei 1000g), 3: Überstand 1, 4, 5, 6: Überstand 2 (lösliche Proteinfraction, nach 1h Zentrifugation bei 100 000g), 7 ,8 ,9: Überstand 3 (nach Lösen des halben Pellets 2 in 250µl Homogenisierungspuffer mit 1% Triton und 1h Zentrifugation bei 100 000g), 10, 11: Membranfraktion (andere Hälfte von Pellet 2, gelöst in 250µl 2x Lämmli-Puffer). Pro Spur wurden jeweils 5µl aufgetragen.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass es sich bei dem nc46-Antigen in Vertebraten um ein membrangebundenes Protein handelt.

Um das Protein aus der Membran herauslösen zu können, wurden verschiedene Detergenzien ausgetestet. Die Solubilisierungsbedingungen sollten so mild wie möglich gewählt werden und die Konzentration des Detergenz so niedrig wie nötig verwendet werden. Allgemein

sollten nichtionische, bzw. zwitterionische (z.B. Brij35, CHAPS) gegenüber ionischen Detergenzien (z.B. SDS) bevorzugt werden. Periphere Membranproteine, die nur oberflächlich an die Membran assoziiert sind, können auch durch hohe Salzkonzentrationen (NaHCO_3) oder extreme pH-Bedingungen solubilisiert werden.

In der Abbildung 4.3 ist die Austestung verschiedener Detergenzien im Westernblot dargestellt. Alle getesteten Detergenz- und Salzkonzentrationen führen zu einer deutlichen Freisetzung des nc46 Antigens aus dem Pellet 2.

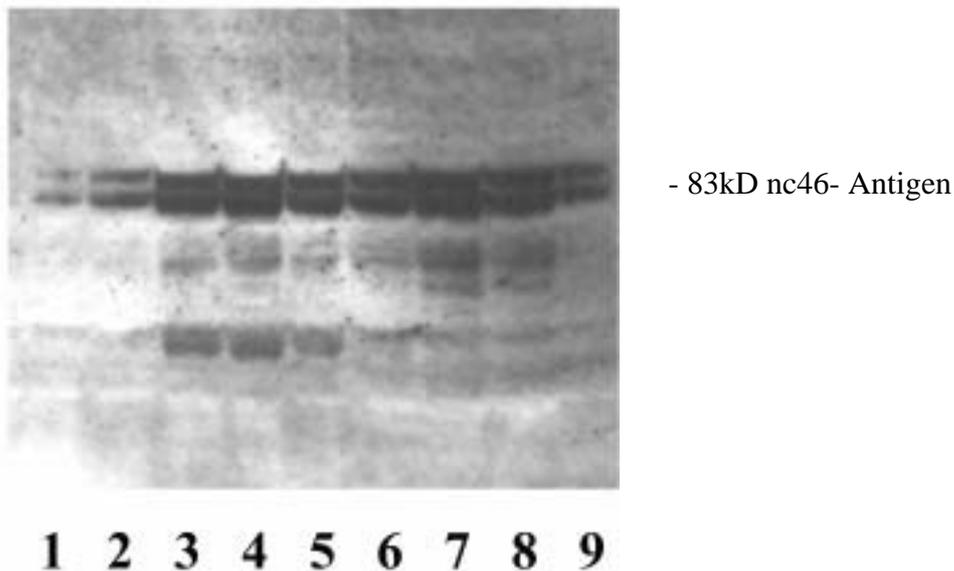


Abb. 4.3: Westernblot von Membranfraktionen nach Austestung verschiedener Detergenzien, Verdünnung des nc46 1:100. Das Pellet 2 von 100mg Gehirn homogenisiert in 1ml Homogenisierungspuffer wurde in 250 μ l Homogenisierungspuffer mit Detergenz bzw. NaHCO_3 aufgenommen und nochmals 1h bei 100 000g zentrifugiert. Der Überstand 3 wurde 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer versetzt, pro Spur wurden jeweils 10 μ l aufgetragen. Spuren 1, 2, 3: mit je 1%, 1,5%, 2% Brij 35, Spuren 4, 5, 6: mit je 1%, 2%, 5% CHAPS, Spuren 7, 8, 9: 100mM NaHCO_3 .

Immunhistochemie an Vibratomschnitten von Mausgehirn

Nachdem die Membranlokalisierung des nc46-Antigens feststand, sollte anhand von Vibratomschnitten das Vorkommen des Proteins im Mausgehirn dargestellt werden. Als modellhafte Hirnregion wurde der Hippocampus, ein phylogenetisch alter Bestandteil des

Vertebratengehirns ausgewählt. Aufgrund seiner einfachen Struktur ist er gut zur Bearbeitung neurobiologischer Fragestellungen geeignet. Am auffälligsten ist die klare Gliederung in Schichten (siehe Abb. 4.4).

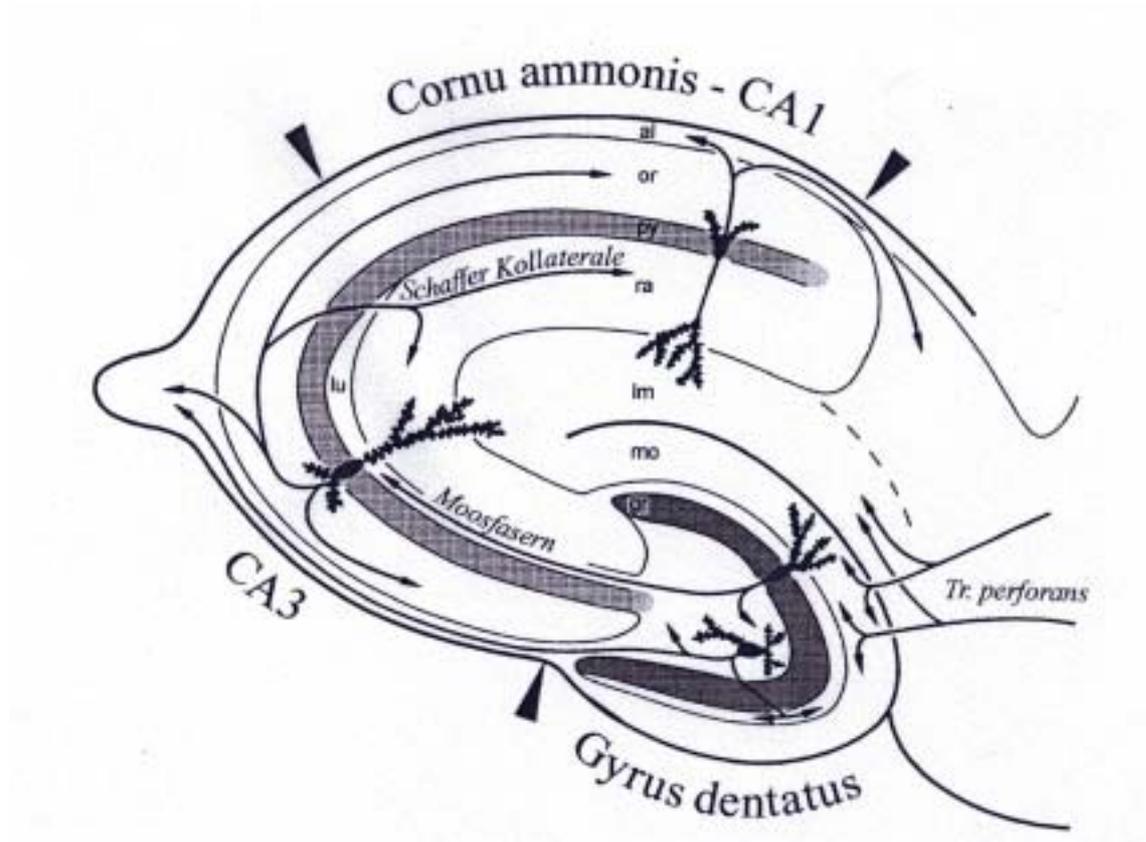


Abb. 4.4: Organisation des Hippocampus (Storm-Mathisen und Otterson, 1989). Al, alveus; or, Str. oriens; py, Str. pyramidale; ra, Str. radiatum; lm, Str. lacunosum moleculare; mo, Str. moleculare; gr, Str. granulosum; lu, Str. lucidum; CA, Cornu ammonis-Sektor.

In der folgenden Abbildung 4.5 ist Lokalisierung des nc46-Antigens in Frontalschnitten von Mausgehirn dargestellt.

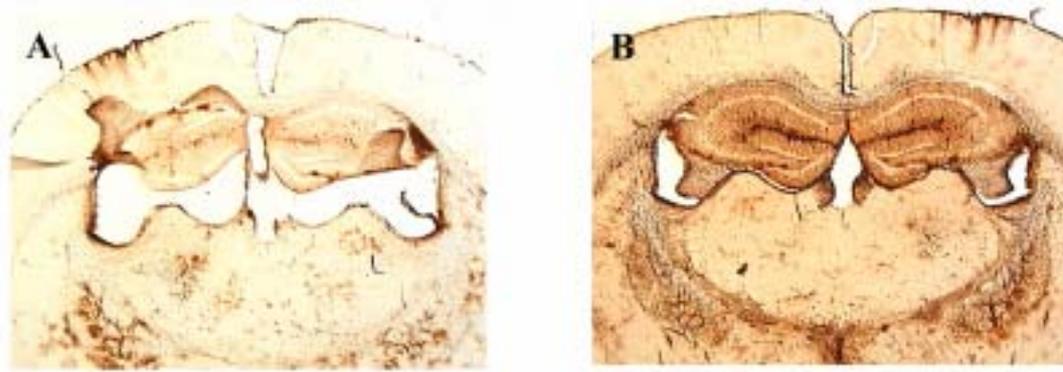


Abb. 4.5: A: Negativkontrolle ohne Antikörper, B: Positivkontrolle mit einem Antikörper gegen den Astrozytenmarker GFAP, Verdünnung 1:1 000.

Aufgrund der Vermutung, dass der nc46 ein synapsenassoziiertes Protein erkennt, sollten nc46 markierte Schnitte mit Schnitten verglichen werden, bei denen ein bekanntes Synapsenprotein, in diesem Fall Synaptophysin, angefärbt wurde.

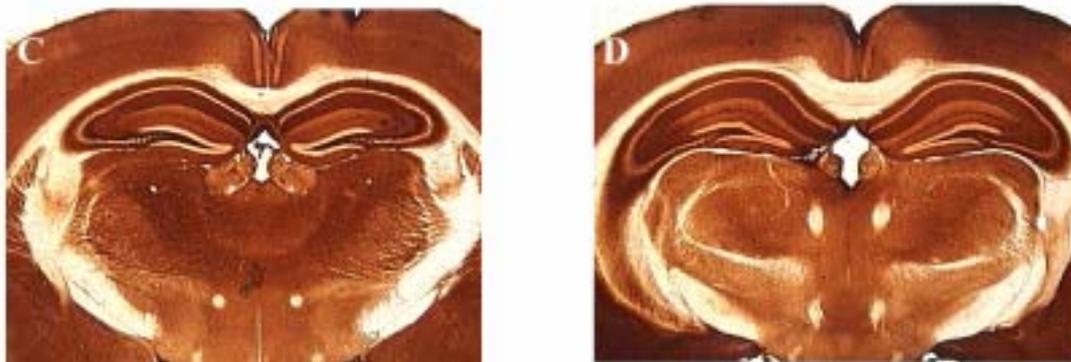


Abb. 4.6: C: zeigt eine Färbung mit dem nc46, Verdünnung 1:100, D: zeigt eine Färbung mit einem Antikörper gegen das Synapsenprotein Synaptophysin, Verdünnung 1:2 000.

Aus den Übersichtsaufnahmen sind nicht gefärbte und unterschiedlich stark gefärbte Areale bei Färbungen mit den beiden Antikörpern nc46 und anti-Synaptophysin zu erkennen. Beide Antikörper zeigen ein nahezu identisches Bild. Nicht oder schwach gefärbte Bereiche entsprechen synapsenfreien bzw. -armen Regionen von Nervenfaserversträngen wie zum Beispiel dem Corpus callosum, der Verbindungsbrücke beider Hemisphären. Ebenfalls schwach gefärbt sind die Zelllagen der Zellkörper von Pyramiden- und Körnerzellen. Besonders stark dagegen sind Bereiche angefärbt worden, in denen hohe Zahlen von

Synapsen ausgebildet werden. Hervorzuheben ist dabei insbesondere das Stratum lucidum. Hier bilden die sogenannten Moosfasern synaptische Kontakte mit den Pyramidenzellen aus.

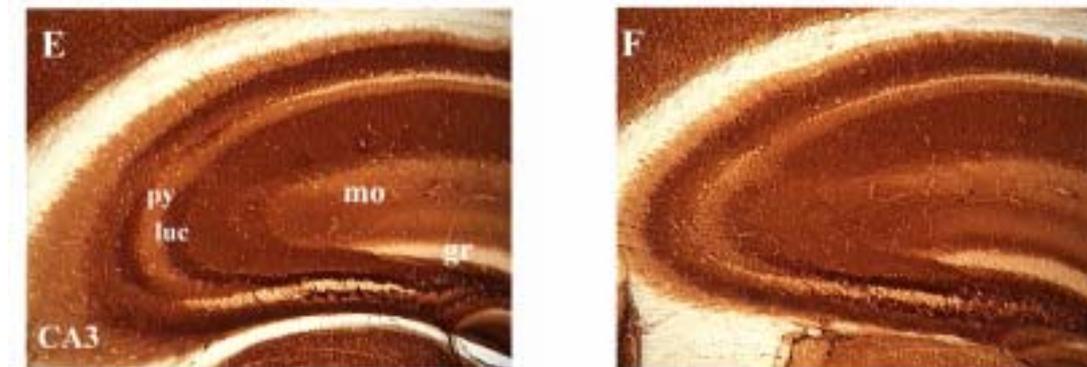


Abb. 4.7: E: Färbung mit dem nc46, F: Färbung mit dem Antikörper gegen Synaptophysin. 20-fache Vergrößerung aus der Region des Ammonshorn des Schnittes C bzw. D, die Einteilung in verschiedenen Schichten ist deutlich zu erkennen. CA, Cornu ammonis mit dem Abschnitt CA1; mo, Stratum moleculare; gr, Stratum granulare; py, Stratum pyramidale.

In der folgenden Abbildung 4.8 ist das Stratum lucidum noch einmal vergrößert dargestellt.

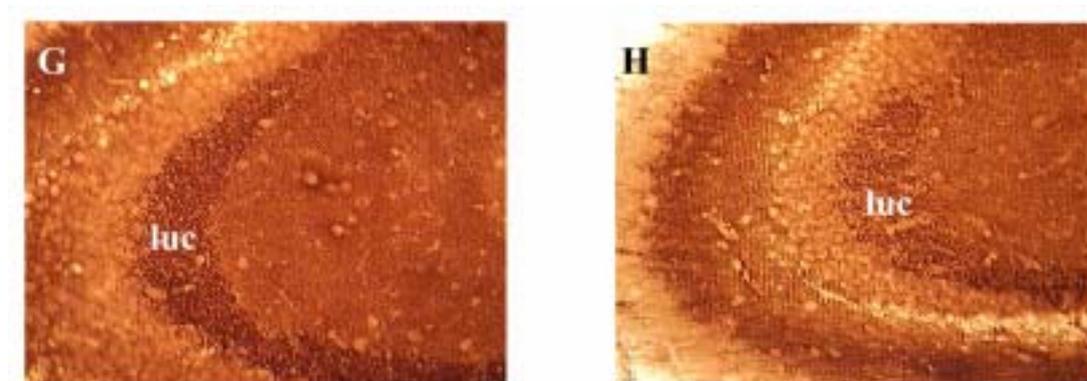


Abb. 4.8: G: Färbung mit dem nc46, H: Färbung mit dem Antikörper gegen Synaptophysin. 40-fache Vergrößerung aus der CA3-Region des Hippocampus des Schnittes C bzw. D, eine besonders starke Färbung durch beide Antikörper ist im Stratum lucidum (luc) zu sehen. Aufgrund der durchgeführten Färbungen erhärtete sich die Vermutung, es könne sich bei dem von dem nc46 erkannten Protein um ein synapsenassoziiertes Protein handeln.

Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation können leichte von schweren Membranen nochmals aufgetrennt werden. Handelt es sich um ein Protein, das mit den synaptischen Vesikeln assoziiert ist, so müsste sich das nc46- Antigen in der Fraktion der leichtesten Membranen wiederfinden. Fragmente der Plasmamembran befinden sich in den schweren Membranfraktionen.

In der folgenden Abbildung 4.9 ist das Ergebnis der Dichtegradientenzentrifugation zu sehen.

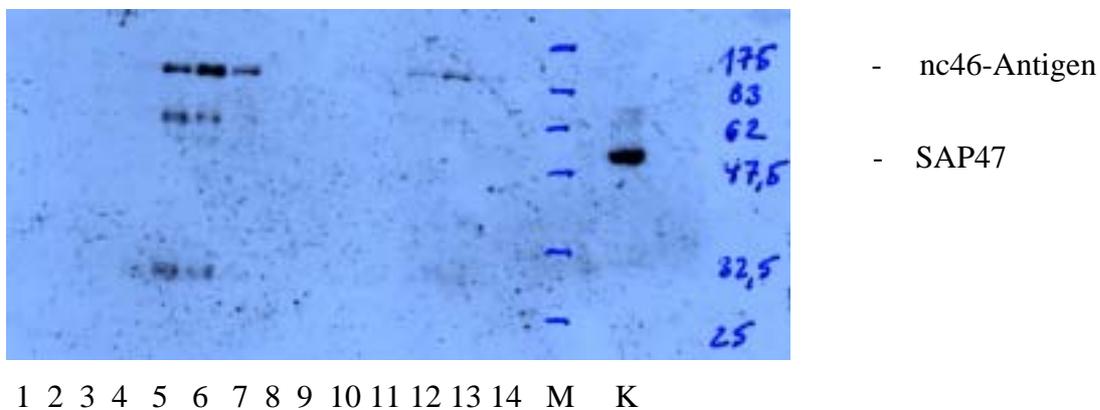


Abb. 4.9: Westernblot nach Dichtegradientenzentrifugation, Verdünnung des nc46 1:100. Das mit Detergenzien behandelte Pellet 2 (siehe Proteinlokalisierung durch Zellfraktionierung) wurde auf eine Schichtung verschiedener Glycerinkonzentrationen (25%, 20%, 15%, 10%, 5%) auf ein 50% Sucrosekissen gegeben und anschließend bei 100 000g und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Die Spuren 1-7 entsprechen jeweils 10µl Probe plus 5µl 2x Lämmli-Puffer, die Spuren 8-14 entsprechen 5µl Probe plus 5µl 2xLämmli-Puffer, wobei für die Spuren 1 und 8 die Proben aus dem 50% Sucrosekissen entnommen wurden, 2 und 9 aus der 25% Glycerinschicht, 3 und 10 aus der 20%-igen, 4 und 11 aus der 15%-igen, 5 und 12 aus der 10%-igen, 6 und 13 aus der 5%-igen und 7 und 14 jeweils aus dem Überstand. K entspricht einem Kontrollfliegenkopf.

Das nc46-Antigen wurde in jener Fraktion im Westernblot erkannt, welche der leichtesten, also der der synaptischen Vesikel entspricht (im Glyceringradienten sind dies die Schichten mit jeweils 10% und 5% Glycerin). Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis, dass es sich um ein synapsenassoziiertes Protein handeln könnte.

Immunpräzipitation

Um die Frage der Identität des nc46-Antigens endgültig klären zu können, sollte das Protein über den Antikörper präzipitiert werden, um eine ausreichende Menge für eine N-terminale Ansequenzierung zu erhalten. Selbst wenn es sich tatsächlich um ein synapsenassoziiertes Protein handelt, so bestehen mehrere Möglichkeiten: der Antikörper erkennt entweder das humane Homolog von SAP47 oder er kreuzreagiert mit einem völlig anderen bekannten oder unbekanntem Protein.

Für die Immunpräzipitation wurden 40 Mäusegehirne homogenisiert (jeweils zwei Gehirne in 2ml Homogenisierungspuffer), die Membranfraktion (Pellet 2) mit 1% CHAPS als Detergenz in 10ml Homogenisierungspuffer behandelt, bei 100 000g für 1h zentrifugiert und anschließend über Nacht der komplette Überstand 3 mit dem Antikörperüberstand 1:1 inkubiert. Die Bindung von Antigen und Antikörper erfolgt optimalerweise bei einem pH unter sieben, in diesem Fall wurde der pH bei 6,8 eingestellt. Am nächsten Tag werden die Antigen-Antikörperkomplexe über eine Protein-G-Sepharose-Säule gegeben.

In der folgenden Abbildung 4.10 ist zu sehen, dass sowohl Antikörper als auch Antigen an die Säule gebunden werden.

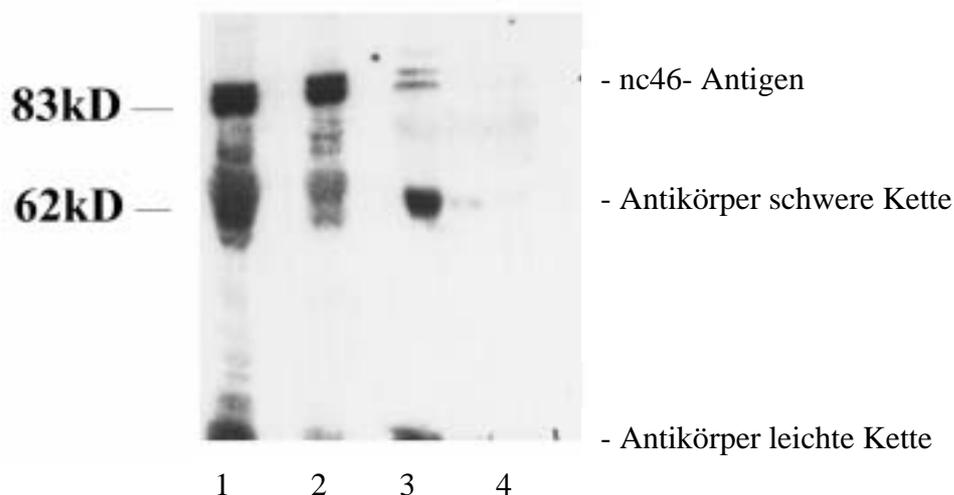


Abb. 4.10: Westernblot von Mausgehirnhomogenat zur Vorbereitung der Immunpräzipitation, 1: Überstand 1 (40 Gehirne, davon jeweils zwei in 2ml Homogenisierungspuffer homogenisiert und 10min bei 1 000g zentrifugiert), 2: Überstand 3 (siehe Text), 3: Antigen plus Antikörper vor Durchtritt durch die Säule, 4: Antigen plus Antikörper nach Durchtritt

durch die Säule, Verdünnung nc46 1:100. Pro Spur wurden jeweils 5µl mit 5µl 2x Lämmli-Puffer versetzt und aufgetragen.

Nach drei Waschsritten mit jeweils 10ml Natriumphosphatpuffer werden die Antigen-Antikörperkomplexe mit 10ml einer 100mM Natriumcitratlösung (pH 2,7) von der Säule eluiert. Im folgenden Westernblot ist das Ergebnis der Elution zu sehen.

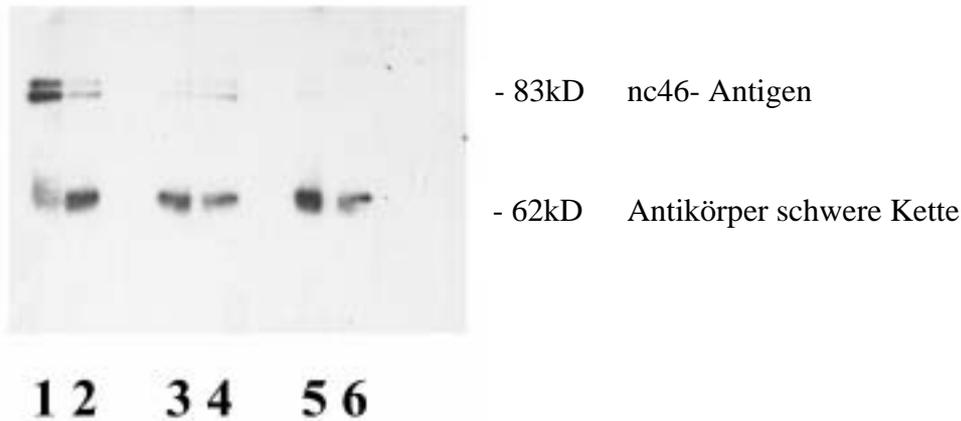


Abb. 4.11: Westernblot nach Elution mit NaCitrat pH 2,7 von der Säule, Spuren 1-6 entsprechen den ersten eluierten 6ml (Eluate 1-6), Verdünnung nc46 1:100. Pro Spur wurden 10µl Eluat mit 5µl 2x Lämmli-Puffer aufgetragen.

In der ersten Elutionsfraktion ist der Großteil des präzipitierten nc46-Antigens enthalten. Nach Auftragen eines Aliquots und Auftrennung im Polyacrylamidgel ist das nc46-Antigen auch schwach nach Coomassie-Färbung des Geles erkennbar (siehe Abb.4.12).

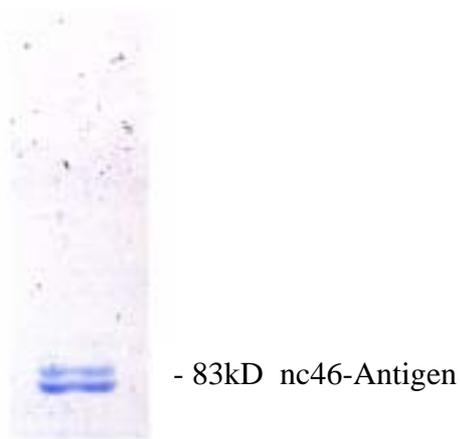


Abb. 4.12: Coomassie-Färbung nach SDS-Page, aufgetragen wurden 15µl der Elutionsfraktion 1.

Edman-Abbau

Für den Edman-Abbau wurde das nc46-Antigen aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylmembran geblottet und kurz mit Coomassie sichtbar gemacht.

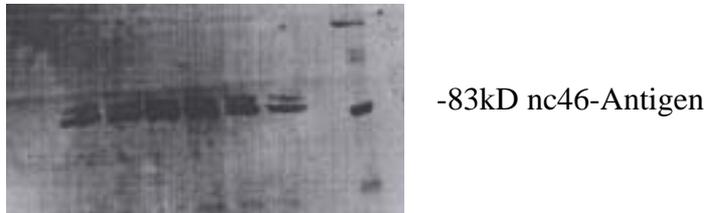


Abb. 4.13: Coomassie-Färbung der Polyvinylmembran, in allen Spuren wurde ein Aliquot von 15µl der Elutionsfraktion 1 aufgetragen.

Anschließend wurden alle unteren Banden ausgeschnitten und dem Edman-Abbau unterzogen. Der Edman-Abbau ist ein zyklischer Prozess, bei dem in jedem Reaktionszyklus eine N-ständige Aminosäure abgespalten und identifiziert wird. Im ersten Schritt, der Kupplung, wird an die N-terminale Aminogruppe das Edman-Reagenz, Phenylisothiocyanat (PITC), gekoppelt. Im zweiten Schritt wird die erste Aminosäure als chemisch instabile Anilinothiazolinon (ATZ)-Aminosäure abgespalten. Im dritten und letzten Schritt wird die chemisch instabile ATZ-Aminosäure in ein stabiles Derivat, der Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäure, umgesetzt. Mit einem RP-HPLC-System können die abgespaltenen PTH-Aminosäuren nacheinander identifiziert werden.

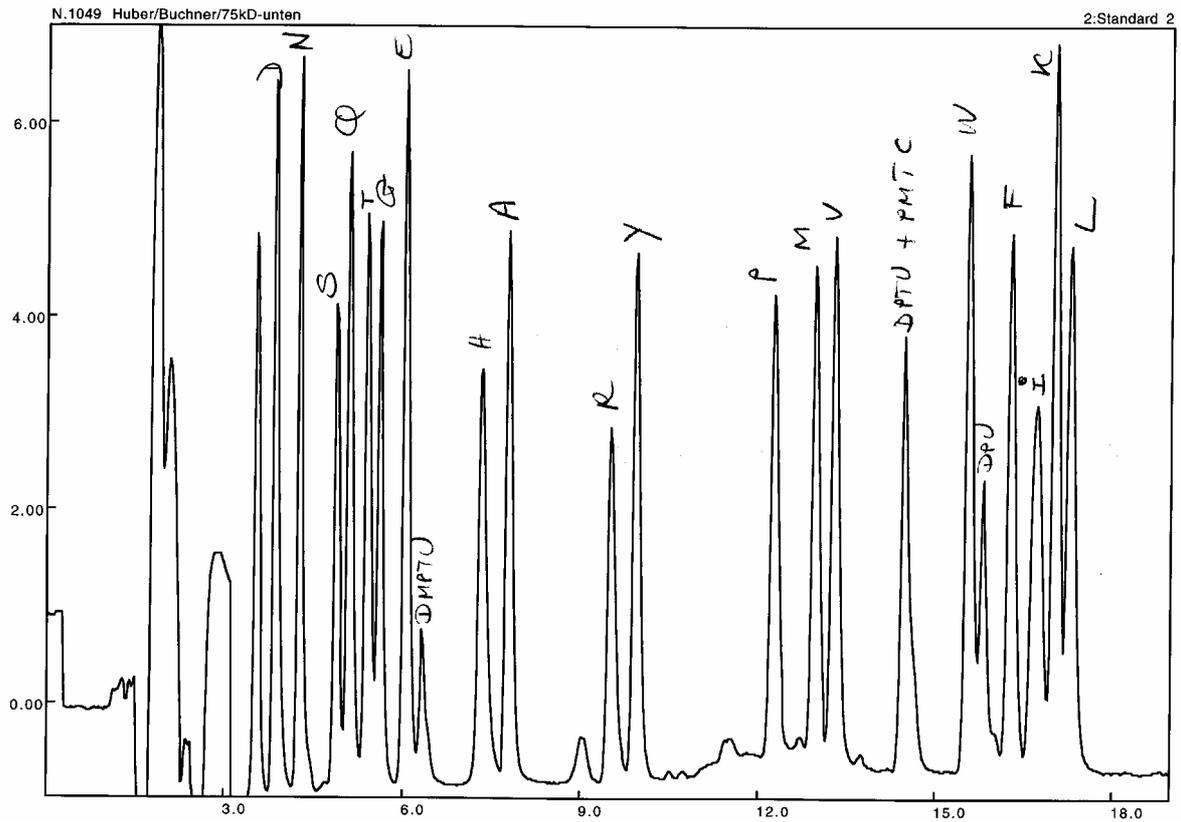


Abb. 4.14: Eichprofil der PTH-Aminosäuren (Lottspeich, Bioanalytik).

Leider führte der Edman-Abbau im Falle des nc46-Antigens zu keinem interpretierbaren Ergebnis (siehe Abb. 4.15, nächste Seite).

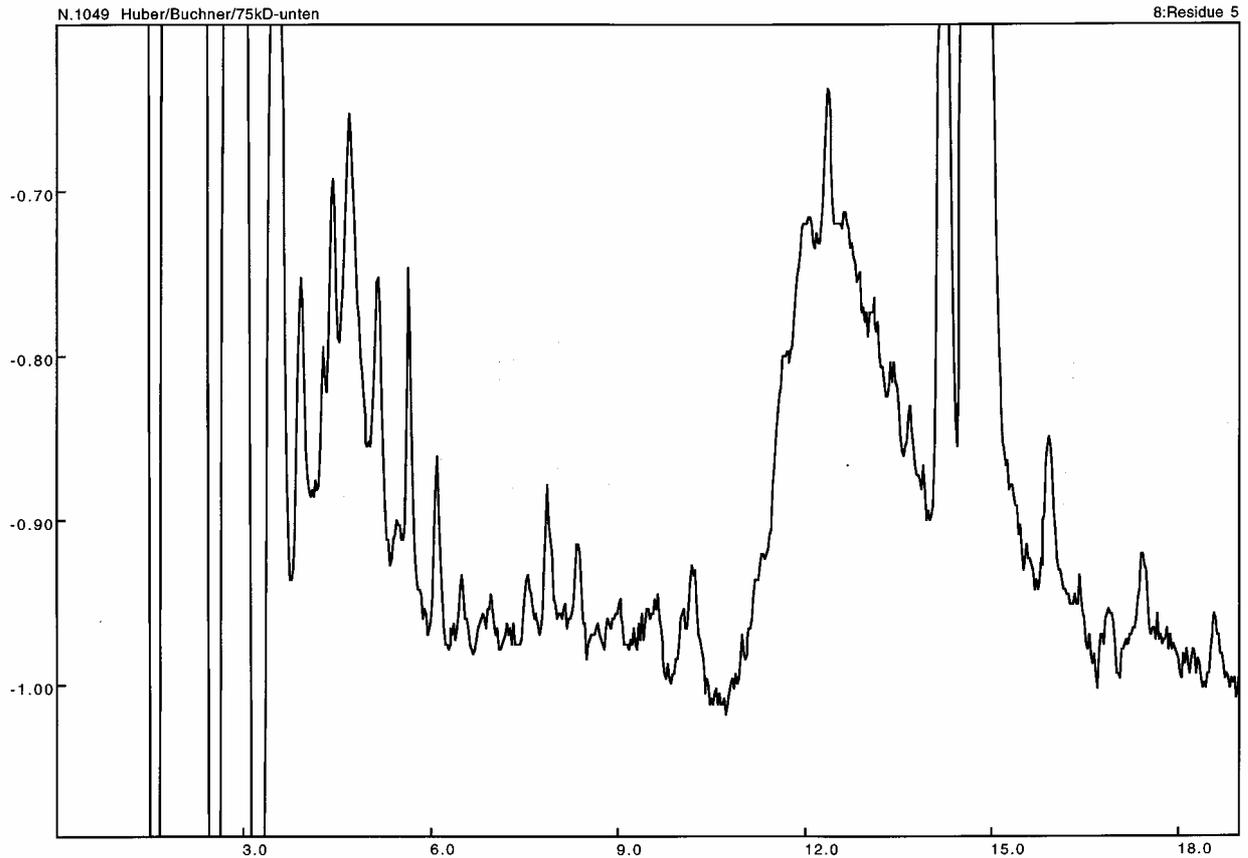


Abb. 4.15: Chromatogramm des Edman-Abbaus des nc46-Antigens.

Gründe hierfür können einerseits eine zu geringe Menge des Antigens sein, andererseits kann eine N-terminale Schutzgruppe den Edman-Abbau verhindern.

Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie können unbekannte Proteine und Peptide identifiziert werden. Hierfür wird das zu analysierende Protein, in diesem Fall das nc46-Antigen, im Polyacrylamidgel mit Trypsin verdaut. In einem Verfahren mit dem Namen MALDI-TOF (Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation - time of flight) wird die Matrix (verdautes Protein im Gel) mit einem Laser beschossen. Dabei werden die verschieden großen Peptide vaporisiert und ionisiert in einem elektrostatischen Feld beschleunigt. In dem Flugzeitmassenspektrometer erfolgt die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit, zwischen dem Start der Ionen und dem Eintreffen am Detektor.

Die massenspektrometrische Identifizierung des nc46-Antigens erfolgte in Dänemark und wurde von der Firma Protana (Matthias Mann) durchgeführt. In der unten stehenden Abbildung 4.16 ist das Ergebnis zu sehen (Detailergebnis siehe Anhang).

Sample Name	Status	Final Identification
#1 78kDa	Identified	SYN1_MOUSE SYNAPSIN I//:sptrem swissnew O88935 and GR78_MOUSE 78 KD GLUCOSE-REGULATED swiss P20029
<i>This sample contains 2 proteins.</i>		
#3 83kDa	Identified	SYN1_MOUSE SYNAPSIN I//:sptrem swissnew O88935

Abb. 4.16: Ergebnis der Identifizierung des nc46-Antigens durch MALDI-TOF.

Die obere Bande bei 83kD entspricht somit Maussynapsin I. Die untere Bande bei 78kD enthielt zwei Proteine: Maussynapsin I und BiP (Binding Protein, Gr78, Glucose reguliertes Protein aus der HSP70-Familie; ER-resident, hilft anderen Proteinen bei der Faltung).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der monoklonale Antikörper nc46 in *Drosophila* das gehirnspezifische Protein SAP47 erkennt, während in Vertebraten sowohl Synapsin I als auch BiP erkannt werden.

Kreuzreaktion des nc46 mit BiP

Zunächst sollte geklärt werden, ob es sich bei BiP um eine Kreuzreaktion des Antikörpers handelt, oder ob BiP als möglicher Interaktionspartner von Synapsin in Frage kommt. Dafür wurde ein BiP-Expressionsklon vom humanen Ressourcenzentrum in Berlin bestellt. Nach Homogenisierung des Klones in Lämmli-Puffer und Auftrennung in der SDS-PAGE wurde sowohl ein Antikörper gegen BiP als auch der nc46 im Westernblot verwendet (siehe Abb. 4.17, nächste Seite).

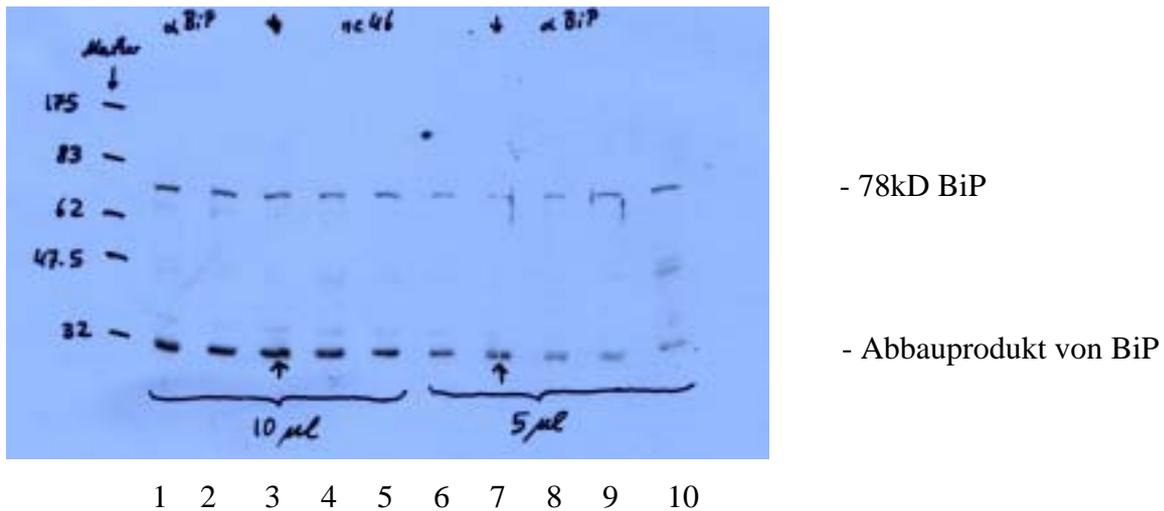


Abb. 4.17: Darstellung des BiP-Expressionsklons im Westernblot. In den Spuren 1-5 wurde ein Aliquot von 10µl, in den Spuren 6-10 ein Aliquot von 5µl Expressionsklon, ca. 10mg homogenisiert in 50µl 2x Lämmli-Puffer, aufgetragen. Spuren 1 und 2, 3 geteilt und Spuren 7 geteilt, 8-10: Färbung mit einem Antikörper gegen BiP, Verdünnung 1:1 000; Spuren 3 geteilt und 4-6: Färbung mit dem nc46, Verdünnung 1:100.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass der nc46 mit BiP kreuzreagiert. Eine Kontrollfärbung ohne ersten Antikörper zeigte keine der oben zu sehenden Banden (Daten nicht gezeigt). Somit geben die Experimente keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen Synapsin I und BiP.

4.2. Lokalisierung von HSAP in Vertebraten

Immunhistochemie mit HSAP- Antiseren

Nachdem feststand, dass der MAK nc46 nicht das humane Homolog von SAP47 erkennt, die Fragen der Lokalisation und Funktion der Vertebratenhomologe von SAP47 aber weiter unbeantwortet waren, war es Teil der Diplomarbeit von Natalja Funk (2000), Antiseren und einen monoklonalen Antikörper gegen das humane SAP zu gewinnen.

Nach Herstellung eines HSAP-Fusionsproteins wurden Balb/c-Mäuse immunisiert. Die Antiseren aller Mäuse erkannten das Fusionsprotein, sowie im Westernblot von Mausgehirnhomogenat eine Bande bei 60kD (Funk, 2000). Die von Natalja Funk zur Verfügung gestellten Antiseren wurden für Immunhistochemie an Maus- und Rattengehirnschnitten verwendet.

In der folgenden Abbildung 4.18 sind Übersichtsaufnahmen von Frontalschnitten durch Maus- und Rattengehirn zu sehen.

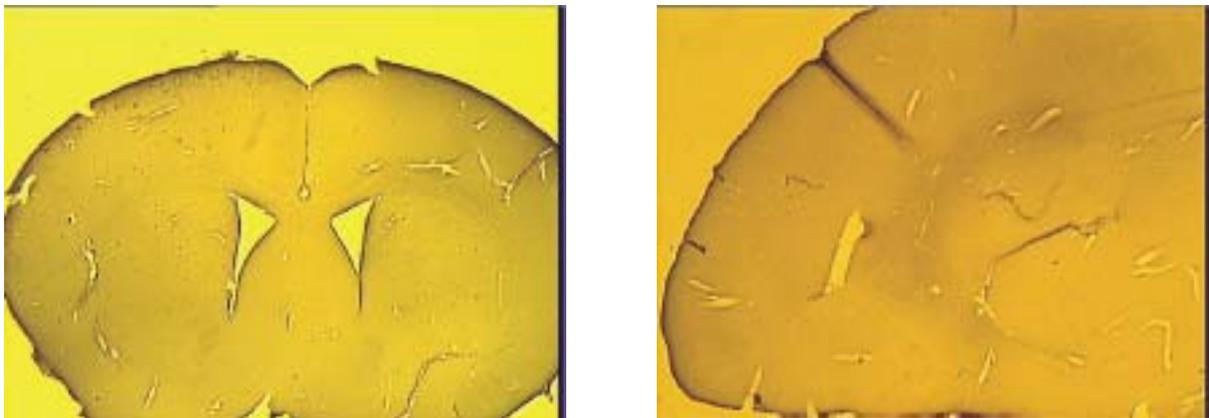


Abb. 4.18: Frontalschnitte durch Mausgehirn (links) und Rattengehirn (rechts). Das HSAP-Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:10 verwendet, Vergrößerung 2,5fach.

Im Mausgehirn erkennt man beide Hemisphären, im Rattengehirn aufgrund der Größe nur eine. Außerdem ist im Mausgehirn die Verbindung beider Hemisphären, das Corpus callosum (Balken) oberhalb der beiden Seitenventrikel gut zu erkennen. In der nächsten Abbildung 4.19 ist eine Vergrößerung der Region des Balkens oberhalb des linken Seitenventrikels dargestellt.

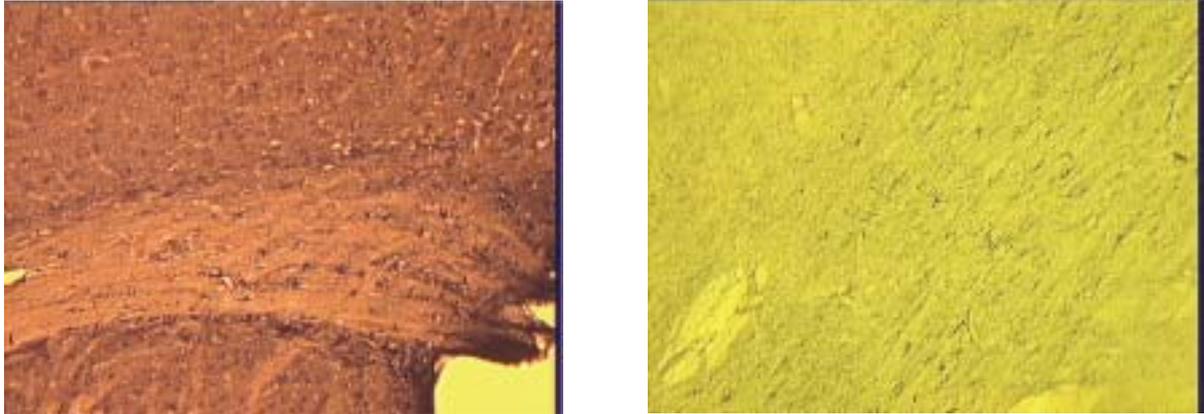


Abb. 4.19: Mausgehirn (links), Rattengehirn (rechts), HSAP-Antiserum 1:10, 10fache Vergrößerung.

Sowohl in Maus- als auch in Rattengehirn ist schon bei zehnfacher Vergrößerung eine Anfärbung in der Balkenregion nahe der Seitenventrikel zu erkennen. In der nächsten Abbildung 4.20 ist eine Region des Balkens noch einmal vergrößert dargestellt.

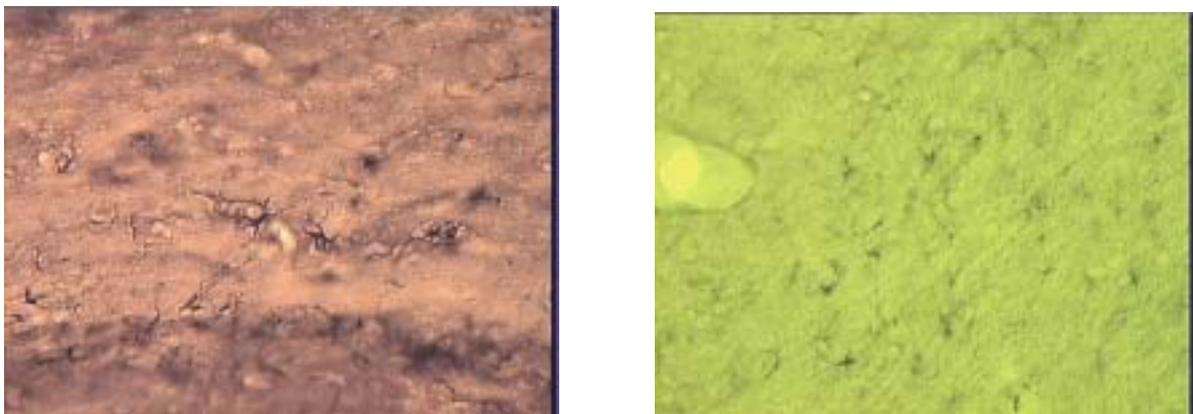


Abb. 4.20: 40fache Vergrößerung aus der Balkenregion von Mausgehirn (links) und Rattengehirn (rechts), HSAP-Antiserum 1:10. Zu erkennen sind Zellen mit langen Fußfortsätzen innerhalb des Balkens, deutlicher zu sehen in Mausgehirn.

Desweiteren waren Zellgruppen im Hippocampus wie auch bestimmte dopaminerge Neuronen angefärbt (Asan, pers. Mitteilung).

Um die Spezifität der Färbung zu überprüfen, wurden Präinkubationen mit dem Fusionsprotein sowie Kontrollen von Seren aus nicht immunisierten Tieren als auch Färbungen mit ausschließlicher Verwendung des 2. Antikörpers durchgeführt.

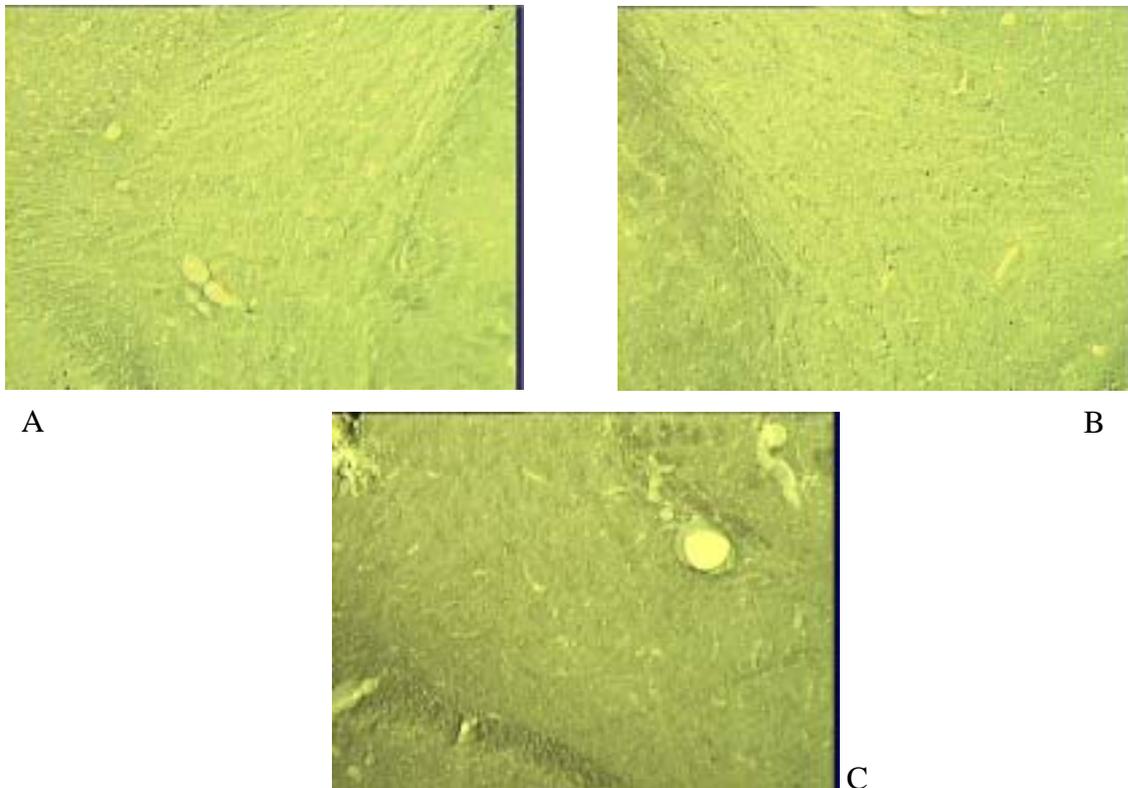


Abb. 4.21: Ausschnitte aus der Balkenregion von Mausgehirn, Vergrößerung 20 fach. A zeigt eine Inkubation mit einem Kontrollserum einer nicht immunisierten Maus; B zeigt eine Färbung mit dem HSAP-Antiserum nach Präabsorption mit dem Fusionsprotein (1 μ l Serum plus 20 μ l Fusionsprotein); C zeigt eine Färbung nach Inkubation nur mit dem 2. Antikörper.

Bei den Inkubationen mit dem Kontrollserum und dem 2. Antikörper (Abb. 4.21, A und C) ist überhaupt keine Färbung zu erkennen. In Abb. 4.21 B nach Präinkubation mit dem Fusionsprotein ist die Färbung deutlich abgeschwächt.

Diese Ergebnisse waren sowohl an Ratten- als auch an Mausgehirnen mit unterschiedlich fixierten Gewebe reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um eine spezifische Färbung handelt wurden die Färbungen im nächsten Schritt nochmals mit einem gegen HSAP gerichteten monoklonalen Antikörper durchgeführt.

Immunhistochemie mit dem monoklonalen Antikörper 363 gegen HSAP

Der monoklonale Antikörper 363 gegen HSAP wurde von Natalja Funk zur Verfügung gestellt. Er entstand nach Fusionierung von Milzzellen einer mit einem HSAP-His-Taq-Fusionsprotein immunisierten Maus mit ta3-Myelomazellen. Der im ELISA positiv getestete Überstand 363 zeigte auch im Westernblot ein Signal auf Höhe von 60kD. Für die Immunhistochemie stand genügend Antikörper zur Verfügung. Leider ging während der Subklonierung der diesen Überstand produzierende Klon verloren.

In der Abbildung Abb. 4.22 ist zu sehen, dass sowohl Maus- als auch Rattengehirn mit dem Antikörper inkubiert wurden. Vergrößert wurde wie auch auf den Bildern mit Verwendung des HSAP-Antiserums (Abb. 4.19-4.21) eine Region aus dem Balken.

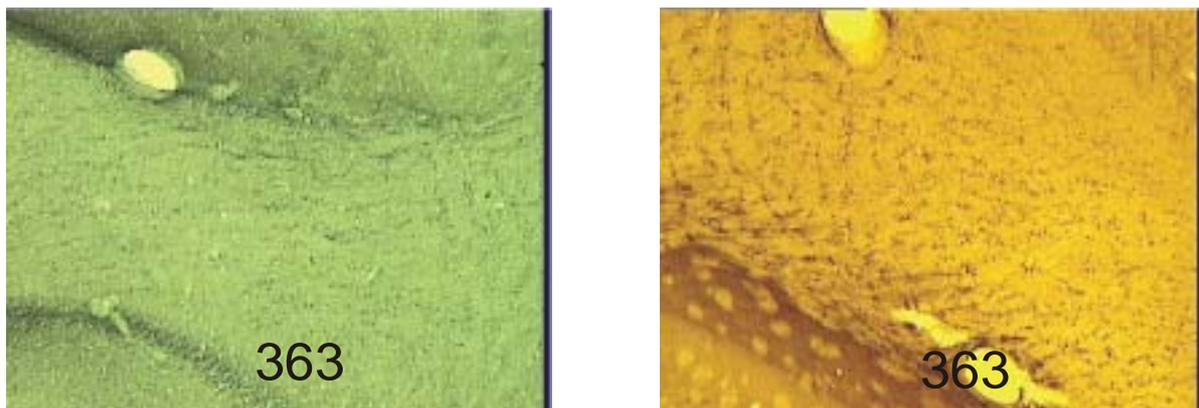


Abb. 4.22: Mausgehirn (links), Rattengehirn (rechts), inkubiert mit dem Antikörper 363 in einer Verdünnung von 1:2, Vergrößerung 20fach.

Vergleichbar zu den Färbungen mit dem Antiserum zeigt sich ein positives Signal in der Balkenregion. Während man bei den Färbungen mit dem Antiserum sehr gut Fußfortsätze der reagierenden Zellen erkennen konnte, ist in diesem Fall lediglich ein punktförmiges Muster zu betrachten. Bei den durchgeführten Kontrollen waren sowohl bei Inkubation mit dem 2. Antikörper als auch bei Inkubationen mit einem Kontrollserum keine Färbung zu erkennen. Bei vorhergehender Präinkubation mit dem Fusionsprotein war die Färbung deutlich abgeschwächt (Daten nicht gezeigt).

Doppelimmunfluoreszenz mit GFAP

Um die Frage beantworten zu können, ob es sich bei den angefärbten Zellen mit den deutlichen Fußfortsätzen tatsächlich um Astrozyten handelt, wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit dem Antiserum gegen HSAP, bzw. dem monoklonalen Antikörper 363 unter gleichzeitiger Inkubation mit dem Astrozytenmarker GFAP durchgeführt. Diese Versuche wurden unter der Anleitung von Esther Asan am anatomischen Institut der Universität Würzburg durchgeführt.

Bei ausreichender Vergrößerung konnte man erkennen, dass sowohl GFAP als auch das Antiserum die Fußfortsätze von Astrozyten detektieren, während der Antikörper 363 ausschließlich den Zellkörper anfärbt (Asan, pers. Mitteilung).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich sowohl mit einem Antiserum gegen das humane SAP als auch mit dem monoklonalen Antikörper 363 eine ähnliche Färbung in Vertebratengehirnen zeigt. Angefärbt wurden Astrozyten überwiegend in der Balkenregion und im Hippocampus wie auch vereinzelte dopaminerge Neuronen im Cortex. Dabei wurden Mäuse- und Rattengehirne unter unterschiedlichen Fixierungsbedingungen verwendet. Da das Antiserum und der Antikörper 363 aus ganz unterschiedlichen Prozeduren hervorgegangen sind, könnte dies für eine mögliche Spezifität sprechen.

4.3. Überexpression von SAP47 in *Drosophila*

Zur Analyse der Funktion des Sap47-Gens wird einerseits gegenwärtig versucht, eine Nullmutante zu erzeugen (s.u. und Funk, in Vorbereitung). Andererseits kann die Überexpression eines wichtigen Gens ebenso schädlich sein, wie seine Ausschaltung durch das Erzeugen einer Nullmutante, und so Funktionshinweise liefern. Aus dieser Überlegung heraus sollte mit Hilfe des Gal4-UAS-Systems SAP47 in Neuronen des *Drosophilagehirns* überexprimiert werden. Dafür wurde die komplette SAP47-cDNA in den Vektor pUAST inkloniert.

Die Konstruktion des Vektors erfolgte in den folgenden drei Schritten:

1. Linker-PCR zum Anhängen der Restriktionsschnittstellen, BglIII und NotI, an die SAP47-cDNA.
2. Verdau sowohl des Amplifikats als auch des pUAST-Vektors mit BglIII und NotI.
3. Ligation der geschnittenen SAP47-cDNA in den pUAST-Vektor und Amplifikation des entstandenen Plasmids in *E.coli*.

Der Vektor pUAST ist ein Transformationsvektor bestehend aus den zur Insertion ins Genom benötigten 5` und 3` Anteilen wildtypischer P-Elemente, dem modifizierten *white*- Genlocus aus *Drosophila* unter der Kontrolle eines hsp70-Promotors und einer dem Promotor vorgelagerten multiple cloning site, in die die SAP47-cDNA inkloniert wurde. Das *White*-Gen dient als Markergen zur Erkennung derjenigen Tiere, welche eine Insertion des Vektors in ihrem Genom tragen.

Zur Keimbahntransformation wurden 12µg des Transformationsvektors zusammen mit 4µg des Helferplasmids pUCHsIIΔ²⁻³, welches als Transposasequelle dient, mit Ethanol gefällt und in 20µl Injektionspuffer aufgenommen. Damit wurden anschließend ca. 1 000 Embryonen injiziert. Es gingen 11 unabhängige Transformanten hervor (5 aa, 6 ``). Für die weiteren Kreuzungen wurden vier Linien (1, 3.1, 9.2, 11.1) ausgewählt, bei allen hatte der Vektor auf dem dritten Chromosom inseriert. Das Kreuzungsschema zur genetischen Kartierung ist auf der folgenden Abbildung 4.23 dargestellt.

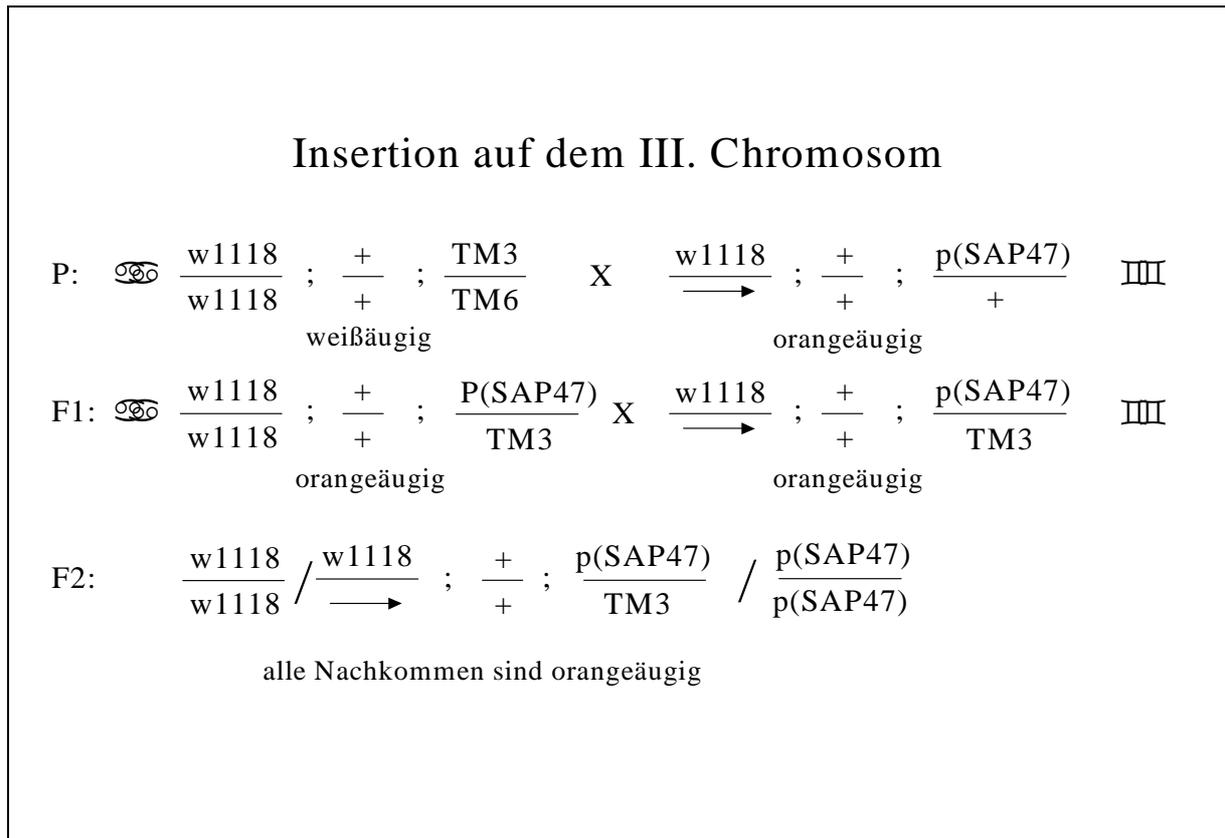


Abb. 4.23: Kreuzungsschema zur genetischen Kartierung des Insertionsortes bei Transformanten (Erläuterungen im Text).

Für die Kreuzung mit jeder einzelnen Transformante wurde ein *white*-Doppelbalancer-Stamm für das dritte Chromosom verwendet. Orangeäugige F1-Nachkommen mit dem gleichen Balancerchromosom wurden untereinander weitergekreuzt. Bei Insertion auf dem dritten Chromosom, wie bei den oben genannten ausgewählten Linien, hatten alle Nachkommen orangefarbene Augen. Bei Insertionen auf dem zweiten Chromosom treten in der F2-Generation auch weißäugige Individuen auf. Bei Insertionen auf dem X-Chromosom treten bei Rückkreuzungen von männlichen Transformanten mit w^{1118} -Tieren keine weißäugigen Weibchen auf. Eine Insertion auf dem Y-Chromosom ist aufgrund der geringen Größe unwahrscheinlich und trat in den beschriebenen Linien nicht auf.

Zum Austesten des Konstruktes wurden alle ausgewählten Linien mit einer Linie verkreuzt, welche Gal4 über einen Rhodopsin-Promotor exprimiert. Damit sollte eine ektope Expression von SAP47 im Auge gezeigt werden können. In der folgenden Abbildung 4.24 ist das Kreuzungsschema für dieses Experiment zu sehen.

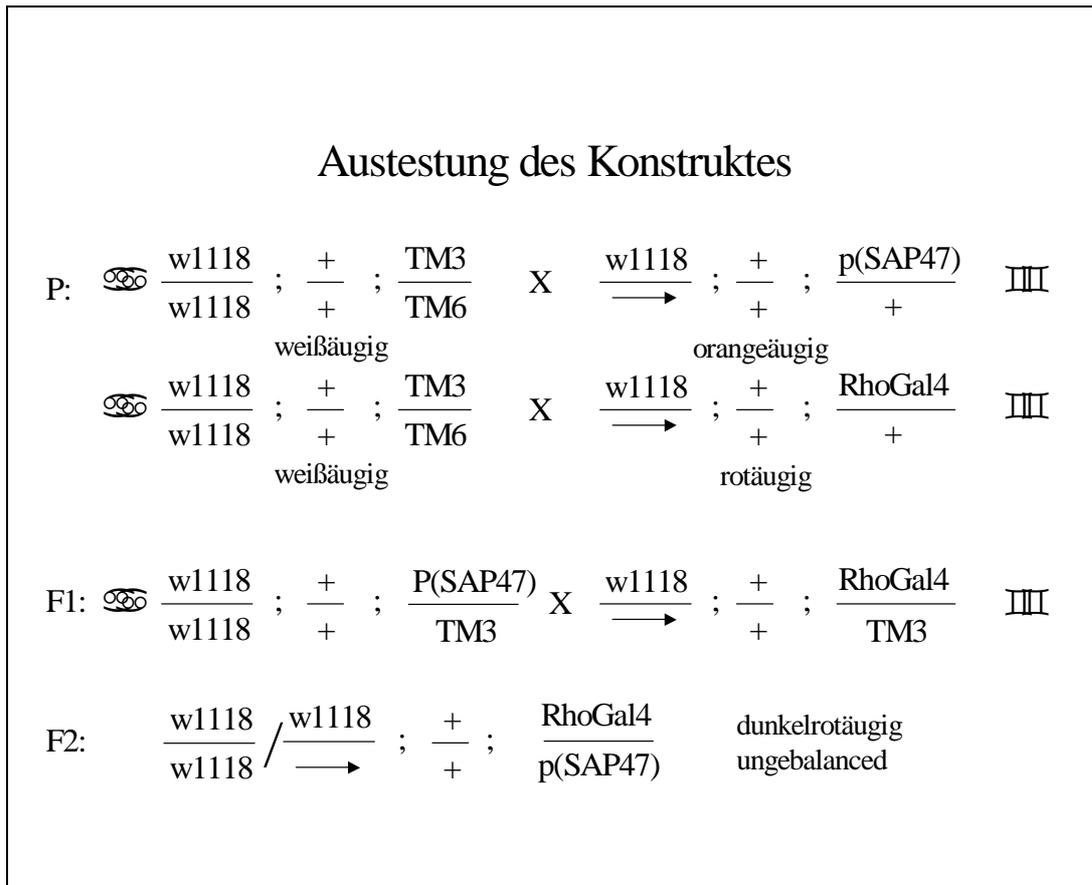


Abb. 4.24: Kreuzungsschema für die ektope Expression von SAP47 im Auge.

Die Nachkommen der letzten Kreuzung wurden für Gehirnschnitte herangezogen und mit dem nc46 angefärbt. Untenstehend ist das Ergebnis zu erkennen.



Abb. 4.25: Beispielhaft ektope Expression von SAP47 unter dem Rhodopsin-Promoter.

Durch die ektope Expression und Synthese von SAP47 im Auge ist im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 4.26) auch eine Färbung im Bereich der Augen aufgetreten.



Abb. 4.26: Kontrollschnitt, angefärbt mit nc46, Verdünnung 1:100. SAP47 kommt unter Kontrollbedingungen in der Retina nicht vor.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SAP47 über den Rhodopsin-Promoter ektope exprimiert werden kann, sollte im nächsten Schritt eine gehirnspezifische Überexpression von Sap47 erzielt werden. Hierfür wurde der neuronenspezifische elav-Promoter verwendet. Eine in der Arbeitsgruppe vorhandene Linie, elav-Gal4, wurde für die Kreuzung verwendet. Elav-Gal4 befindet sich in diesem Fall auf dem zweiten Chromosom, während das P-Element (UAS-SAP47-cDNA) in den verwendeten Linien auf dem dritten Chromosom inseriert. Auf der nächsten Seite (Abb. 4.27) ist das Kreuzungsschema für die neuronenspezifische Überexpression von SAP47 zu sehen.

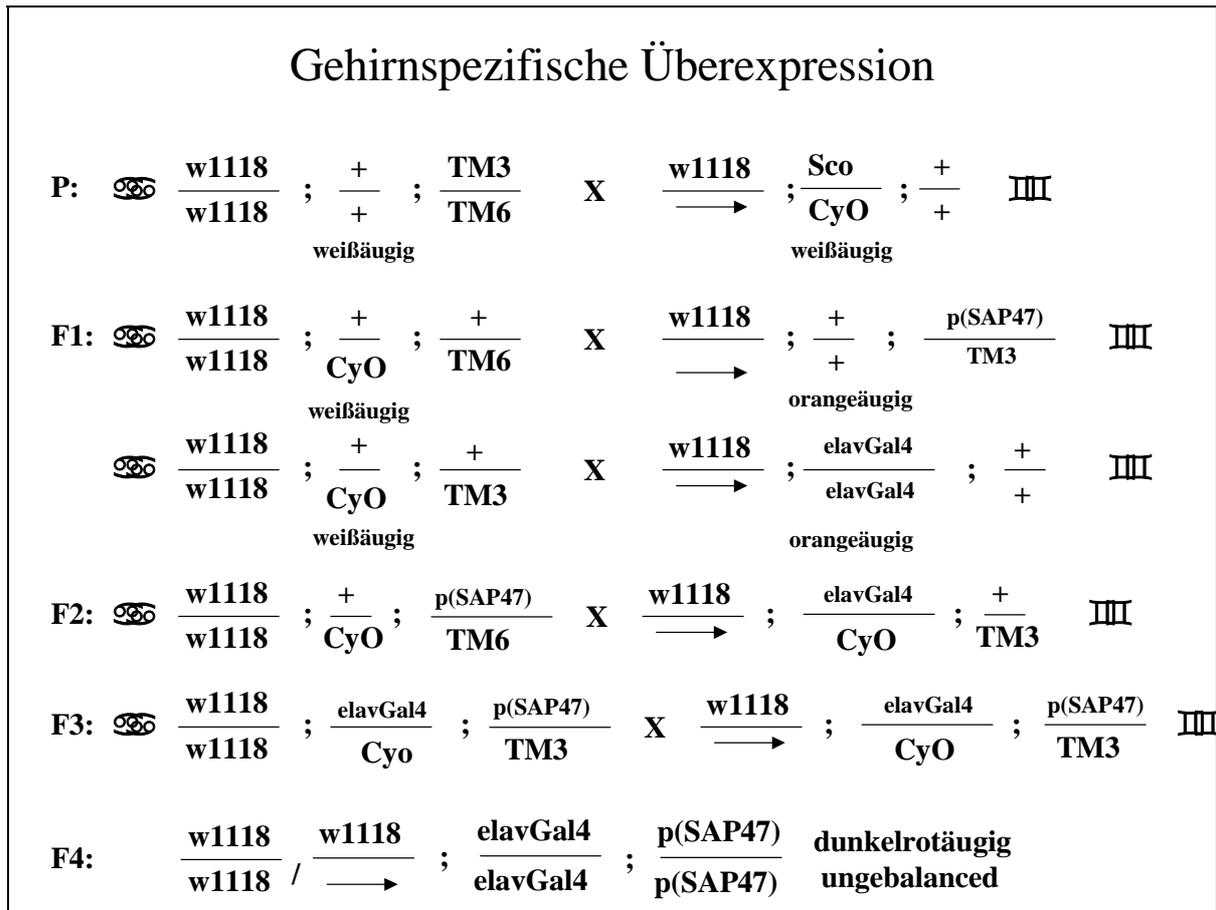


Abb. 4.27: Kreuzungsschema für die gehirnspezifische Überexpression von SAP47.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich eine Überexpression von SAP47 in den Neuronen stattfindet, wurden sowohl Westernblots als auch Gehirnschnitte angefertigt.

In der nachfolgenden Abbildung 4.28 sind die verwendeten Überexpressionslinien 1, 3.1, 9.2 und 11.1 im Westernblot dargestellt. Zum Vergleich mit dem Wildtyp w1118 wurden jeweils ein viertel und ein halber Kopf nebeneinander aufgetragen.

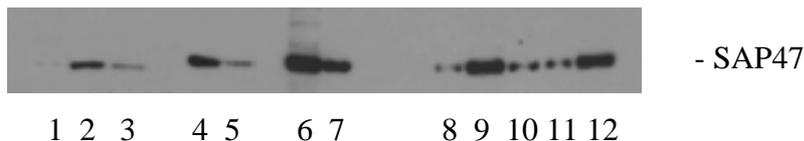


Abb. 4.28: Westernblot der Überexpressionslinien, angefärbt mit dem nc46 1:100, Spuren: 1: ¼, 2: 1, 3: ½ Wildtypkopf w1118; 4: ½, 5: ¼ Kopf der Linie 1, 6: ½, 7: ¼ Kopf der Linie 3.1; 8: ¼, 9: ½, 10: ¼ Kopf der Linie 9.2; 11: ¼, 12: ½ Kopf der Linie 11.1.

Für die Darstellung der Überexpression auf *Drosophilagehirnschnitten* wurden die vier ausgewählten Überexpressionslinien jeweils mit dem Wildtyp w1118 auf demselben Objektträger angefärbt und verglichen. Dabei wurde das ABC-Elite-Normalkit verwendet und das Substrat DAB jeweils nur für 15 Sekunden auf den Schnitten belassen. Bei längerer Inkubation ist wegen der Sättigung der Farbreaktion kein Unterschied zwischen Kontrolle und Überexpression zu sehen (nicht gezeigt).

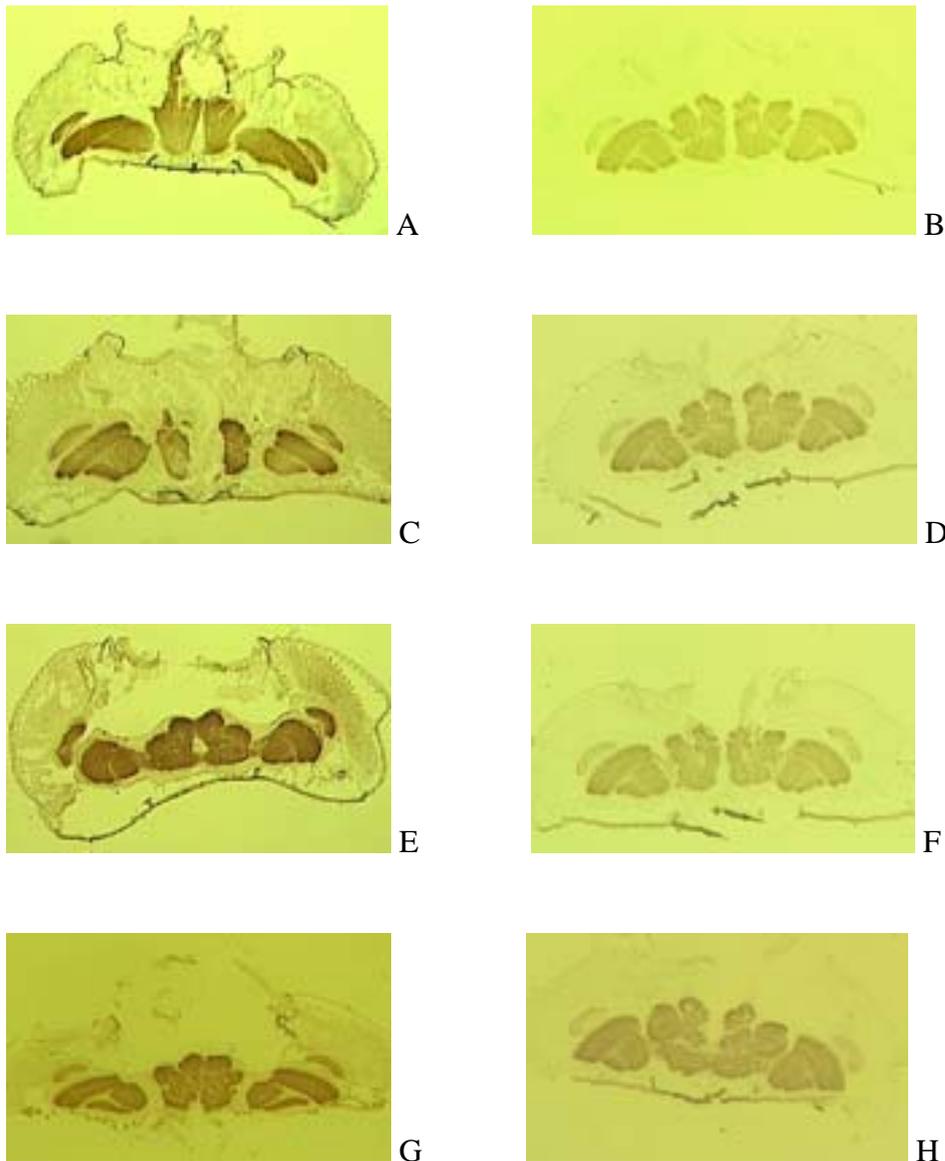


Abb. 4.29: Gehirnspezifische Überexpression von SAP47. Die verwendeten Überexpressionslinien 1 (A), 3.1 (C), 9.2 (E) und 11.1 (G) sind jeweils im Vergleich zu Kontrollschnitten von w1118-Fliegen (B, D, F, H) dargestellt.

Sowohl im Westernblot als auch auf den Gehirnschnitten ist die Überexpression von SAP47 gut zu erkennen.

Nachdem sich die Überexpressionsfliegen normal entwickeln und auf den ersten Augenschein keinen veränderten Phänotyp besitzen wurden sie für elektrophysiologische Untersuchungen an Christian Leibold (in der Arbeitsgruppe) weitergegeben.

4.4. Rescue von black-pearl in Doppelmutanten

Die von Sonja Becker (1997) durchgeführten Mutagenesen, (-Strahlenmutagenese, P-Element-Jump-out-Mutagenese und EMS-Mutagenese, mit dem Ziel, das Sap47-Gen auszuschalten, führten lediglich zu einer Doppelmutante der beiden Gene Sap47 und blp (black-pearl). Black-pearl wurde von Sonja Becker im Rahmen ihrer Diplomarbeit entdeckt. Eine isolierte Mutation für Sap47 konnte nicht erzielt werden. Dieser Befund lässt sich bei Betrachtung des genomischen Locus erklären. Das Gen für black-pearl befindet sich 200 bp vor dem Gen für SAP47. Da alle isolierten Mutationen im blp-Gen am Ende des ersten Larvenstadiums homozygot letal sind, handelt es sich bei black-pearl höchstwahrscheinlich um ein in der Entwicklung eine große Rolle spielendes Genprodukt. Ein Vergleich von Morphologie und Verhalten der blp-Mutanten mit den Doppelmutanten blp;Sap47 im ersten Larvenstadium ergab keine Hinweise auf einen Sap47-abhängigen Phänotyp und damit auf die Funktion des SAP47 Proteins (Becker, unveröffentlicht). Um adulte Sap47-Mutanten zu erhalten, wurde als weitere Strategie das Retten des blp-Gens in den Doppelmutanten ins Auge gefasst.

Für diesen Versuchsansatz wurde die blp-cDNA (Becker et al., 2001) in den folgenden Schritten in einen pUAST-Vektor inkloniert.

1. Linker-PCR zum Anhängen der Restriktionsschnittstellen, BglIII und NotI, an die BLP-cDNA.
2. Verdau sowohl des Amplifikats als auch des pUAST-Vektors mit BglIII und NotI.
3. Ligation der geschnittenen BLP-cDNA in den pUAST-Vektor und Amplifikation des entstandenen Plasmids in E.coli.

Wie bereits bei der Überexpression von SAP47 beschrieben, wurde das Konstrukt anschließend in Fliegenembryonen injiziert. Es entstanden drei unabhängige Transformanten, von denen bei mehreren Nachkommen die Insertion im Genom überprüft wurde (Kreuzungsschema siehe Abb. 4.23). Für das weitere Vorgehen wurden diejenigen Linien ausgewählt, die eine Insertion auf dem zweiten Chromosom tragen. Durch das Kreuzen dieser Linien mit Fliegen, die Gal4 unter der Kontrolle des Aktinpromoters exprimieren, sollte das Black-pearl Protein in allen Zellen von Entwicklungbeginn an zur Verfügung stehen. Ob die ubiquitäre Expression von BLP den letalen Phänotyp der blp-Nullmutanten „retten“ kann, so dass der Sap47-Phänotyp in den blp;Sap47 Doppelmutanten sichtbar wird, muss durch

Einkreuzen der Konstrukte in die Mutanten ermittelt werden. Im folgenden Kreuzungsschema wird das Vorgehen deutlich.

P:		$\frac{w1118}{w1118}$;	$\frac{+}{+}$;	$\frac{TM3}{TM6}$	X	$\frac{w1118}{\longrightarrow}$;	$\frac{Sco}{CyO}$;	$\frac{+}{+}$			
						weißäugig							weißäugig		
F1:		$\frac{w1118}{w1118}$;	$\frac{+}{CyO}$;	$\frac{+}{TM6}$	X	$\frac{w1118}{\longrightarrow}$;	$\frac{+}{+}$;	$\frac{\Delta sap/ b lp}{TM3}$			
													weißäugig		
		$\frac{w1118}{w1118}$;	$\frac{+}{Sco}$;	$\frac{+}{TM3}$	X	$\frac{w1118}{\longrightarrow}$;	$\frac{actGal4}{actGal4}$	/	$\frac{p(Blp)}{p(Blp)}$;	$\frac{+}{+}$	
						weißäugig								orangeäugig	
F2:		$\frac{w1118}{w1118}$;	$\frac{+}{CyO}$;	$\frac{\Delta sap/ b lp}{TM6}$	X	$\frac{w1118}{\longrightarrow}$;	$\frac{actGal4}{Sco}$;	$\frac{+}{TM3}$			
		$\frac{w1118}{w1118}$;	$\frac{+}{CyO}$;	$\frac{\Delta sap/ b lp}{TM6}$	X	$\frac{w1118}{\longrightarrow}$;	$\frac{p(Blp)}{Sco}$;	$\frac{+}{TM3}$			
						weißäugig							orangeäugig		
F3:		$\frac{w1118}{w1118}$;	$\frac{p(Blp)}{CyO}$;	$\frac{\Delta sap/ b lp}{TM3}$	X	$\frac{w1118}{\longrightarrow}$;	$\frac{actGal4}{Cyo}$;	$\frac{\Delta sap/ b lp}{TM3}$			
						orangeäugig							orangeäugig		
F4:		$\frac{w1118}{w1118}$	/	$\frac{w1118}{\longrightarrow}$;	$\frac{p(Blp)}{actGal4}$;	$\frac{\Delta sap/ b lp}{\Delta sap/ b lp}$					dunkelrotäugig ungebalanct		

Abb. 4.30: Kreuzungsschema für das Retten von Black-pearl durch Kreuzung mit einer Aktin-Gal4-Linie.

Alle Nachkommen der letzten Kreuzung waren zwar dunkelrotäugig, blieben aber über TM3 gebalancet. Das gleiche Kreuzungsschema wurde auch mit der Linie Hitzeschock-Gal4 durchgeführt. Auch hier gingen keine ungebalanceten Fliegen in der letzten Kreuzung hervor.

Als Kontrolle wurden statt der *blp; Sap47* Doppelmutanten *blp*-Mutanten über TM3 eingekreuzt. Auch bei diesem Versuchsansatz gingen in F4 keine ungebalanceten Fliegen hervor.

4.5. Immunpräzipitation von SAP47

Nachdem weder eine Nullmutante für SAP47 zur Verfügung steht noch die Überexpression von SAP47 Aufschluss über die Funktion des Proteines gab, wurde mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation versucht, Interaktionspartner für SAP47 aufzureinigen. Diese, falls bekannt, könnten Hinweise auf den Wirkungsbereich und eventuell die Funktion von SAP47 geben.

Im ersten Schritt wurde gezeigt, dass der MAK nc46 an Protein G bindet. Dies ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Co-Immunpräzipitation. Dafür wurde der MAK nc46 über Nacht bei 4°C und einem pH von 6.8 mit Protein G inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper mit Natriumcitrat pH 2 von der Säule eluiert. In der untenstehenden Abbildung 4.31 wurde die Bindung an Protein G sowohl für den MAK nc46 als auch für den MAK nc82 gezeigt.

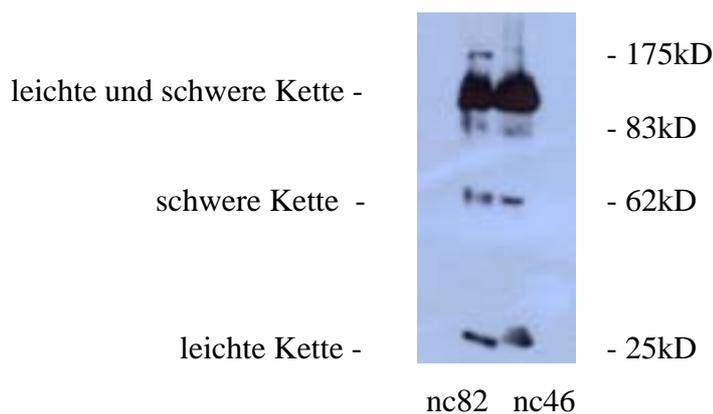


Abb. 4.31: Vorversuch für die Co-Immunpräzipitation. Der MAK nc46 und der MAK nc82 binden an Protein G. Westernblot, Detektion nur mit dem 2. Antikörper (anti-Maus-Ig). Es wurden 5ml Antikörperüberstand mit 1mg Protein G inkubiert. Von der Elutionsfraktion (s. Abschnitt 3.2.6.2.) wurden jeweils 10µl plus 5µl 2x Lämmli-Puffer aufgetragen.

Im nächsten Schritt wurde eine Immunpräzipitation mit dem nc46 durchgeführt. Dafür wurden wie unter Abschnitt 3.2.4. beschrieben die Köpfe von 10g, das entspricht ca. 10 000 Fliegen, in Homogenisierungspuffer aufgenommen und homogenisiert. Der Überstand 2, welcher den löslichen Proteinen entspricht und SAP47 enthält, wurde für die Präzipitation (s. Abschnitt 3.2.6.2.) verwendet. Von den Elutionsfraktionen wurden Aliquots entnommen, auf

Polyacrylamidgele aufgetragen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung bzw. Westernblot analysiert.

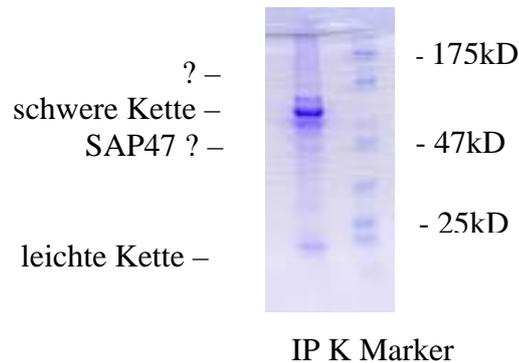


Abb. 4.32: Coomassie-Färbung nach Immunpräzipitation über den nc46. IP entspricht einem Aliquot von 10 μ l der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation plus 5 μ l 2x Lämmli-Puffer (s. Abschnitt 3.2.6.2.), in der Kontrollspur K wurde 1 mg Protein G ohne Zusatz des nc46 Antikörpers mit 5ml Gewebehomogenat inkubiert, von der Säule eluiert und ebenfalls 10 μ l Eluat plus 5 μ l 2x Lämmli-Puffer aufgetragen.

In der Coomassie-Färbung sind die leichte und die schwere Kette des Antikörpers deutlich zu erkennen. Welche anderen Proteine mitaufgereinigt wurden kann aufgrund der Coomassie-Färbung nicht gesagt werden. In der Kontrollspur K sind keine Proteine zu sehen, das heißt, keine der in der Elutionsfraktion von IP zu erkennenden Proteine binden unspezifisch an die Protein-G-Sepharose Säule. Bei der Bande auf Höhe von 47kD könnte es sich um SAP47 handeln. Dies wurde dann im Westernblot bestätigt.

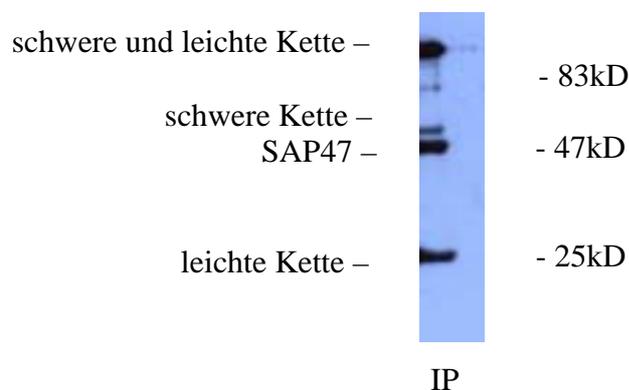


Abb. 4.33: Immunpräzipitation über den nc46 (s. Abb. 4.32) im Westernblot dargestellt. Die Spur IP entspricht einem Aliquot von 10 μ l der Elutionsfraktion plus 5 μ l 2x Lämmli-Puffer. Antikörperverdünnung des nc46 1:100.

Hiermit war klar, dass SAP47 über den MAK nc46 angereichert werden konnte.

Um zu überprüfen, ob möglicherweise andere Synapsenproteine mit aufgereinigt wurden, wurden sämtliche in der Arbeitsgruppe verfügbare Antikörper im Westernblot ausgetestet. Die Antikörper gegen Synapsin, CSP, Syntaxin und Synaptotagmin waren negativ (nicht gezeigt). Der MAK nc82 ist ein weiterer Antikörper aus der Bibliothek von Alois Hofbauer (1991). Dieser Antikörper, welcher gegen ein unbekanntes Protein an der aktiven Zone der Synapse gerichtet ist, aber ergab folgendes Bild.

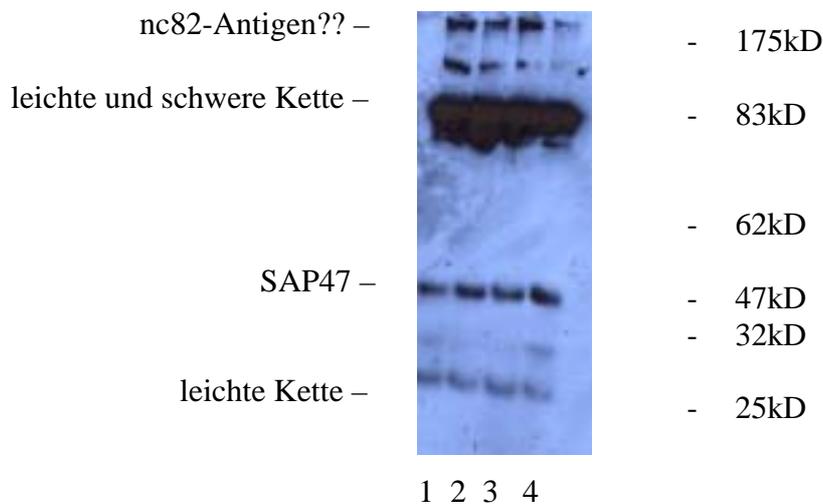


Abb 4.34: Immunpräzipitation mit dem nc46 (wie bereits auf Seite 48 beschrieben). Analyse im Westernblot mit den Antikörpern nc46 und nc82 in der Verdünnung 1:100. In den Spuren 1-4 wurde jeweils das gleiche Aliquot von 10µl der Elutionsfraktion plus 5µl 2x Lämmli-Puffer nach Immunpräzipitation aufgetragen.

Wie von Heike Dürrbeck (2002) im Rahmen ihrer Diplomarbeit gezeigt werden konnte, befindet sich das nc82-Antigen im Westernblot als Doppelbande bei ca. 180 bis 190kD.

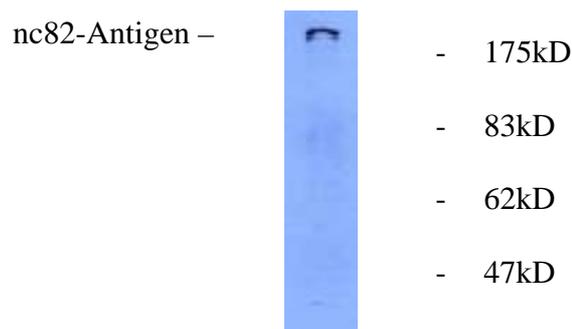


Abb. 4.35: Westernblot eines Wildtypkopfes w1118. Verdünnung des MAK nc82 1:100.

In einem neuen Ansatz wurde das Ergebnis der Immunpräzipitation noch einmal überprüft. Diesmal wurde die Elutionsfraktion zusätzlich über eine Millipore-Membran (>60kD) konzentriert, da die Doppelbande bei ca. 190kD zunächst nur ganz schwach zu erkennen war. Als Nebeneffekt ist demnach auch die starke Anreicherung der schweren Kette des Antikörpers bei ca. 60kD zu sehen.

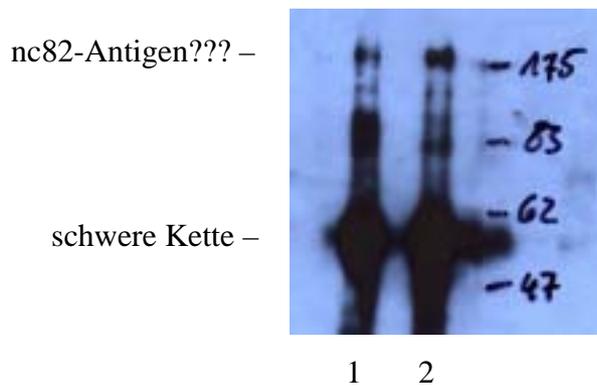


Abb. 4.36: Immunpräzipitation über den nc46 (wie auf Seite 48 beschrieben). Westernblotanalyse mit dem MAK nc82, Verdünnung 1:100. In den Spuren 1 und 2 sind jeweils 10µl der Elutionsfraktion plus 5µl 2x Lämmli-Puffer aufgetragen. Über den Konzentrierungsschritt wurde vor allem auch die schwere Kette des Antikörpers stark angereichert.

Im Vergleich zu der Abbildung 4.34 wurde die Westernblotanalyse nur mit dem nc82 durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Doppelbande oberhalb von 175kD nur auf den nc82 zurückzuführen ist.

Wenn es sich bei dem nc82-Antigen tatsächlich um einen Interaktionspartner von SAP47 handeln sollte, dann müsste umgekehrt auch SAP47 bei einer Immunpräzipitation über den MAK nc82 aufgereinigt werden können.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit Protein A Agarose Beads durchgeführt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide Antikörper auch an Protein A binden (Abb. 4.37), wurde Protein A dem Protein G vorgezogen. Für die Immunpräzipitation mit Protein A wird aufgrund der höheren Kapazität der Beads wesentlich weniger Gewebehomogenat benötigt. Auch in der Handhabung haben die Beads einige Vorteile gegenüber der Säule. Es sollte auch interessant sein zu sehen, ob sich oben beschriebene Ergebnisse mit Protein A reproduzieren lassen.

In der nächsten Abbildung 4.37 wird gezeigt, dass das nc82-Antigen sich, wenn auch nur gering, über den an Protein A Beads gekoppelten MAK nc82 aufreinigen lässt.

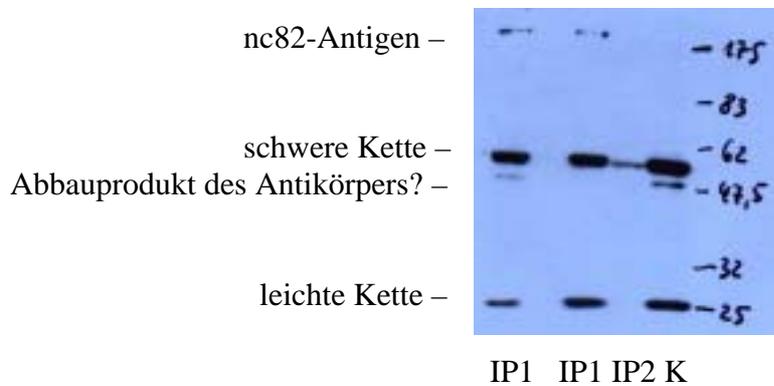


Abb. 4.37: Immunpräzipitation IP1 des nc82-Antigens über den MAK nc82. 10g Fliegenköpfe wurden wie in Abschnitt 3.2.4. beschrieben, homogenisiert und zentrifugiert. Das Pellet 2 wurde mit 1% Triton X 100 in 250µl Homogenisierungspuffer behandelt und für 1h bei 100 000g erneut zentrifugiert. Für die IP wurden 250µl Überstand 3 und 250µl nc82-Antikörperüberstand mit 30µl Protein A inkubiert. Nach drei Waschsritten wurde nach Abzentrifugieren der Beads der Überstand entfernt. Die Beads samt der gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in 50µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. IP1 entspricht jeweils 15µl des Eluats. In der Kontrollspur K wurde nur 250µl des Antikörpersüberstands mit 30µl Protein A inkubiert. Auch hier wurden anschließend 15µl des Eluats aufgetragen. IP2 entspricht einer Immunpräzipitation über den MAK nc46 (s.o. anstatt von nc82-Antikörperüberstand wurden 250µl nc46-Antikörperüberstand verwendet). Aufgetragen wurden ebenfalls 15µl des Eluats. Verdünnung des MAK nc82 1:100.

In der folgenden Abbildung 4.38 wurde dieselbe Membran der oben gezeigten Immunpräzipitationen einer anschließenden Westernblotanalyse mit dem MAK nc46 unterzogen. Störend ist das mögliche Abbauprodukt des MAK nc82 auf Höhe von ca. 47KD. Würde SAP47 mit dem nc82-Antigen interagieren, müsste es genau auf dieser Höhe ebenfalls detektierbar sein.

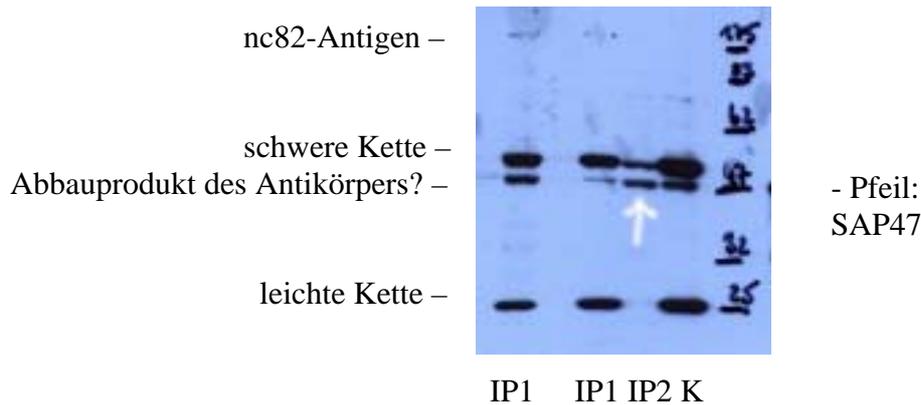


Abb. 4.38: Immunpräzipitation IP1 des nc82-Antigens über den MAK nc82 (s. Abb. 4.37). IP1 entspricht jeweils 15µl des Eluats. In der Kontrollspur K wurde lediglich der Antikörper an Protein A gebunden. IP2 entspricht einer Immunpräzipitation über den MAK nc46. Aufgetragen wurden ebenfalls 15µl des Eluats. Verdünnung des MAK nc82 und des MAK nc46 jeweils 1:100.

Aus den letzten beiden Abbildungen lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Das nc82-Antigen lässt sich über den MAK nc82 aufreinigen, nicht aber über den MAK nc46. Dies spricht ebenso wie die Tatsache, dass sich SAP47 zwar mit Protein A über den MAK nc46 aufreinigen lässt, nicht aber das nc82-Antigen, gegen eine Interaktion der beiden Proteine SAP47 und nc82-Antigen.

Eine weitere Frage, nämlich die der Identität des nc82-Antigens, konnte ebenfalls nicht geklärt werden, da die Menge des aufgereinigten nc82-Antigens für eine massenspektrometrische Analyse nicht ausreichte.

4.6. Neue Domäne

Mit Hilfe von BLAST wurden alle zur Verfügung stehenden öffentlichen Datenbanken nach Homologen für SAP47 durchsucht. Das Programm CLUSTALW erstellte anschließend für alle gefundenen Homologe ein multiples Alignment.

```

C.ELEGANS.PEP ~~~~~ MSWLLA DMKKKMNDK
XENOPUS.PEP ~~~~~ RL LWENCNPAMF RGLGSWLGLD
ZEBRAFISH.PEP ~~~~~
BOS.PEP ~~~~~
HSAP.PEP ~~~~~ FSSDFRT SPWESRRVES KATSARCGLW GSGPRRRPAS
MSAP.PEP ~~~~~
SAP47.PEP MFSGLTNQFT SLVGA VKGGA GDEDVPAPTG DAPAAAPAAS TSVEATASSA

51 100
C.ELEGANS.PEP ATIEQSLKQA SDNTVVEESE KE.....
XENOPUS.PEP PQLETQKAAE QE.TEKEEEE TS.....
ZEBRAFISH.PEP ~~~~~H XE.NEEEEKK KS.....
BOS.PEP ~~~~~
HSAP.PEP GMFRGLSSWL GL.QQPVAGG GQ.....
MSAP.PEP ~~~~~
SAP47.PEP VDPEAAAAAG GEGLEGE EAG KSGWLGSAKG WLGNASIPSM PAMPSPMPSP

101 150
C.ELEGANS.PEP ..... DEKKETIEKA EIES..... NVEK
XENOPUS.PEP ..... NAEQGDREKL ESPG..... KDAQS
ZEBRAFISH.PEP ..... DSAETEEEEK KS..... INTPS
BOS.PEP ~~~~~
HSAP.PEP ..... PNGDAPPEQP SETV..... AESAE
MSAP.PEP ~~~~~ F RPVE..... PTEEQ
SAP47.PEP AMPAMP SIPS IPGLRKGAGA DGAEGAEGAV AGE GAAASG AVSGGEDDDK

151 200
C.ELEGANS.PEP PVGESVPQET ATETAKKSMA ALFG..GLKT GSGVASTKLF EYAKDAGKKL
XENOPUS.PEP QQEANPEEEA LIKQAKGFGS YLLN..FASV ASKKISESVV ETAQTIKKS
ZEBRAFISH.PEP S.E..DP... QAGGLIG FILN..LASN ATKKISESVA ETAQSIIKTV
BOS.PEP ~~~~~
HSAP.PEP EELQQAGDQE LLHQAKDFGN YLFN..FASA ATKKITESIA ETAQTIKKS
MSAP.PEP QQQPPTEDPQ FLHQAKGLGN YLYN..FASA ATKKITESVT ETAQTIKKS
SAP47.PEP SRYISATEGA DSHPASGGT PTGDEGQIGQ VTTKVTQQA HFGSFLSSAI

201 250
C.ELEGANS.PEP GEV...KNA. VIENTMLGDL NKEQDEFEKQ LQEERDKLRN IDLPWQGLPD
XENOPUS.PEP EEG...KIDG IIDKTIIGDF QKEQKQFVQE KSFK..KSEA AVAPWVG YNE
ZEBRAFISH.PEP EES...NIDG IIDKTILGDF QKEQKQFVLE KNAK..KTDV AVPPWVG YNE
BOS.PEP ~~~~~ IDKTFIGDF HKEQKQFVEE QNTK..KSEV AVPPWVDSND
HSAP.PEP EEG...KIDG IIDKTIIGDF QKEQKQFVEE QHTK..KSEA AVPPWVDTND
MSAP.PEP EEG...KIDD ILDKTILGDF QKEQKQFVEE QNTK..KSEA AVPPWVESHD
SAP47.PEP SKAGSKIKET VKDNTILDSF NKEQEAFIKG QGG...VGN GAAPWIGHAN

251 300
C.ELEGANS.PEP EELAKKQMS LSTNTRNFLR DSAANSEYTY E..QQAMAT LLLKHDPNLA
XENOPUS.PEP EETIQQQILA LSADRNFLR DPP.....
ZEBRAFISH.PEP EETIQQQILA LSADKRNFLR DP.....
BOS.PEP EETIQQQILA LSADKRNFLR DPPAGVQFNF DFDQMPVAL VMLQEDEL S
HSAP.PEP EETIQQQILA LSADKRNFLR DPPAGVQFNF DFDQMPVAL VMLQEDEL S
MSAP.PEP EETIQQQILA LSADKRNFLR DPPAGVQFNF DFDQMPVAL VMLQEDEL S
SAP47.PEP EAKIKEEILG LSQDRNFVR APPAGVDFEF SYDTAYPTAI AIMAEDKALE

```

	301				350
C. ELEGANS . PEP	NVRFQLVPKQ	VKENQFWQNY	FYRIGLIRQS	MLAQGTGRIT	PTPNPIVEEK
XENOPUS . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ZEBRAFISH . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BOS . PEP	RMRFDLVPKL	VKEDVFWRNY	FYRVSLIKQS	AQLTALAAQ .	..QQAAGKEE
HSAP . PEP	KMRFALVPKL	VKEEVFWRNY	FYRVSLIKQS	AQLTALAAQ .	..QQAAGKEE
MSAP . PEP	KMRFALVPKL	VKEEVFWRNY	FYRISLIKQS	AQLTALAAQ .	..QQASGKEE
SAP47 . PEP	TMRFELVPKI	ITEENFWRNY	FYRVSLIIQA	AELGTLGADG	VGQASSGEDE
	351				400
C. ELEGANS . PEP	KVEESDVSAE	VAPQSSSEIK	EKKENEPEV	KETVSEESCE	DEDEEEELK
XENOPUS . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ZEBRAFISH . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BOS . PEP	KNHGRQNELP	LTEAVR PKT	PPVVIKSQLK	TQEDEEEIST
HSAP . PEP	KSNGREQDLP	LAEAVR PKT	PPVVIKSQLK	TQEDEEEIST
MSAP . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	401				450
C. ELEGANS . PEP	ETVSEQPAAP	GELTLTSVDE	EWEREILNDL	NDYDDVVEKT	GGKDDDAWEA
XENOPUS . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ZEBRAFISH . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BOS . PEP	SPCVSEFVSD	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
HSAP . PEP	SPGVSEFVSD	AFDACNLNQE	DLRKEMQLV	LDKKQEETAV	LEEDSADWEK
MSAP . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
SAP47 . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	451				484
C. ELEGANS . PEP	EIQDLLNAE~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
XENOPUS . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ZEBRAFISH . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BOS . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
HSAP . PEP	ELQQELQEYE	VVTESEKRDE	NWDKEIEKML	QEEN	~~~~~
MSAP . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
SAP47 . PEP	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

Abb. 4.39: Multiples Alignment der SAP47-Homologen aus *C.elegans* (O17591), *Xenopus laevis* (BJ070815), *Zebrafisch* (BM185617), *Bos taurus* (AW478425), *Homo sapiens* (AAH14657), *Mus musculus* (BAB29608) und SAP47 (Q24502). Dunkelblau: komplette Übereinstimmung; hellblau: auffälliger Bereich; rot: große Übereinstimmung; orange: ähnliche Aminosäuren; schwarz: sonstige Aminosäuren.

Zum Erstellen eines Hidden Markov Modells (HMM) wurde lediglich der hochkonservierte Bereich von 181-350 verwendet. Als Eingabe für das Programm HMMbuild wurde das multiple Alignment dieses Bereiches ausgewählt. Anschließend wurde das HMM mit Hilfe von HMMcalibrate kalibriert. Dann erst konnten die gewünschten Datenbanken mit dem erstellten HMM durchsucht werden (HMMsearch).

Das Ergebnis dieser Suche durch die nicht redundanten Proteindatenbanken ergab folgendes:

Scores for complete sequences (score includes all domains):					
Sequence	Description	Score	E-value	N	
-----	-----	-----	-----	-----	
Q9D5V6	Q9d5v6 2010110017RIK PROTEIN. 6/2001	436.5	0	<u>1</u>	
Q9D870	Q9d870 2010110017RIK PROTEIN. 6/2001	433.9	0	<u>1</u>	
Q9VF07	Q9vf07 SAP47 PROTEIN. 3/2001	307.3	0	<u>1</u>	
Q24503	Q24503 SYNAPSE ASSOCIATED PROTEIN. 3/200	307.3	0	<u>1</u>	

Q24502	Q24502 SYNAPSE-ASSOCIATED PROTEIN. 3/200	307.3	0	1
O17591	O17591 C16C2.4 PROTEIN. 1/1999	285.9	0	1
Q9LRX9	Q9lrx9 GB AAF07359.1. 10/2000	-19.3	0.18	1
Q9SV58	Q9sv58 HYPOTHETICAL 41.9 KDA PROTEIN. 10	-46.2	29	1
Q9U207	Q9u207 Y57A10A.18 PROTEIN. 6/2001	-47.8	39	1
Q9M2X8	Q9m2x8 HYPOTHETICAL 47.5 KDA PROTEIN. 10	-48.9	48	1
O60968	O60968 L549.7. 1/1999	-49.1	50	1
Q9SMH5	Q9smh5 CYTOPLASMIC DYNEIN HEAVY CHAIN 1B	-49.9	58	1
O17589	O17589 C16C2.2 PROTEIN. 6/2001	-51.2	74	1
Q9LIX9	Q9lix9 SIMILAR TO ARABIDOPSIS THALIANA C	-51.8	84	1
Q9F0Y7	Q9f0y7 FADB. 6/2001	-52.4	93	1

Abb. 4.40: Ergebnis der HMM-Suche durch SwissProt und SPTREMBL.

Eindeutig erkannt werden die bereits im multiplen Alignment eingegebenen Homologe von SAP47. In diesem Fall ist der E-Wert gleich null. Interessant sind drei Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (Q9LRX9, Q9SV58, Q9M2X8, rot markiert), die zu einer größeren Familie von Arabidopsisproteinen gehören. Einige Mitglieder dieser Familie erscheinen auch in BLASTP-Suchen mit der *Drosophila* oder humanen SAP-Sequenz als Vorlage.

>>> pironly:S60653	synapse associated protein sap47-2 - fruit fly...	131	8e-30
>>> pironly:T19336	hypothetical protein C16C2.4 - Caenorhabditis ...	94	1e-18
>>> pironly:T10213	hypothetical protein F25G13.200 - Arabidopsis ...	42	0.005
>>> pironly:I51116	NF-180 - sea lamprey	38	0.094
>>> pironly:S54052	DOS1 protein - yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	35	0.61
>>> pironly:B86165	hypothetical protein F15K9.5 [imported] - Arab...	35	0.61
>>> pironly:G96714	hypothetical protein T6L1.21 [imported] - Arab...	35	0.61
>>> swissprot:DOS2_YEAST	P54858 <i>saccharomyces cerevisiae</i> (baker's...	35	0.61
>>> pironly:G70241	hypothetical protein BBI16 - Lyme disease spir...	35	0.79
>>> pironly:T02795	probable membrane protein L549.7 [imported] - ...	35	0.79
>>> swissprot:IF2_AQUAE	O67825 <i>aquifex aeolicus</i> . translation init...	35	0.79
>>> swissprot:GLDA_BACST	P32816 <i>bacillus stearothermophilus</i> . glyc...	34	1.8
>>> pironly:G69946	phage-related protein homolog yqbD - <i>Bacillus</i> ...	33	2.3
>>> swissprot:YQBD_BACSU	P45920 <i>bacillus subtilis</i> . hypothetical 3...	33	2.3
>>> pironly:T18296	myosin heavy chain - <i>Entamoeba histolytica</i>	33	3.0
>>> pironly:A84233	hypothetical protein Vng0754c [imported] - Hal...	32	5.2
>>> pironly:B87610	hypothetical protein CC2916 [imported] - Caulo...	32	6.7
>>> pironly:T02639	G5 protein homolog - slime mold (<i>Dictyostelium</i> ...	32	6.7
>>> pironly:T18283	hypothetical protein G5 - slime mold (<i>Dictyost</i> ...	32	8.8
>>> pironly:T48814	hypothetical protein 15E6.220 [imported] - Neu...	32	8.8
>>> swissprot:STA6_HUMAN	P42226 <i>homo sapiens</i> (human). signal tran...	32	8.8

Abb. 4.41: Ergebnis eines Standard-Protein-BLAST (BLASTP) mit der SAP47-Aminosäuresequenz als Eingabe.

Fügt man die drei oben erwähnten Proteine zu dem bereits bestehenden multiplen Alignment hinzu, erkennt man einen auffälligen Bereich (hellblau).

hsap	RRPASGMFRGLSSWLG-----LQQP---VAGG--	56
bosap	--PADGMFRSLSSWFG-----LEQP---AAGGRQ	27
msap	-----MFGGLSSWLG-----LKPPEGAAAEEGE	23
sap47	GEGLEGEAEAGKSGWLGSAGWLGNASIPSMPAMPSPMPAMPSPMPSIPSIPLGRKGAGA	120
Q9LRX9	---MNIASRLRRSFLR-----	13
Q9M2X8	EEEYDQKETIKTNSIE-----NSGSDQPS	39
Q9SV58	YFFHDATAENNKDDSVS-----CSGSSKPH	43
.		
hsap	-----GQPNGDAPPEQPSETVAESAEELQQAGDQE--LLHQAKDFGNLYFN--FASA	105
bosap	S---QGQGXPXGHAPPDQRSEAVAESVEGEPQLAGNQE--LLHQAKGLGNLYFN--FATA	80
msap	PPSRDGDKLSAGAAPSEESPERPVEPTTEEQQQPPTDPQFLHQAKGLGNLYFN--FASA	81
sap47	DGAEGAEGAVAGEGGAASGAVSGGEDDDKSRYSATEGADSHPASGGTPTGDEGQIGQ	180
Q9LRX9	-----EKKESSDGNLKNSSVKEEGKDE-----ILG	40
Q9M2X8	SPSVLQTQSPRGVKEDISELTKTLRSQLWGWASFLAPPPSSSDTADHVDEETRKSSDLAE	99
Q9SV58	LKKRHKDFLIGSSDSPMHESSTSSSSSSWSFGNLIKTL--TKSESVIGSYRRDLVEFGS	101
.		
hsap	ATKKITESVAETAQTIKKSVEEG-----KIDGIIDKTIIGDFQKEQKKFVEEQH-T	155
bosap	ATKKITESVAETAQTIKKSXEEG-----KIDDIIDKTFIGDFHKEQKKFVEEQN-T	130
msap	ATKKITESVTETAQTIKKSVEEG-----KIDDILDKTILGDFQKEQKKFVEEQN-T	131
sap47	VTTKVTQQAQKHFSGFLSSAISKAG-----SKIKETVKDNTILDSFNKEQEAFLKGGQ-G	233
Q9LRX9	VTDELIDHVSFTIDTFKNFSLE-----DEEEVSVNPLG-D	76
Q9M2X8	GDEDLIAGIRNDFVEIGGRFKTGI-----SKLSGNLPVSKFTNMASNFLQLGSEGV-D	152
Q9SV58	ELKKETSIIRRVASRLPDSLEIGASVASESLESVQVIDDIGATVWKSTAKIISRKESL	161
.		
hsap	KKSEAAVPPWVDTNDEETIQQILALSADKRNFLRDPAGVQFN-----FDFDQMYPVAL	210
bosap	KKSEVAVPPWVDSNDEETIQQILALSADKRNFLRDPAGVQFN-----FDFDQMYPVAL	185
msap	KKSEAAVPPWVESHDEETIQQILALSADKRNFLRDPAGVQFN-----FDFDQMYPVAL	186
sap47	VGN--GAAPWIGHANEAKIKEEILGLSQDRRNFRAPPAGVDFE-----FSYDTAYPTAI	286
Q9LRX9	EDN-----GMSSSANVKKDLSDWQEKH-----AV	100
Q9M2X8	KNRDVAIGNAIGVTEEVVLFARDLALHPETWLDFFPDEDDNFDDF---EMTDAQYEHAL	209
Q9SV58	EPNRDRTNQVLSLKPYPFRFEMMLLALQSDKGTFFVREPDDLSDFENWSLGLKLEEKREIV	221
.		
hsap	VMLQEDELLESKMRFALVPKLVKEEVFWRNYFYRVSLIKQSAQLTALAAQQQAAG-----	264
bosap	VMLQEDELLESRMFDLVPKLVKEDVFWRNYFYRVSLIKQSAQLTALAAQQQAAG-----	239
msap	VMLQEDELLESKMRFALVPKLVKEEVFWRNYFYRISLIIQAAELGTLGADGVGQA-----	240
sap47	AIMAEDKALETMRFEVLPKIIITEENFWRNYFYRVSLIIQAAELGTLGADGVGQA-----	340
Q9LRX9	LVLKSKKELSQLRFKLCPRVLKEHQFWRIFYFLVLRKIVAKYEVLAIQQAQIRRM-----	154
Q9M2X8	AVENLASSLAALRIELCPAYMSEYCFWRIFYFLVLRKIVAKYEVLAIQQAQIRRM-----	269
Q9SV58	ELINGNKGVEIYEEIVPVEVDAETFWRRYYKVKYKLEQVEEARVKLVKRAISG-----	275
: . : : * : *** * : : : .		
hsap	-----KEEKSNGREQDLPLAEAVRPKTPPVVKSQKLTQEDEEEISTSPG	309
bosap	-----KEE-----	242
msap	-----KEEKSSNRDDNLPLTEAVRPKTPPVVKSQKLSQEDEEEISTSPG	285
sap47	-----SSGEDALAFNY-----	351
Q9LRX9	-----AMEDSKTSESKG-----VYEVEMSETKQRLSTGPA	184
Q9M2X8	ELLRKRNKDTVVVPESDRGADSENVEPLFQPTNPSPKSEPEPVKTITVETIHSARSEF	329
Q9SV58	-----EEDELDLWDLDD-----EKEKVESRDVSSKSDSDYSV	306

Abb. 4.42: Multiples Alignment von SAP47 mit den Vertebratenhomologen aus Mensch, Maus und Rind (Accessionnummern siehe Abb. 4.39) sowie den Arabidopsisproteinen Q9LRX9, Q9SV58 und Q9M2X8.

Da die Ähnlichkeiten der Arabidopsisproteine zu den SAP-Homologen unterhalb des in BLAST eingestellten Schwellenwertes liegen, wurde im nächsten Schritt ein neues HMM aufgrund des erweiterten multiplen Alignments erstellt. Dazu wurde lediglich der Bereich 195-249 (Zahlenangaben für hsap) mit der hochkonservierten Region (hellblau) verwendet.

Die HMM-Suche wurde in diesem Fall von Peer Bork und seinem Mitarbeiter Tobias Doerks am EMBL in Heidelberg durchgeführt. In der ersten Iteration ergab sich eine signifikante Ähnlichkeit zu DOS-like Proteinen (E-Wert $7,2 * 10^{-7}$). In weiteren HMM Iterationen fanden sich zusätzlich signifikante Homologien zu BTF2-like Transkriptionsfaktoren (E-Wert $2,3 * 10^{-3}$), zu Proteinen mit BTB/POZ-Domänen und zu anderen hypothetischen Proteinen aus Protozoen.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser HMM-Suchen führte zu der Identifizierung einer neuen 60 Aminosäuren langen Domäne (Doerks, Huber, Buchner und Bork, 2002). Der Name dieser Domäne setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der die Domäne enthaltenden besser charakterisierten Proteine zusammen: BSD (**B**TF2-like Transkriptionsfaktoren, **S**ynapsen-assoziierte Proteine, **D**OS-like Proteine).

In der folgenden Abbildung (Abb. 4.43) sind alle die neue Domäne enthaltenden Proteinfamilien dargestellt.

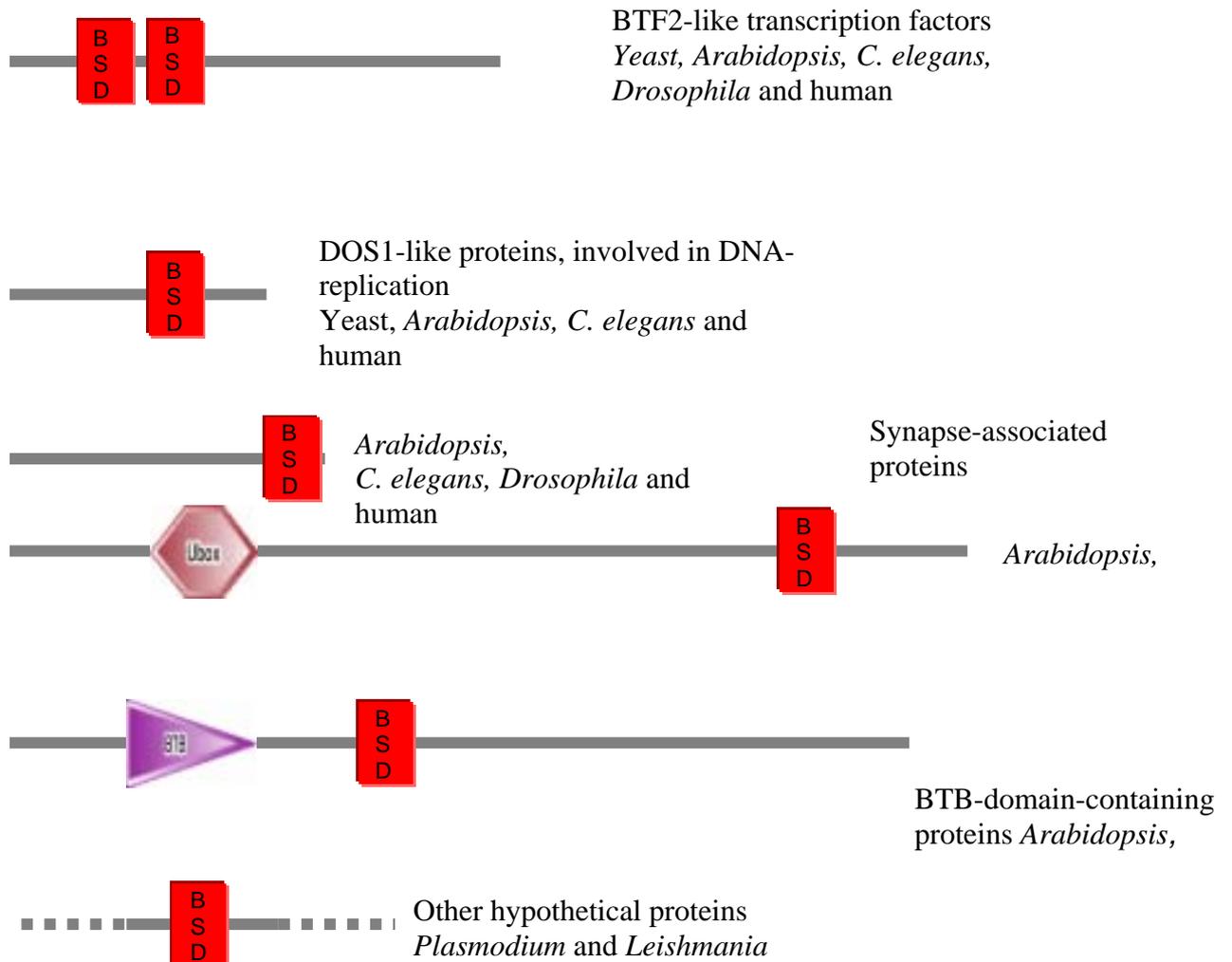
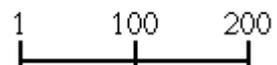


Abb. 4.43: Domänenstruktur der Proteine, welche die BSD-Domäne enthalten.

Die Domänennamen richten sich nach dem Simple Modular Architecture

Research Tool¹⁵ (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

Abkürzungen: BTB, Broad-Complex, Tamtrack und Bric a Brac; Ubox, eine modifizierte Ringfingerdomäne, welche mit Ubiquitinierung in Verbindung gebracht wurde.



Das Vorkommen dieser neuen Domäne in bereits bekannten Transkriptionsfaktoren und in bei der DNA-Replikation involvierten Proteinen lässt eine mögliche Rolle von SAP47 und seinen Homologen in Chromatin-assoziierten Prozessen vermuten. Dies wird weiterhin unterstützt durch das gleichzeitige Auftreten der BSD-Domäne in weiteren Proteinen mit einer Ubox-Domäne (involviert in Ubiquitinierung) beziehungsweise mit einer BTB-Domäne (Protein-Protein-Interaktionsdomäne, findet sich häufig in Transkriptionsfaktoren in enger Nachbarschaft von Zinkfinger enthaltenden DNA-Bindungs-Domänen). Die Sekundärstruktur der BSD-Domäne wurde mittels PHD (Rost und Sander, 1993) vorhergesagt. Wie in dem multiplen Alignment (Abb. 4.44) zu sehen ist, handelt es sich wahrscheinlich um drei α -Helices, die sich zu einem Dreihelixbündel zusammenschließen. Die dritte vorhergesagte Helix enthält benachbarte Phenylalanin und Tryptophanreste. Diese Aminosäuren treten in Proteinen relativ selten auf, kommen aber in allen identifizierten BSD-Domänen an dieser Stelle vor. Dies ist die auffälligste Struktur der Domäne (zu sehen in blauen fetten Buchstaben).

TFB1_a	sc	165	LDDSL SKE KLLTNLKLQ---S LL KGNKVL MFV QE---TVINAGLPPSE FW STR IPL LR AFA	P32776
TFB1_b	sc	243	SENKVN VN LS RE KIL-----N IF ENY PIV K AY TD---N VP K NF KE PE FW AR FF S SK LFRK	P32776
BTF2_a	hs	99	LLPKFK RK ANK E LEEK N ----R ML QED PV L FQ LY KD ---L VV SQ VI S AEE FW AN R LN VN NATDS	P32780
BTF2_b	hs	180	GCNGLR YN L TS D IE -----S IF R TY PA V K M K Y AE---N VP HN MT E KE FW TR FF Q SH Y FHR	P32780
TFB1dm_a	dm	109	LLPNFK RK V DK LE DK N----R LL VEN PN L LQ LY KD ---L VI TK VLT S DE FW AT HAK D HAK KK	Q9V713
TFB1dm_b	dm	182	GCNGLK YN L TS D VI H-----C IF K TY PA V K R K H FE---N VP AK MS E AEE FW T K FF Q SH Y FHR	Q9V713
R02D3.3_a	ce	116	NELAK SVE SQ SQ VEL QAK Q KIL QED RN LE KLY Q NL ---V AT KL I TP DD FW SD YY Q KE GVSE	O44499
R02D3.3_b	ce	231	CKEIL KFT I QCE YL TR -----K IS R SE NY I Q K N LE ---L VP HE MS E EN FW KK FF Q SH Y FHR	O44499
F2A19.20_a	at	82	LTPAE QLS MA E F EL RF-----K LL RE NS E LQ L H K Q ---F VE SK VLT E DE FW STR KK L L G KDS	Q9P322
F2A19.20_b	at	161	RTNR VT F N L TS E IF -----Q IF A E K PA VR QAF IN---Y VP KK MT E KD FW T K YF RA EY LYS	Q9M322
SPAC16E8_a	sp	60	RVN ST N L E KD I DL QE-----S LL T NP D LL Q T F KE ---A VM K G H L S NE Q FW ST RL H L L RA HA	O13745
SPAC16E8_b	sp	134	VD N Q M K V SL T G Q Q I H-----D MF E Q H PL L R K V Y DK ---H VP -P LA E GE FW S R FF L SK L CK K	O13745
B8B20.390_a	nc	147	WFED MLK AD VEL Q Q -----S LM K K D K AL H I Y ND[6]D SL S D AS F NS Q FW AT R I S L L RA YA	Q9P5N7
B8B20.390	nc	227	ENG E L KL N I N H E Q V Q -----L IF Q Q H PL V K R I Y NE ---N VP -K L T E S E FW S R FF L S R L S KK	Q9P5N7
Hypo47.2	hs	146	WLS Q F LE E KK G E I S -----E LL V G S P S I R AL Y TK ---M VP AA V SH S E FW H R Y F Y K V H Q LE	Q9NW68
Y97E10AR.6	ce	294	WIS R FN L D EY D GE I N -----I LL AN NP S L R Q M F AN---L VP G S V N H ET FW K R Y F Y A I EV A E	CE27417
F25G13.200	at	207	W SL GL L E E K R N E I V -----E LL ING N K V G K E I Y EE ---I VP V E V DA E T FW R R Y F Y K L E Y KL E	Q9SV58
F15K9.5	at	179	W ES A F S L D G K A E EM E-----K LL E EN G D M K G V Y KR ---V VP S M V D H ET FW F R Y F Y R V N K L K	Q9ZVT6
HypoBAC	os	409	WRDA F R I D ER K E I E -----G V L KE S P G L E S F V ER---L VP S V D Y D M FW C R Y F F AV D K L R	Q9LIX9
B23L21.150	nc	463	W V NE F D V D KK T E A IA -----A DL D K Y PE L R A T M E K---L VP D Q V P Y AD FW K R Y F L R H G I E	Q9P5L4
SPAC22A12	sp	167	W E K E I S I D G K T E I S -----L LL E E Y P D L R K Q M E S ---L VP S E V S Y D D FW K R FF W H K EV V Q	O13905
DOS1	sc	176	Q L D P F D V D E K T E E I C-----S IL Q G D K D I S K L M N D ---I VP H K I S Y K D FW H I Y F L Q R N K I L	P54858
HypHS	hs	182	V Q F N F D F D Q M Y P V AL -----V ML Q E D E L L S K M R F A ---L VP K L V K E EV FW R N Y F Y R V S L IK	AAH01468
SAP47	dm	272	V D F E F S Y D T A Y P T AI -----A IM A E D K A L E T M R F E ---L VP K I I T E EN FW R N Y F Y R V S L I I	Q24503
C16C2.4	ce	174	AN S E Y T Y E Q Q AM A T -----L LL K H D P N L AN V R F Q---L VP K V K EN Q FW Q N Y F Y R I GL I R	O17591
K7P8	at	86	N V K K D L S D W Q E K H AV -----L VL S K S K E L S Q L R F K ---L CP RV L K E H Q FW R I Y F Q L V R K I V	Q9LRX9
T16K5.150	at	195	F D D F E M T DA Q Y E HAL -----A V EN L AS S L A L R I E ---L CP PA Y M S E Y C FW R I Y F V L V H P I F	Q9M2X8
F20B24.15	at	227	I K N L E M S DA Q R G HAL -----A I E R L AP R L A L R I E---L CP CH M S V G Y FW K V Y F V L L S R L	Q9SGX8
HypOS	os	161	D EN S I I S D I Q R D H M E -----A I E K L V P D L AS L R A R ---L CP S Y M D I D V FW K I Y F T L L ES N L	Q9LWJ8
AT2G10950	at	137	D T E F E L S E A Q R A H S -----A I E D L V P G L V A V K N Q---V SS Y M D D E H FW L I Y F I L L M P R L	Q9SKH9
T6L1.21	at	178	N V R K D L S E W Q E R H AT -----L VL G S V K Q I S K L R Y E ---L CP RV M K ERR FW R I Y F T L V S T H V	Q9CAA2
F6H11.10	at	769	F S D F E L A DA Q Y E HAL -----A V E R L AP S L A S L R I E ---L CP E Y M T E N C FW R I Y F V L V H P K L	O49529
F20N2.15	at	424	ST S S E Q L S I K E L EL RF-----K LL RE N --R Y R L H K Q---F VE SK VLT E DE FW AT R KK L L G K D S	Q9LFZ6
LMAJFV1	lm	340	W AL H S L F D F D R D V Q E -----G LL AS A --E V R A H R Y R ---L VP AR L K E V T FW AN Y FW K V H C V G	O60968
PFC1055W	pf	302	Q K L S K S V E I NN E L R K -----L LL C EN K E L K K L Y D Y---Y I E NN I L S D S K FW F L F NN K Y S H L	O97305
Consensus (80%)		hp.p...h.....lhp...l..hh.p...hss..hp.ppFW.haa..h..h.	
sec.struc.pred		hHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH.hHHHHHHHH.....hHHHHHHHHHHHH.....	

Abb. 4.44: Multiples Sequenzalignment der BSD-Domänen von BTF2-like Transkriptionsfaktoren (TFB1, BTF2, TFB1dm, R02D3.3, F2A19.20, SPAC16E8, B8B20.390), DOS-like Proteinen (Hypo47.2, Y97E10AR.6, F25G13.200, F15K9.5, HypoBAC, B23L21.150, SPAC22A12, DOS1), Proteinen mit Ähnlichkeiten zu SAP47 in *Drosophila* (HypHS=HSAP, C16C2.4, K7P8, T16K5.150, F20B24.15, HypOS, AT2G10950, T6L1.21), mit zusätzlich vorhandener UBOX (F6H11.10), mit zusätzlicher BTB-Domäne (F20N2.15) und zwei anderen hypothetischen Proteinen in *Leishmania* (LMAJFV1) und *Plasmodium* (PFC1055W). In der ersten Spalte sind die Namen der Proteine aufgelistet (a und b bezeichnen mehrere Domänen innerhalb eines Proteins), in der zweiten Spalte sind die Speziesnamen aufgelistet (at: *Arabidopsis thaliana*; ce: *Caenorhabditis elegans*; dm: *Drosophila melanogaster*; hs: *Homo sapiens*; lm: *Leishmania major*, nc: *Neurospora crassa*, os: *Oryza sativa*, pf: *Paramecium falciparum* sc: *Saccharomyces cerevisiae*, sp: *Saccharomyces pombe*), die dritte Spalte entspricht dem Beginn der Domäne und die rechte Spalte der Accessionnummer des Proteins in den Datenbanken SwissProt oder SPTREMBL. Teilweise konservierte (mehr als 50%) negativ geladene Aminosäurereste sind in rot dargestellt; konservierte hydrophobe Reste sind in blau dargestellt; konservierte aromatische Reste sind in fettem blau dargestellt) andere konservierte Aminosäurereste sind fettgedruckt. Die Konsensussequenz (konserviert über 80% der gesamten Sequenz) ist unter dem Alignment zu sehen; h, p, s, l und a stehen für hydrophobe, polare, kleine (s=small), aliphatische (l) und aromatische Aminosäurereste. Die vorhergesagte Sekundärstruktur wurde von der Konsensussequenz des Alignments abgeleitet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Spekulation einer Beteiligung von SAP47 und seinen Homologen an Chromatin-assoziierten Prozessen unbedingt experimentell getestet werden muss. Dies ist insbesondere für SAP47 wichtig, da sich die nachgewiesene Lokalisation an der Synapse nur schwer vorstellbar mit Chromatin-assoziierten Prozessen in Verbindung bringen lässt. Trotzdem ist diese Vorhersage ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion von SAP47.

4.7. Neues von SAP47

Seit Dezember 2001 befindet sich ein neuer EST-Klon in den Datenbanken, welcher für 551 Aminosäuren kodiert. Damit wäre dies nach den bekannten Spleißvarianten (347 und 351AS) das längste offene Leseraster für SAP47.

[PIR:S60652](#),351aa,1997

[PIR:S60653](#),351aa,1997

[SPTREMBL:Q24503](#),351aa,1996

[SPTREMBL:Q24502](#),347aa,1996

[SPTREMBL:Q9VF07](#),268aa,2000

[SPTREMBL:Q960T2](#),551aa,2001,

[EMBLAY051871](#); [AAK93295.1](#); -. [FlyBase FBgn0013334](#);

Length: **551 aa**, molecular weight: **56980 Da**, CRC64 check sum: **430392D0EAD5916E**

```

MFSGLTNQFT SLVGA VKGGA GDEDVPAPTG DAPAAAPAAS TSVEATASSA VDPEAAAAAAG
60
GEGLEGE EAG KRLPKSASLV DSLVSEATGW LGS AKGWLGN ASIPSMPAMP SMPSPAMPA
120
MPSIPSIPGL RKGAGADGAE GAEGAVAGEG GAAASGAVSG GEDDDK SRYI SATEGADSH P
180
ASGGGTPTGD EGQIGQGKGD EVKITTKVTQ QAKHFGSFLS SAISKAGSKI KETVKDNTIL
240
DSFNKEQEAF IKQGGVGN G AAPWIGHANE AKIK EEILGL SQDRRNFVRA PPAGVDFEFS
300
YDTAYPTAIA IMAEDKALET MRFELVPKII TEENFWRNYF YRVSLIIQAA ELGTLGADGV
360
GQASSGEDAN EVATKEKSK TAEP AKGDSS VKAIAEQPKA VIEPEAQECD VQAAKSKAKA
420
KAQAGKELGQ KISESEFVSD DFQASSESDL AEIQDGM RKL GIDSMTQQAL AATDEEQWEK
480
DLEAELKDYE VVDEGGTGGD GGGRRKGRK AGEDDTEADE DEPTISNLRT RSTNNDWEEY
540
ADLIEDTDDL K

```

Abb. 4.45: Accessionnummern für SAP47 in den Datenbanken Pir, SPTREMBL, EMBL und Flybase. Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserasters von SAP47.

Mit CLUSTALW wurde ein multiples Alignment für alle drei Spleißvarianten erstellt (s. Abb. 4.46).

```

sap347      MFSGLTNQFTSLVGAVKGGAGDEDPAPTGDAPAAAPAASTSV EATASSAVDPEAAAAAG 60
sap351      MFSGLTNQFTSLVGAVKGGAGDEDPAPTGDAPAAAPAASTSV EATASSAVDPEAAAAAG 60
sap551      MFSGLTNQFTSLVGAVKGGAGDEDPAPTGDAPAAAPAASTSV EATASSAVDPEAAAAAG 60
*****

sap347      GEGLEGEFAGK-----SGWLGSAGWLGNASIP SMPAMP SMP SMP PAMP 104
sap351      GEGLEGEFAGK-----SGWLGSAGWLGNASIP SMPAMP SMP SMP PAMP 104
sap551      GEGLEGEFAGKRLPKSASLVDSL VSEATGWLGSAGWLGNASIP SMPAMP SMP SMP PAMP 120
*****

sap347      MPSIPSIPGLRKGAGADGAEGAE GAVAGEGGAASGAVSGGEDDDKSR YISATEGADSH P 164
sap351      MPSIPSIPGLRKGAGADGAEGAE GAVAGEGGAASGAVSGGEDDDKSR YISATEGADSH P 164
sap551      MPSIPSIPGLRKGAGADGAEGAE GAVAGEGGAASGAVSGGEDDDKSR YISATEGADSH P 180
*****

sap347      ASGGGTP TGDEGQIGQ-----VTTKVTQQA KHFGSFLSSAISKAGSKIKETVKDNTIL 217
sap351      ASGGGTP TGDEGQIGQ-----VTTKVTQQA KHFGSFLSSAISKAGSKIKETVKDNTIL 217
sap551      ASGGGTP TGDEGQIGQKGDEVKITTTKVTQQA KHFGSFLSSAISKAGSKIKETVKDNTIL 240
*****

sap347      DSFNKEQEF AFIKGQGGVGN GAAPWIGHANEAKIKEEILGLSQDRRNFVRAPPAGVDFEFS 277
sap351      DSFNKEQEF AFIKGQGGVGN GAAPWIGHANEAKIKEEILGLSQDRRNFVRAPPAGVDFEFS 277
sap551      DSFNKEQEF AFIKGQGGVGN GAAPWIGHANEAKIKEEILGLSQDRRNFVRAPPAGVDFEFS 300
*****

sap347      YDTAYPTAIAI MAEDKALETMR FELVPKIITEENFWRN YFYRVSLIIQA AELGTLGADGV 337
sap351      YDTAYPTAIAI MAEDKALETMR FELVPKIITEENFWRN YFYRVSLIIQA AELGTLGADGV 337
sap551      YDTAYPTAIAI MAEDKALETMR FELVPKIITEENFWRN YFYRVSLIIQA AELGTLGADGV 360
*****

sap347      GQASSGEDED----- 347
sap351      GQASSGEDALAFNY----- 351
sap551      GQASSGEDANEVATK EKKSKTAEPAKGDSSVKAIAEQPKAVIEPEAQEC DVQA AKSKAKA 420
*****

sap347      -----
sap351      -----
sap551      KAQAGKELGQKISESEFVSDDFQASSEDLAEIQDGM RKLGLIDSMTQQALAA TDEEQWEK 480

sap347      -----
sap351      -----
sap551      DLEAELKDYEVVDEGGTGGDGGGRKGRKAGEDDTEADEDEPTISNL RTRSTNNDWEEY 540

sap347      -----
sap351      -----
sap551      ADLIEDTDDLK 551

```

Abb. 4.46: Alignment der abgeleiteten Proteine der drei bisher isolierten cDNAs. Farbcode für Aminosäuren: blau: sauer, lila: basisch, rot: klein und hydrophob, grün: S,T,Y,H,C,G,Q.

Im Genom, welches auf den nächsten Seiten ausschnittsweise dargestellt ist, erkennt man die Exon/Intronstrukturen für alle drei Spleißvarianten.

74701 aattacaaga gacaacttca aacacattgt gctaaatgtc gaatcaatgt caactcgaat
74761 tgccaattca aaaagattga gatagaaagc ggtgacaggt tactaaccac cagttacaag
74821 tagtttgaaa taaccagaa cccccgctcc cgctgcactc actctcaatc ccctagttaa
74881 acgcttgctt tgtagtctag ttttagtttag ttttagttctg ttggtagcaa gtcccatttg
74941 ggctgattgt cgctcagtga gtgaaactta tcgcatactg atttgaatgt atccgacagt
V

4. Exon

75001 taccacaaaa gtaacacagc aggccaaaaca ctttggatcc ttcttgtcat cggccatcag
/I T T K V T Q Q A K H F G S F L S S A I S
75061 caaggctggc agcaaaatca aggaaactgt caaggataat gtgagtacaa cgatgacact
K A G S K I K E T V K D N

5. Exon

75121 gctacaatgg ggccaacctc tatttattcc tgccgattcc cagaccattc tcgactcgtt
T I L D S F
75181 caacaaggaa caggaagctt tcatcaaggg ccaggagggc gtgggcaatg gagcagcccc
N K E Q E A F I K G Q G G V G N G A A P
75241 ctggatcggc cacgccaacg aggccaaagat caaggaggaa atccttggcc tgtcgcagga
W I G H A N E A K I K E E I L G L S Q D
75301 tcgcccgaac ttcgtgcgcg ccccgcccgc cggcgtggac tttgagttaa gctacgacac
R R N F V R A P P A G V D F E F S Y D T
75361 cgcctatcct acggccatag ccattatggc cgaagacaag gcgctcgaga cgatgcgatt
A Y P T A I A I M A E D K A L E T M R F
75421 cgagctggty cccaagatgt aagtacaatg ctagtgttgc cagtaacaag cacatgatcc
E L V P K I

6. Exon

75481 aatatgagcc ttgttttccg tagcatcact gaagagaatt tctggcggaa ttacttctac
I T E E N F W R N Y F Y
75541 cgcgtctcac tgatcatcca ggccgcagag ttgggcactc tgggcgccga tggcgtgggt
R V S L I I Q A A E L G T L G A D G V G
75601 caggcctcaa gcggcgaaga tggttaagttg gttatagctt ctgctgatcg tcgtagacaa
Q A S S G E D

75661 ctctggaaaa tatatacata taacgcaaag agatgcagga caaacagact gcctcgctca
75721 ccaaactc acactcgta ctcgcgct ctctacctat ctatctatct atctatctat
75781 aactataacg tgatatctgta tctataaacg acctgcctat gaactctgtc tatctttctc
75841 taagtctaag tctttcattt ttggttcact ttagccacac gcgcctgttt aacttatgat
75901 ttccttagtc cttttcacac acgctagcta tccaacgttt tccgttctct cgctctttct
75961 accttactct taaaacatgc ctactatctc tcgagcctcg atctaactaa cttggctagc
76021 gtctgtacta caccgcctaa gagtatgctc aagtcttttg ttgaattaa acccctgat
76081 ttgtatccgt ccctccacc gcactggctt gtatcgtcga ggactcgaat cctggtttc
76141 ggttcttcc cactcccccc taacgttcat ctcaatcgcg tctcgaagct caattgataa
76201 tcgttccacg aacttcgcca gtcgtcagcc gccagcgctc tcacctcaaa tcgatttact
76261 tactgtgttt cctcttttca gtttgttaat cattttattt ttcgttctat tattattttt
76321 atgaattcca ccacgaaatt aactgtgaa aacgaacttg tctatcaaaa tcaattcaaa

7. Exon (nurSAP551)

76381 aactcaacca tgggctgaac gatcagccaa cgaagtggcc actaaagaaa agaaatccaa
A N E V A T K E K K S K
76441 gactgccgaa ccagccaagg gcgattcgag tgtgaaagcc attgccgagc agccgaagcc
T A E P A K G D S S V K A I A E Q P K A
76501 cgtgattgag ccggaggcgc aggagtgcga tgtccaggca gccaaagtcaa aggcaagcc
V I E P E A Q E C D V Q A A K S K A K A
76561 aaaggctcaa gccggcaag agctgggcca gaagatctcc gaatcggaat tcgtttcggga
K A Q A G K E L G Q K I S E S E F V S D
76621 tgacttccag gctcgagcg aatcggactt ggctgagatc caagacggca tgcgcaaatt
D F Q A S S E S D L A E I Q D G M R K L
76681 gggcatcgac agcatgaccc agcaggcatt agctcgcact gatggtaaga gtttatgttt
G I D S M T Q Q A L A A T D
76741 tattttattt cccaatcag tttgttacta ttgtttcatt gttatttctt gttgtttaat
76801 ttaaggacta acattttttg tacatacatt aaattgatca aacgaatgtc attggtgttc
76861 tgagacacac gaaacattca ttcatacaca tgtcaataca tacaacatga gaaaacattt
76921 agagtatcta gttatattgc ttaggcagca agcttcagct ctaatttcat ctagacttta
76981 gagatctatc caggcacact ccattgccat ctgagcacia taatgtctct tgtctgagtc
77041 gcgaatttgg ttttcctaac atcccattat ctattttgca accaaagcca catatgaaaa
77101 tatataattt ctttgtgcca acaaacaga acaacaatc taaaacaaac caaatgtgt
77161 gtacaaatca agtgtaaaac cgaacaatc tctttcttct cctctgctct gtttcttct
77221 tttatataaa ttacattttg tatgaaaatc gtttttactt attatatgac aacaactcaa

alternatives Exon (SAP351)

77281 gctctggcat ttaattacta aagcgaatct atcaattgaa agtaatatta aaccaataac
 A L A F N Y STOP

77341 gaaatcacac aataaataaa tatagaagta atgcaactaa tggataacaa gagtattata
 77401 aattatataa acacatataa atatatatcc tgaataaaaat cgaactcgac aaaaactctc
 77461 atttgccatt tagcgaactg caaaataata tcaaatatat atatatatat gtatcatatg
 77521 acatataatt tgatttcaat tatccaataa cagttaaaga aagagttaaa gccacaaacc
 77581 aaatttcgaa caagttgagt atgaccaaac tgatcaagaa attccttatat acaactatat
 77641 cctattgata caactttcgc tctctctttg caatttcgtg ctccctttta ttcaatttgc
 77701 aattcaattt catttacaaa aatttagcta gatgtaattt tcgttgtctt cttcctctcg
 77761 atccaattat aattttgcct ctctctttga cacatttctc cacatgtttt aaacaaaaaa
 77821 aaaaaaaaaa aaactgtatt ctaaactagc cgcgacacga aaagaacctc ctttctagca
 77881 atacacaaaa ttttccaaaa gtatcttacc ttgaatatct gatgatgaat ttgtatggga
 77941 aaacatttta acaaaacatt tatttttctt catgtatttc ttgatttatt tacgaatcat

alternatives Exon (SAP347)

78001 cttgcagaag attgaatgga ttaaaaccaa aagacaaaac aaaatgctaa atctaaattt
 E D STOP

78061 caaatgcaa aaaaaaccaa ctaacaaaat aaacaagaac aaaattataa aaaaaaata
 78121 ctacaaaatt gccacaaga aagaaaagaa attgttaagc gaaacaaaaa aaaaagtact
 78181 acaacaacaa aattatataa atacttataa agatattcac ttgacaacaa tgaaaatttg
 78241 agttgaacc agtaacgcca ttatttataat aaaccgaaga cagaaaagca aaaaaatggt
 78301 actaaaaaga caaaaaccga acaaaaattt tgtgtggtaa gttagaaatt gttggctgaa
 78361 ttaaagcaaa aaacattaaa gtgaaatata tacaaattgc aacacgtttt agttgtgaca
 78421 attttcgggt acatgttgggt tttcaattgc ataattgttc tgttcagcaa tattgtatgt
 78481 agataatc caacaattca aagtgtttc aatttcaatc atttccact acgctcctgt
 78541 ctgtgtctat gtactcgttg tgtatgttt tagtatgtgt gcgtaaatta attagtagtc
 78601 ttagtgcaca aagctttggt ttttagtttag cgtgtttcca ttatagttta cattgaagtg
 78661 cgtgcgttga taactcaggg gatgggtggc aaaaaaaaaa gaaacctttt tatacaaat
 78721 gggcgttct tacgaatcca atttgctttc ttatactgca caatgataat acgaatcggg
 78781 gatcgtttc tctgggacca actcaccaca caaaatcgat ggaaactaat tcaaaactat
 78841 tcaattctct ggccaaaact ataaaacccc aagaagccgc atatgactca gtttctttcc
 78901 cctatttctc tctatctctt catggcattt ttgtttgaat tgatttgcag catttggtt
 78961 gccagcttat aaaatacctt atatttggca agcttcgtca gttattaggc gtgtaaataa
 79021 taataattaa tataatatgt tcagtttgc tgccttttat gcgtaaagtc tgtaaataca
 79081 cactgaatat gatttttgtt gtaaacattt ttgttaatgg atggagtgtg aagcaacaat
 79141 aaaccaacca aaaaacctaa cacaaattgc agttcgggaa ctacaagcaa gtcatggact
 79201 gggatcctt tgggtgcacg ctatccgtta attagtgcta gatcgacatt ggtgtacacg
 79261 gccagcctat cctatcaatt aatccataaa ttggccccac tttgttaatt gaccaagtga
 79321 aaaataaaca aaatttccaa ctattttag acggctatta ttcagttacg gtgcgaatac
 79381 ccaaacgcat aacagtgtgt gaaaatctat gtcttagcta tatccccaga gactagccgc
 79441 aggtaaactgt aagcgtatgt taaactgaga acaacctatg acttgcttgg gatggtcacc
 79501 taaccacaat tcaattgctt gccttacaca cttttgatac taaacctata taccatata
 79561 ccatttgcc aatatgcca tatgccaata taccaatata ccaatatac atagtgtaa
 79621 accatgtatg ctaaacttat tatatatccg tacataagca gatatccgtt actgacgtgc
 79681 tgctaagcca cgcaaatact aatcgatatt ccgcttggtg ctccgtcttt tgccagaggaa
 E E

8. Exon (nur SAP551)

79741 acaatgggaa aaggatctgg aagctgaact caaggactac gaggtggttg acgaaggcgg
 Q W E K D L E A E L K D Y E V V D E G G

79801 caccggcggc gatggtggcg gaggacgcag aaagggcagg aaggccggcg aggacgacac
 T G G D G G G G R R K G R K A G E D D T

79861 cgaggcagat gaggacgaac cgacaatatc aaacttgcgc acacgctcga ctaacaacga
 E A D E D E P T I S N L R T R S T N N D

79921 ttgggaggag tacgccgatt taattgagga taccgatgat ttaaagtaat taagagctta
 W E E Y A D L I E D T D D L K STOP

79981 tatcgtagtt tcttctaagt tggtctaag ttataacta tctttacttt atctttcttt
 80041 ccattccttt ccaaccttgt ttctctta attgattaac ctaaatattgt taacccaaaa

Abb. 4.47: Darstellung der genomischen Region von SAP47 in Ausschnitten. Rot: mRNA, blau: SAP47 (Q24502 und Q24503), grün: längstes offenes Leseraster SAP551, lila: nicht translatiertes 5' Ende.

Daraus ergibt sich folgende mRNA für das längste offene Leseraster SAP551:

```

1  cgcagttggt  gtttccatag  acgtgtcaat  tgtttgtcta  attgcgccag  cagcagcaaa
61  acgacgccaa  agcacacatg  cgcattccag  cgcacaaaata  tcccaccac  gaaaatcgca
121  ataccatcgc  cccagcaacg  cggaggaggg  ggtggactcc  acttttccag  ggagaaaagcg
181  aacgtacgca  tacgagaatc  cgaatctgag  aatccccaat  ccccgagtcc  aagagagcgca
241  agacgacact  ccagctcggg  atttgagaca  tcgacattcc  gctgctccgt  cagttttcag
301  aggaccttcg  aagtgggcag  ccgaaaatcc  aaaagtctcc  tggcagcgaa  cggaaaacca
361  aagagaaaaa  aaataagaaa  agcaaaatcc  agttggcaga  gaaaagctca  agtggtaatt
421  ggctgcgact  caaattactt  tagttgtgca  aatagcgaat  agctataaac  caaaaagaa
481  aagaaactcg  agcgtggcgt  gtgtccatgt  ggaaaatcga  tcgaatcgca  gagtatttat
541  cgtgtaattg  tgcccaatag  ccacgcaatt  cccagtccgt  ttatttgatt  tttcccaccg
601  cctcgccaag  tagcaataaa  aaccattctt  ttaccttcca  tctcggccat  ctggacaaaag
661  caattgcagc  gtgaaaaatt  caaatttcaa  gttaaatgcg  agaatttaca  taacgccgag
721  cgttgaaagt  gaaacttctg  tgggtgcgaa  gaaacactga  aagaaaggaa  aaccattac
781  aggacattct  atctgcctct  gccagtgta  gtaaaagtgt  gagagccagg  agcgggagag
841  cagtggaaaa  ccgtgagaac  cgcgagaaca  agagagccta  gagagcgttg  aacgtgcgca
901  cgtcttctct  gtcaggacac  accaccaatc  cttgagagaa  acagcaggag  ccaacatggt
961  ttcgggccta  acaaatcaat  tcacctcgct  ggtgggcgcc  gttaaaggag  gcgctggcga
1021  cgaggatgtg  cccgcgcccc  caggagatgc  gcccgcagcc  gctccagcag  catccacatc
1081  cgtggaggcc  acggcctcct  ccgccgtgga  cccggaggca  gctgccgcag  ccggtggcga
1141  aggactcgag  ggcgaggaag  ctggcaaaaag  acttcccaaa  tccgcctccc  tggttgattc
1201  attagtatcc  gaagccaccg  gatggctggg  cagtgccaaag  ggttggctgg  gaaacgcctc
1261  gataccgctg  atgccagcca  tgccgtcgat  gccatcgatg  cgggccatgc  cagcgatgcc
1321  atcgatacca  tcgatcccgg  gactccgcaa  gggcgcagga  gccgatggag  ccgagggcgc
1381  cgagggagct  gtcgcccggg  agggcggggc  cgccgcccagt  ggagccgtga  gtggtggcga
1441  ggatgacgac  aagtcgaggt  atattagcgc  cacggagggc  gccgactcgc  atcctgcatc
1501  gggcgggtgg  acgcccaccg  gcgacgaggg  tcaaatcggg  cagggtaagg  gcgtaagatg
1561  aaaaattacc  acaaaagtaa  cacagcaggg  caaacacttt  ggactcttct  tgtcatcggc
1621  catcagcaag  gctggcgagc  aatcaagga  aactgtcaag  gataatacca  ttctcgactc
1681  gttcaacaag  gaacaggaag  ctttcatcaa  gggccagggg  ggcgtgggca  atggagcagc
1741  cccctggatc  ggacacgcca  acgaggccaa  gatcaaggag  gaaatccttg  gcctgtcgca
1801  ggatcgccgc  aacttcgtgc  gcgccccgcc  cgccggcgtg  gactttgagt  ttagctacga
1861  caccgcctat  cctacggcca  tagccattat  ggccgaagac  aaggcgtcgc  agacgatgcg
1921  attcgagctg  gtgcccaga  tcatcactga  agagaatttc  tggcggaaat  acttctaccg
1981  cgtctcactg  atcatccagg  ccgcccagtt  gggcactctg  ggcgcccgat  gcgtgggtca
2041  ggcctcaagc  ggcgaagatg  ccaacgaagt  ggccactaaa  gaaaagaaat  ccaagactgc
2101  cgaaccagcc  aagggcgatt  cgagtgtgaa  agccattgcc  gagcagccga  aggccgtgat
2161  tgagccggag  gcgaggaggt  gcgatgtcca  ggcagccaag  tcaaaggcaa  aggcaaggc
2221  tcaagccggc  aaagagctgg  gccagaagat  ctccgaatcg  gaattcgttt  cggatgactt
2281  ccaggcctcg  agcgaatcgg  acttggctga  gatccaagac  ggcatgcgca  aattgggcat
2341  cgacagcatg  acccagcagg  cattagctgc  gactgatgag  gaacaatggg  aaaaggatct
2401  ggaagctgaa  ctcaaggact  acgaggtggt  tgacgaaggc  ggcaccggcg  gcgatggtgg
2461  cggaggacgc  agaaagggca  ggaagccggc  cgaggacgac  accgaggcag  atgaggacga
2521  accgacaata  tcaacttgc  gcacacgctc  gactaacaac  gattgggag  agtactccga
2581  ttttaattgag  gataccgatg  atttaaagta  attaagagct  tatactgat  tttcttctaa
2641  gttggctcta  agtttataac  tatctttact  ttatctttct  ttccattcct  ttccaacctt
2701  gtttctcct  taattgatta  acctaattat  gttaacccaa  aacccaaaat  caaacccgaa
2761  tccaaatcca  aacaaaatac  aaaactattc  gaaaccaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaa

```

Abb. 4.48: mRNA für das längste offene Leseraster SAP551.

Mit dem Programm Translate auf dem ExPASy-Server (www.expasy.ch) kann die mRNA in Protein übersetzt werden.

```

cgcagttgttgtttccatagacgtgtcaattgtttgtctaattgcgccagcagcagcaaaa
  A V V V S I D V S I V C L I A P A A A K
cgacgccaaagcacacatgcgcatccagcgcacaaatatcccacccacgaaaatcgcaa
  R R Q S T H A H S S A Q I S H P R K S Q
taccatcgccccagcaacgcggaggaggggggtggactccacttttccagggagaaaagcga
  Y H R P S N A E E G V D S T F P G R K R
acgtacgcatacagagaatccgaatctgagaatccccaatccccgagtcgaagagagcgaa
  T Y A Y E N P N L R I P N P R V Q E S E
gacgacactccagctcggatattgagacatcgacattccgctgctccgtcagttttcaga
  D D T P A R Y L R H R H S A A P S V F R
ggaccttcgaagtgggcagccgaaaatccaaaagtctcctggcagcgaacggaaaaccaa
  G P S K W A A E N P K V S W Q R T E N Q
agagaaaaaaaaataagaaaagcaaaatccagttggcagagaaaagctcaagtggtaattg
  R E K K - E K Q N P V G R E K L K W - L
gctgcgactcaaattacttttagttgtgcaaatagcgaatagctataaacccaaaaagaaa
  A A T Q I T L V V Q I A N S Y K P K K K
agaaactcgagcgtggcgtgtgcatgtggaaaatcgatcgaatcgagagatatttattc
  R N S S V A C V H V E N R S N R R V F I
gtgtaattgtgcccgaatagccacgcaattcccagtcggttttattgattttcccaccgc
  V - L C P I A T Q F P V R F I D F P H R
ctcgccaagttagcaataaaaaccattcttttaccctccatctcggccatctggacaaagc
  L A K - Q - K P F F Y L P S R P S G Q S
aattgcagcgtgaaaaattcaaatttcaagttaaatgcgagaatttacataacgccgagc
  N C S V K N S N F K L N A R I Y I T P S
gttgaaagtgaaacttctgtggtgcgaaacgaaacactgaaagaaaggaaaaccattaca
  V E S E T S V V R T K H - K K G K P I T
ggacattctatctgcctctgcccagtgtagtaaaagttggagagccaggagcgggagagc
  G H S I C L C P V - - K L E S Q E R E S
agtggaaaaccgtgagaaccgcgagaacaagagagcctagagagcgttgaacgtgcgcac
  S G K P - E P R E Q E S L E S V E R A H
gtcttcctggtcaggacacaccaccaatccttgagagaaacagcaggagccaacatgttt
  V F L V R T H H Q S L R E T A G A N M F
tcgggcctaacaatcaattcacctcgctggtgggcgcccgttaaaggaggcgctggcgac
  S G L T N Q C F T S L V G A V K G G A G D
gaggatgtgcccgcccacaggagatgccccagccgctccagcagcatccacatcc
  E D V P A P T G D A P A A P A A S T S
gtggaggccacggcctcctccgcccgtggaccgggagcagctgccgcagccggtggcgaa
  V E A T A S S A V D P E A A A A G G E
ggactcgagggcgaggaagctggcaaaagacttcccaaatccgcctccctggttgattca
  G L E G E E A G K R L P K S A S L V D S
ttagtatccgaagccaccggatggctgggcagtgccaagggttggtgggaaacgcctcg
  L V S E A T G W L G S A K G W L G N A S
ataccgtcgatgccagccatgccgtcgatgccatcgatgccggccatgccagcgatgcca
  I P S M P A M P S M P S M P A M P A M P
tcgataccatcgatcccgggactccgcaagggcgcaggagccgatggagccgagggcgcc
  S I P S I P G L R K G A G A D G A E G A
gagggagctgtcgccggagagggggggggccgcccagtgaggccgtgagtggtggcgag
  E G A V A G E G G A A A S G A V S G G E
gatgacgacaagtcgaggtatattagcggccacggagggcgccgactcgcatcctgcatcg
  D D D K S R Y I S A T E G A D S H P A S
ggcgggtggcagcccaccggcgacgaggggtcaaatcggacagggtaagggcgatgaagtc
  G G G T P T G D E G Q I G Q G K G D E V
aaaattaccacaaaagtaacacagcaggccaaacactttggatccttcttgtcatcgcc
  K I T T K V T Q Q A K H F G S F L S S A
atcagcaagggtggcagcaaaatcaaggaaactgtcaaggataataccattctcgactcg
  I S K A G S K I K E T V K D N T I L D S
ttcaacaaggaacaggaagctttcatcaagggccagggaggcgtgggcaatggagcagcc
  F N K E Q E A F I K G Q G G V G N G A A

```

```

ccctggatcggacacgccaacgaggccaagatcaaggaggaaatccttggcctgtcgcag
P W I G H A N E A K I K E E I L G L S Q
gatcgcgcgaacttcgtgcgcgccccgcccgcggcgtggactttgagtttagctacgac
D R R N F V R A P P A G V D F E F S Y D
accgcctatcctacggccatagccattatggccgaagacaaggcgctcgagacgatgcga
T A Y P T A I A I M A E D K A L E T M R
ttcgagctggtgcccaagatcatcactgaagagaatttctggcggaattacttctaccgc
F E L V P K I I T E E N F W R N Y F Y R
gtctcactgatcatccaggcccgaggttgggcactctgggcgccgatggcgtgggtcag
V S L I I Q A A E L G T L G A D G V G Q
gcctcaagcggcgaagatgccaacgaagtggccactaaagaaaagaaatccaagactgac
A S S G E D A N E V A T K E K K S K T A
gaaccagccaagggcgattcgagtgtaagaccattgcccagcagccgaaggccgtgatt
E P A K G D S S V K A I A E Q P K A V I
gagccggaggcgcaggagtgcgatgtccaggcagccaagtcaaaggcaaaggcaaaggct
E P E A Q E C D V Q A A K S K A K A K A
caagccggcaaagagctggggccagaagatctccgaatcggaattcgtttcggatgacttc
Q A G K E L G Q K I S E S E F V S D D F
caggcctcgagcgaatcggacttggctgagatccaagacggcatgcccgaattgggcatc
Q A S S E S D L A E I Q D G M R K L G I
gacagcatgaccagcaggcattagctgcgactgatgaggaacaatgggaaaaggatctg
D S M T Q Q A L A A T D E E Q W E K D L
gaagctgaactcaaggactacgaggtggttgacgaaggcggcaccggcggcgatggtggc
E A E L K D Y E V V D E G G T G G D G G
ggaggacgcagaaagggcaggaaggccggcgaggacgacaccgaggcagatgaggacgaa
G G R R K G R K A G E D T E A D E D E
ccgacaatatcaaacttgcgcacacgctcgactaacaacgattgggaggagtacgccgat
P T I S N L R T R S T N N D W E E Y A D
ttaattgaggataccgatgatttaaagtaattaagagcttatatcgtagtttcttctaag
L I E D T D D L K - L R A Y I V V S S K
ttggctctaagtttataactatctttactttatctttctttccattcctttccaaccttg
L A L S L - L S L L Y L S F H S F P T L
tttctccttaattgattaacctaataattgtaacccaaaacccaaaatcaaaccgcaat
F P P - L I N L I L L T Q N P K S N P N
ccaaatccaaacaaaatacaaaaactattcgaaacccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
P N P N K I Q N Y S K P K K K K K K

```

Abb. 4.49: mRNA von SAP551 übersetzt in Protein. Rot: Aminosäuresequenz für SAP551.

Das Programm ProtSweep findet für die neue Variante von SAP47 folgende Eigenschaften:

Number of residues: 551

Molecular weight: 56.98 kD

Charge: -42

Isoelectric point: 4.28

[more...](#)

Prediction of protein localization:

cytoplasmic

39.1 %

nuclear

26.1 %

mitochondrial

13.0 %

Homology Search:

Searching Database: Honest

[eminv1:AY051871](#)

E-Value: 0.0

Description: Ay051871 Drosophila melanogaster LD36546 full length cDNA. 8/2001 Length = 2816

[eminv2:DMSAP472](#)

E-Value: e-112

Description: X80110 D.melanogaster sap47-2 mRNA. 8/1995 Length = 1885 **TBlastN2**

[eminv2:DMSAP471](#)

E-Value: e-112

Description: X80111 D.melanogaster sap47-1 mRNA. 8/1995 Length = 1822

22 hits with an E value <= 0.01 were detected

[more...](#)

Searching Database: SwissProtPlus

[trembl:Q960T2](#)

E-Value: 0.0

Description: Q960t2 LD36546p. 3/2002 Length = 551

[trembl:Q24503](#)

E-Value: e-113

Description: Q24503 SYNAPSE ASSOCIATED PROTEIN. 3/2001 Length = 351 **BlastP2**

[trembl:Q24502](#)

E-Value: e-112

Description: Q24502 SYNAPSE-ASSOCIATED PROTEIN. 3/2001 Length = 347

12 hits with an E value <= 0.01 were detected

[more...](#)

Searching Database: blocksplus

[IPB003345A](#)

Score: 1162

Description: M protein repeat **Blimps**

[PR00914B](#)

Score: 1151

Description: Luteovirus (ORF3) RNA-directed RNA-polymerase sign

[PR00797F](#)

gland;amelanotic melanoma, cell line;anaplastic oligodendroglioma with 1p/19q loss;ascites;astrocytoma grade iv, cell line;blood;bone;brain;breast;breast_normal;cervical carcinoma cell line;chondrosarcoma;choriocarcinoma;cns;colon;colon_est;denis_drash;fetal eyes, lens, eye anterior segment, optic nerve, retina, retina foveal and macular, rpe and choroid;fibrosarcoma;germ cell;glioblastoma;glioblastoma with egfr amplification;heart;hepatocellular carcinoma, cell line;hippocampus, cell line;human skeletal muscle;hypernephroma, cell line;kidney;large cell carcinoma;large cell carcinoma, undifferentiated;leiomios;leiomyosarcoma;liver;lung;lung focal fibrosis;lymphoma, cell line;malignant melanoma, metastatic to lymph node;mammary adenocarcinoma, cell line;marrow;medulla;melanoma (mewo cell line);melanotic melanoma;melanotic melanoma, high mdr (cell line);metastatic chondrosarcoma;myeloid cells, 18 pooled cml cases, bcr/abl rearrangement positive, includes both chronic phase and myeloid blast crisis;nervous_tumor;normal epithelium;normal pigmented retinal epithelium;parathyroid;placenta;pool;pooled colon, kidney, stomach;primary lung cystic fibrosis epithelial cells;primary lung epithelial cells;prostate;retinoblastoma;rhabdomyosarcoma;skin;small cell carcinoma;squamous cell carcinoma, poorly differentiated (4 pooled tumors, including primary and metastatic);stomach;subchondral bone;testis, cell line;tonsil;uterus;whole embryo

Abb. 4.53 : Elektronischer Northernblot für das humane Homolog von SAP47.

Die in diesem letzten Abschnitt gewonnenen Erkenntnisse aus den Datenbanken werfen einige Fragen auf, die in der Diskussion besprochen werden. Das Vorkommen einer 551AS langen Spleißvariante von SAP47 sollte im Westernblot und in *Drosophilagehirnschnitten* überprüft werden. Kommt die neue Variante, wie aufgrund des elektronischen Northernblots zu vermuten, nur im Embryonalstadium vor, würde dies erklären, warum im Westernblot bisher nur eine einzige Bande bei 47kD zu sehen ist.

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung und Identifizierung des nc46 Antigens in Vertebraten

Auf Westernblots mit Gehirnhomogenaten verschiedener Spezies detektiert der SAP47-spezifische monoklonale Antikörper nc46 Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts. In den untersuchten Organismen nimmt die Größe des detektierten Proteins jeweils mit der Komplexität des Organismus zu: *Drosophila melanogaster* und *virilis* 47kD, *Xiphophorus maculatus* 52kD, *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* Doppelbanden von 78 und 83kD (ähnlich *Homo sapiens*; Reisch, 1994). In der ersten Fragestellung dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die vom Antikörper erkannte Doppelbande bei 78 und 83kD in Vertebraten den SAP47-Homologen entspricht. Aufgrund eines humanen EST-Klons mit 52-%iger Identität zu SAP47 im Bereich AS 250 bis AS 295 kam bereits 1997 von Reich der erste Hinweis auf die Existenz eines humanen Homologs von SAP47.

Marion Brunner leitete dann 1999 mit Hilfe anderer cDNA-Sequenzen die vorläufige Sequenz von 2059 bp für das humane Homolog ab. Die Funktion des aus dieser Sequenz abgeleiteten Polypeptids ist, wie die von SAP47 in *Drosophila*, unbekannt. Da keine weiteren Homologien zu anderen Proteinen in der Datenbank bestehen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei SAP47 und den dazu ähnlichen Proteinen um eine neue Proteinfamilie handelt.

Mit Hilfe des MAK nc46 sollte nun im Ratten- und Mausmodell Lokalisation und Identität des detektierten Proteins, welches entweder ein Vertebratenhomolog von SAP47 oder aber auch ein kreuzreagierendes anderes bekanntes oder unbekanntes Protein darstellen könnte, untersucht werden.

Dietmar Reisch konnte 1994 zeigen, dass SAP47 ein lösliches Protein ist, welches relativ homogen verteilt im Cytoplasma von Nervenendigungen von *Drosophila* vorkommt. Im Gegensatz dazu erkennt der MAK nc46 in Maus- und Rattengehirnen ein membrangebundenes Protein. In Vibratonschnitten durch Maus- und Rattengehirn zeigt der MAK nc46 eine vergleichbare Verteilung mit dem Synapsenprotein Synaptophysin. Daraus ergab sich ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei dem MAK nc46-Antigen in Vertebraten ebenfalls um ein synapsenassoziiertes Protein handeln könnte. Für die Identifizierung des Antigens kamen mehrere Vorgehensweisen in Frage. Der Screen einer Mausgehirn-cDNA-Expressionsbibliothek mit Hilfe des Antikörpers (Kreuzreaktionen mit nicht-synapsenassoziierten Proteinen: humanes Zinkfingerprotein (X78924), humanes Nuklearmatrixprotein 55 (U89867), transformierendes Protein TACC3 (AF093542),

Ornithindecaboxylase (D87914)) führte genau wie die N-terminale Anequenzierung des Proteins (mögliche Schutzgruppe, Menge zu gering) zu keinem Erfolg. Erst durch Immunpräzipitation mit Hilfe des Antikörpers konnte genügend Protein für eine massenspektrometrische Analyse gewonnen werden. Die obere Bande bei 83kD wurde als Maussynapsin I identifiziert. Die untere Bande bei 78kD enthielt zwei Proteine: Maussynapsin I und BiP (Binding Protein, Gr78, Glucose reguliertes Protein aus der HSP70-Familie).

Wenn als Ergebnis einer Immunpräzipitation über einen Antikörper mehrere Proteine aufgereinigt werden, so kann erstens eine Kreuzreaktion (siehe unten) des Antikörpers die Ursache sein. Zweitens besteht aber auch die Möglichkeit, dass über das eigentliche Antigen Bindungspartner desselben gleichzeitig mit aufgereinigt wurden (Co-Immunpräzipitation). Zum Ausschluss einer möglichen Interaktion von Synapsin und BiP wurden Expressionsklone für beide Proteine über das Ressourcenzentrum in Berlin bestellt. Der MAK nc46 erkannte sowohl Synapsin als auch BiP. Somit war klar, dass der MAK nc46 mit Vertebratensynapsinen bzw. mit BiP kreuzreagiert und nicht das Vertebratenhomolog von SAP47 erkennt.

Kreuzreaktionen dieser Art sind nicht selten. Da die Affinität eines Antikörpers zum Antigen von der Passgenauigkeit von Epitop und Paratop abhängt, kann die Affinität stark wechseln. Homologe Antigene besitzen die höchste Affinität, während kreuzreagierende Antigene (heterologe Antigene) geringere Affinität besitzen. Sie sind mit den Immunogenen nicht identisch sondern nur chemisch verwandt. Man spricht von Epi- und Paratopteilkomplementaritäten.

Das Epitop für den MAK nc46 in SAP47 ist bekannt: N-Terminus AS 2-11: FSGLT**NQFTS**, nur dieses Dekapeptid wird erkannt (Becker, 1997). Im Maussynapsin I findet sich keine auch nur annähernd ähnliche Sequenz, so dass eventuell von einem ähnlichen Konformationsepitop ausgegangen werden muss. Im Binding Protein hingegen befindet sich an Position 92 folgender Aminosäuresequenzabschnitt, der in vier der zehn Aminosäuren GDAAK**NQLTS** übereinstimmt.

Interessanterweise handelt es sich sowohl beim Maussynapsin I als auch beim Binding Protein um ATPasen. Die ATPase-Domäne von Synapsin wurde aufgrund einer Strukturähnlichkeit zu ATP utilisierenden Enzymen entdeckt (Esser et al., 1998). Sie befindet sich in der hochkonservierten C-Domäne, die ATP-Bindung ist Ca-abhängig.

Die ATP-Bindungsdomäne im Binding Protein ist nicht bekannt. Möglicherweise handelt es sich bei SAP47 ebenfalls um ein ATP utilisierendes Protein. Es gibt Hinweise auf

Ähnlichkeiten zu anderen ATPasen, doch dies ist noch nicht hinreichend untersucht worden. Im direkten Sequenzvergleich haben weder SAP47 noch Maussynapsin I Ähnlichkeiten zum Binding Protein. Genausowenig zeigten sich Ähnlichkeiten zwischen dem murinen SAP und Maussynapsin I, dem SAP47 und *Drosophila* Synapsin, dem humanen SAP und humanem Synapsin. Einzig der Vergleich von murinem Synapsin und SAP47 zeigte in der Alanin- und Serinreichen B-Domäne von Synapsin Ähnlichkeiten zu dem folgenden Sequenzabschnitt von SAP47:

```
Sap47 PAPTGDAPAAAPAASTSVEATASSAVDPEAAAA (AS 28-58)
synI  PPSAASPGATPGSATASAERASTAAPVASPAA (AS 33-63).
```

SAP47 und Synapsin zeigen in *Drosophilagehirnschnitten* eine identische Verteilung. Synapsin ist ein präsynaptisches vesikelassoziiertes Protein. SAP47 ist ebenfalls präsynaptisch lokalisiert, eine Vesikelassoziation ist in der Elektronenmikroskopie (Reisch, 1994) nicht eindeutig zu erkennen. Ob beide Proteine jedoch etwas miteinander zu tun haben könnten, ist völlig unklar. Das Binding Protein hingegen ist ein ER-residentes Protein, welches anderen Proteinen beim Falten behilflich ist. Mit der Präsynapse, wo weder ER oder Golgiapparat vorkommen, noch Translation nachgewiesen werden konnte, gibt es nach heutigem Wissensstand keinen Zusammenhang.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der MAK nc46 in Vertebraten mit anderen Proteinen kreuzreagiert, aber nicht das Vertebratenhomolog von SAP47 erkennt. Alle möglichen Interpretationen bezüglich Sequenz- oder Strukturähnlichkeiten der kreuzreagierenden Proteine sind reine Spekulationen. Aus diesem Grund war mit der Identifizierung der Antigene Synapsin und BiP die Eingangsfragestellung beantwortet und dieses Teilprojekt abgeschlossen.

5.2. Lokalisierung von HSAP in Vertebraten

Um HSAP in Vertebraten lokalisieren zu können wurden von Natalja Funk (Diplomarbeit, 2000) Antiseren und ein monoklonaler Antikörper gegen HSAP erzeugt. Die Antiseren aller immunisierten Mäuse detektierten nicht nur das Fusionsprotein, mit welchem sie immunisiert wurden, sondern drei der vier Seren erkannten ebenfalls eine Bande im Westernblot von Mausgehirnhomogenat auf der Höhe von 60kD. Obwohl HSAP schwach immunogen ist, war die Immunisierung erfolgreich. Die detektierte Bande bei 60kD fehlte nach Inkubation mit dem Kontrollserum einer nicht immunisierten Maus ebenso wie nach alleiniger Inkubation

mit dem 2. Antikörper. Ob es sich hierbei allerdings um ein echtes Signal für das humane SAP oder um eine Kreuzreaktion handelt, kann nicht sicher festgestellt werden.

Aus der Fusion von Milzzellen einer immunisierten Maus mit Hybridomazellen entstand ein immortalisierter B-Zellklon, welcher den Überstand 363 produzierte. Dieser Überstand 363 erkannte ebenfalls sowohl das Fusionsprotein als auch eine Bande von 60kD im Westernblot von Mausgehirnhomogenat.

Die Antiseren und der Überstand 363 wurden für die Immunhistochemie an Maus- und Rattengehirnen verwendet. Auf Vibratonschnitten frontal durch die Gehirne beider Spezies zeigten DAB-Färbungen an unterschiedlich fixierten Geweben immer das gleiche Bild. Es färbten sich Astrozyten (Nachweis durch Doppelimmunfluoreszenz mit dem Astrozytenmarker GFAP) in der Balkenregion und im Hippocampus sowie einzelne dopaminerge Neuronen im Cortex. In den Kontrollinkubationen mit dem Serum nicht immunisierter Tiere sowie alleiniger Inkubation mit dem 2. Antikörper blieben die Gehirne ungefärbt. Eine deutliche Abnahme der Färbung war nach Präinkubation mit dem Fusionsprotein zu beobachten.

Die Verwendung der beiden Spezies *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* sowie die Verwendung unterschiedlich fixierten Gewebes sprechen gegen eine unspezifische Reaktion. Hinzu kommt, dass die verschiedenen Antiseren (Blutentnahme nach Immunisierung) und der Überstand 363 (aus der Herstellung monoklonaler Antikörper) unterschiedlichen Ursprungs sind, aber beide zu einer Anfärbung von Astrozyten und einigen dopaminergen Neuronen führen.

Ob es sich bei dem ca. 60kD großen Protein in Astrozyten und dopaminergen Neuronen tatsächlich um das humane Homolog von SAP47 handelt, kann nicht sicher gesagt werden. Eine Kreuzreaktion mit einem anderen Protein ist nicht auszuschließen. Da der Hybridomaklon 363 die Antikörperproduktion einstellte, konnte die Frage nicht weiter verfolgt werden.

5.3. Überexpression von SAP47 und Rescue von black-pearl in Doppelmutanten

Wie bereits 1993 von Brand und Perrimon beschrieben ist das Gal4-UAS-System hervorragend geeignet, ein kloniertes Gen gewebespezifisch zu exprimieren. Ein Promoter bzw. Enhancer bewirkt die gewebespezifische Expression des Hefetranskriptionsfaktors Gal4, welcher wiederum ein Zielgen aktiviert. Das Gal4-Protein hingegen startet die Transkription nur jener Gene, welche eine Gal4-Bindungsstelle (UAS = upstream activation sequence)

besitzen. Das Hauptmerkmal des Gal4-UAS-Systems ist folgendes: Gal4-Gen und UAS-Zielgen sind zunächst in zwei unterschiedlichen transgenen Linien getrennt. In der Gal4-Linie ist zwar das Aktivatorprotein gewebespezifisch vorhanden, aber dieses ist nicht in der Lage, das Zielgen zu aktivieren. In der UAS-Zielgenlinie ist das Zielgen nicht aktiviert, da der Aktivator fehlt. Erst nach dem Verkreuzen beider Linien kann der Aktivator Gal4 an seine Erkennungssequenz UAS binden und das Zielgen aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gal4-UAS-System auf zweifache Weise genutzt.

5.3.1. Überexpression von SAP47

Für die Überexpression von SAP47 wurde die Erkennungssequenz UAS in einer Linie gleich fünfmal vor die Sap47-cDNA kloniert. Mit dem Promoter elav wurde Gal4 in der anderen Linie neuronenspezifisch exprimiert. Auf diese Weise kann nach Verkreuzen beider Linien zusätzlich zur wildtypischen Expression des Sap47-Gens eine neuronenspezifische Überexpression erzielt werden.

Eine neuronenspezifische Überexpression war deshalb von Interesse, da es in vorausgegangenen Mutagenesen (Becker, 1997) nicht gelungen war, eine Nullmutante für Sap47 zu erzeugen. Somit war die Funktion von Sap47 nach wie vor völlig ungeklärt. Die Überexpression eines wichtigen Gens könnte ebenso wie das Fehlen des Gens zu einem veränderten Phänotyp führen.

Nach erfolgreicher Keimbahntransformation des Konstruktes 5xUAS-Sap47cDNA (11 Transformanten) wurde dieses zunächst ausgetestet. Mit Hilfe der Linie Rhodopsin-Gal4, welche Gal4 lediglich in den Photorezeptoren R1-R6 exprimiert, sollte Sap47, das normalerweise in den Augen nicht sichtbar ist, dort ektop exprimiert werden. Dieser Nachweis gelang, und es schloss sich die neuronenspezifische Überexpression mittels elav-Gal4 an. Auch die Überexpression von Sap47 konnte sowohl im Westernblot als auch in der Immunhistochemie gezeigt werden.

Diese Sap47-überexprimierenden transgenen Fliegen entwickelten sich völlig normal und zeigten weder makroskopisch noch mikroskopisch noch in den durchgeführten einfachen Verhaltenstests irgendwelche Auffälligkeiten. Einzig die Ergebnisse der Elektrophysiologie, durchgeführt von Christian Leibold in der Arbeitsgruppe, stehen noch aus.

Das Fehlen eines veränderten Phänotyps bei Überexpression eines Gens mit verbundener Mehrsynthese des Proteins, in diesem Fall SAP47, kann mehrere Ursachen haben. Erstens, die Menge an SAP47 kann für seine Funktion unwichtig sein, so dass eine Überexpression weder

schädlich noch nützlich ist. Zweitens, die Funktion von SAP47 wird spezifisch reguliert, so dass eine Überexpression sofort durch Mechanismen unbekannter Art kompensiert wird.

5.3.2. Rescue von black-pearl (blp) in Doppelmutanten

Die von Sonja Becker durchgeführten Mutagenesen (Becker, 1997), (-Strahlenmutagenese, P-Element-Jump-out-Mutagenese und EMS-Mutagenese, führten lediglich zu blp-Mutanten und zu einer Doppelmutante der beiden Gene Sap47 und blp. Eine isolierte Mutation für ausschließlich Sap47 konnte nicht erzielt werden. Dieser Befund lässt sich mit der Betrachtung des genomischen Locus erklären. Das Gen für black-pearl befindet sich nur 200 bp vor dem Gen für SAP47.

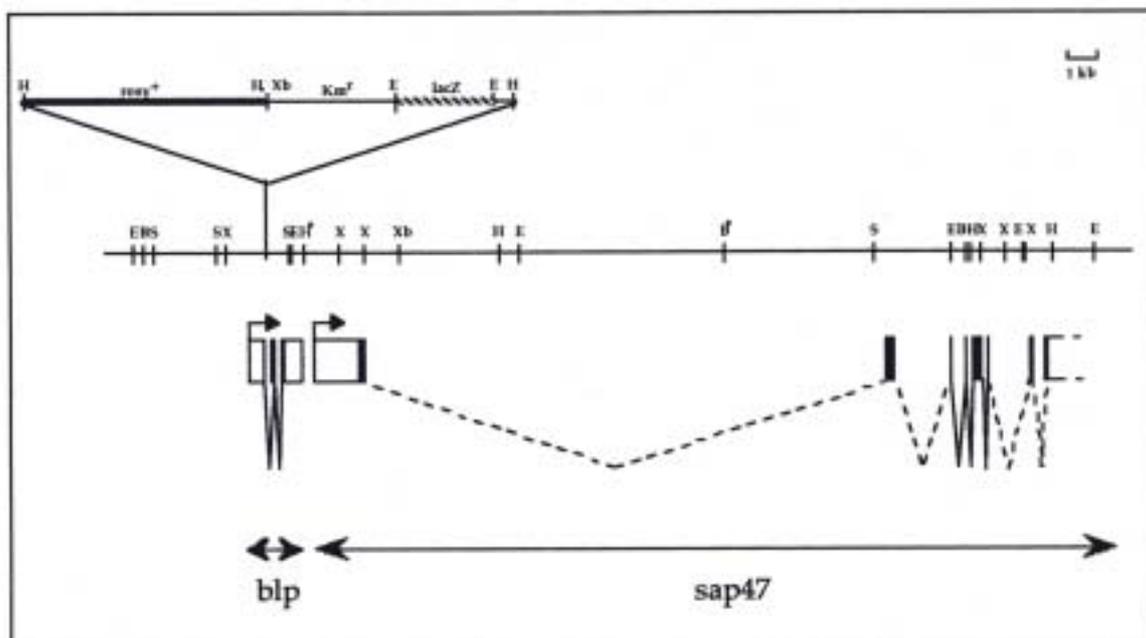


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des black-pearl und Sap47 Genomlocus nach den bisher zur Verfügung stehenden Daten. Das Dreieck stellt ein innerhalb des black-pearl Gens inserierendes PZ-Element dar. Darunter ist die Exon/Intron-Organisation der beiden Gene black-pearl und Sap47 dargestellt, wobei die horizontalen Balken Exons symbolisieren. Translatierte Bereiche sind schwarz markiert. Die Pfeile oberhalb des jeweiligen ersten Exons weisen auf einen möglichen Transkriptionsstartpunkt hin (aus Becker, 1997).

In der einzigen Mutante, in der das erste Exon des Sap47-Gens deletiert werden konnte, war blp, welches zu einem im ersten Larvenstadium rezessiv letalen Phänotyp führt, mitbetroffen. Somit überdeckte der Phänotyp des Fehlens von black-pearl jeden möglichen Phänotyp von SAP47 in Entwicklungsstadien jenseits der ersten Larve. Da es unklar war, ob auch Sap47 letal mutierbar ist oder ob und in welcher Form es zur Letalität beiträgt, versuchte Sonja Becker mithilfe von Rescue-Vektoren (diese trugen verschieden große Fragmente des Genoms), die Funktion von black-pearl zu retten. Das Ziel, auf diese Weise den Sap47-Phänotyp zu isolieren, misslang, obwohl ein genomischer Bereich von bis zu 15kb, der das blp-Gen enthielt, transformiert wurde.

In dieser Arbeit wurde nun versucht, durch das Gal4-UAS-System die Funktion von black-pearl wiederherzustellen. Dafür wurde die blp-cDNA hinter die Erkennungssequenz UAS kloniert und erfolgreich in Fliegenembryonen injiziert (3 Transformanten). Durch die beiden Linien Aktin-Gal4 und Hitzeschock-Gal4 sollte blp einmal von Anfang an ubiquitär in den Doppelmutanten und einmal hitzeinduziert exprimiert werden. Auch dieser Versuch, black-pearl in den Doppelmutanten für blp und Sap47 zu retten, misslang.

Die Gründe für den Misserfolg können sehr komplex sein. Es ist nach wie vor unklar, wie sich die Deletion in der Doppelmutante für Sap47 und blp auswirkt. In der verwendeten Doppelmutante ist außer kodierenden Bereichen von blp das erste Exon von Sap47 deletiert. In homozygoten ersten Larven ist keine SAP47-Immunfärbung im Neuropil des Nervensystems mehr nachweisbar. Damit bestand die Hoffnung, mit der Rettung von black-pearl durch die komplette cDNA den isolierten Null-Phänotyp von Sap47 sichtbar machen zu können. Da black-pearl offensichtlich eine große Rolle während der Entwicklung spielt, könnte man sich eine strenge Regulierung dieses Proteins gut vorstellen. Die Verwendung einer cDNA birgt zum einen die Gefahr, dass möglicherweise unterschiedliche Funktionen verschiedener Genprodukte, die zum Beispiel durch alternatives Spleißen entstehen, nicht erfüllt werden können. Zum anderen können durch die Wahl des Hitzeschock- und des Aktinpromotors auch Zellen, welche normalerweise kein blp exprimieren, das Protein synthetisieren. Black-pearl könnte sich in diesen Zellen störend oder sogar toxisch auswirken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach den vergeblichen Versuchen von Sonja Becker, black-pearl über verschieden große Rescue-Vektoren mit Anteilen des Genoms zu retten, auch die Expression der kompletten cDNA von black-pearl nicht zu einem Rescue-Erfolg führte.

Als eine mögliche Strategie bleibt nun noch das sogenannte gene targeting, die gezielte Mutagenese von Sap47. Diese Form der Mutagenese wird von Natalja Funk im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt. Die Ergebnisse stehen noch aus.

Auch die Überexpression von SAP47 in den Neuronen des *Drosophilagehirns* zeigte keinen veränderten Phänotyp, weshalb die Funktion von SAP47 nach wie vor ungeklärt bleibt.

5.4. Co-Immunpräzipitation von SAP47

Eine weitere Möglichkeit, Hinweise auf die Funktion eines Proteins zu bekommen, ist die Identifizierung eines Interaktionspartners. Angenommen, der Wirkungsbereich und die Funktion des Interaktionspartners wären bekannt, dann könnte auch über die Funktion von SAP47 spekuliert werden. Für die Identifizierung eines Interaktionspartners gibt es insbesondere zwei hervorzuhebende Strategien. Das Hefe-Zwei-Hybridsystem wird von Natalja Funk im Rahmen ihrer Dissertation für SAP47 durchgeführt und dort beschrieben. Bei der anderen Strategie handelt es sich um die Co-Immunpräzipitation. Im Vergleich zum Hefe-Zwei-Hybridsystem, das, wie der Name bereits aussagt, Interaktionen zwischen Proteinen in Hefezellen aufdecken kann, stellt die Co-Immunpräzipitation eine Methode dar, die näher an in-vivo-Bedingungen herankommt. Ein mit Proteinase-Inhibitoren behandeltes Gewebehomogenat wird bei einem physiologischen pH mit einem spezifischen Antikörper inkubiert, um sowohl das Antigen, als auch möglicherweise gebundene Interaktionspartner aufzureinigen. Auch bei der Co-Immunpräzipitation können die verschiedensten Probleme auftreten. Wie bereits weiter oben ausgeführt, kann der Antikörper mit anderen Proteinen kreuzreagieren und somit zu einer Isolierung von Proteinen führen, die keine Interaktionspartners des interessierenden Proteins sind. Dies ist im vorliegenden Fall zumindest für den MAK nc46 unwahrscheinlich, da dieser Antikörper im Westernblot von *Drosophilagehirnhomogenat* ganz spezifisch ein Protein bei 47kD erkennt, nämlich SAP47. Desweiteren könnten andere Proteine unspezifisch an Protein A oder G binden und anschließend bei dem Elutionsschritt mit Natriumcitrat bei pH 2 mit aufgereinigt worden sein. Dies konnte insofern weitgehend ausgeschlossen werden, da bei Inkubation des Gewebehomogenats mit Protein A oder G ohne den Antikörper nach den durchgeführten Waschschritten deutlich weniger Protein im Eluat zu finden war. Derartige Spuren blieben in der Coomassie-Färbung nahezu leer.

Eine weitere Voraussetzung für das Gelingen der Präzipitation ist die Löslichkeit des Antigens in physiologischen Puffern. Für die Verlöslichung von in physiologischen Puffern

unlöslichen Antigenen (Membranproteine, Lipoproteine) werden vor allem hochmolekulare Salze (z.B. Guanidium-HCl), Harnstoff und/oder Detergenzien eingesetzt. Diese Substanzen können sowohl die Bindung des Antigens an den Antikörper als auch spätere massenspektrometrische Analysen empfindlich stören. Da es sich bei SAP47 um ein cytosolisches, demnach bereits lösliches, Protein handelt, sollte auch dieser Punkt dem Gelingen der Präzipitation nicht im Wege stehen.

In der mit Protein G Sepharose durchgeführten Immunpräzipitation mit dem MAK nc46 konnte SAP47 demnach ausreichend angereichert werden.

Im Coomassie-Gel waren einige weitere Banden zu erkennen. Bei jeder Immunpräzipitation finden sich außer dem spezifischen Antigen auch die leichten und schweren Ketten des Antikörpers im Eluat. Von Interesse sind jene Banden, die weder dem spezifischen Antigen noch dem Antikörper zugeordnet werden können.

Da in der Arbeitsgruppe hauptsächlich Antikörper gegen Synapsenproteine von *Drosophila* zur Verfügung stehen, sollten diese Antikörper zunächst im Westernblot ausgetestet werden. Zum Einsatz kamen Antikörper gegen das Cystein-String-Protein, gegen Synapsin, gegen Synaptophysin und Synaptotagmin, allesamt Proteine der synaptischen Vesikel oder welche mit synaptischen Vesikeln assoziieren (siehe Einleitung). Keiner der verwendeten Antikörper zeigte ein Signal im Westernblot.

Ein weiterer verwendeter Antikörper war der MAK nc82 aus der Bibliothek von Alois Hofbauer (1991). Das Antigen dieses Antikörpers ist unbekannt. Im Westernblot erkennt der Antikörper eine Doppelbande auf Höhe von 190kD (Dürrbeck, 2002). In der Elektronenmikroskopie färben sich die aktiven Zonen (T-Bars) der Photorezeptoren (persönliche Mitteilung von Meinertzhagen, 2002).

In einem Westernblot der oben durchgeführten Immunpräzipitation, welcher mit dem MAK nc82 angefärbt wurde, fand sich ebenfalls eine Doppelbande bei 190kD. Dass es sich hierbei tatsächlich um das nc82-Antigen handeln könnte, konnte in den nachfolgenden Immunpräzipitationen leider nicht bestätigt werden.

Als Erklärungsmöglichkeiten kommen in Frage, dass erstens das nc82-Antigen extrem empfindlich zu sein scheint. Hier steht vor allem die Temperaturabhängigkeit im Vordergrund. Werden die Fliegengehirne nicht sofort auf Eis homogenisiert und weiterbehandelt, ist das nc82-Antigen nicht mehr nachzuweisen. Ein Schritt der Immunpräzipitation, der bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt wird, könnte ebenfalls ein Problem darstellen. Da sich die Immunpräzipitation insgesamt über zwei Tage erstreckte, könnte im Verlauf das nc82-Antigen verloren gegangen sein.

Zweitens handelt es sich beim nc82-Antigen um ein membrangebundenes Protein (Dürrbeck, 2002). Dies führt zu den oben beschriebenen Problemen bei der Verlöslichung des Proteins. Sämtliche verwendeten Detergenzien können sowohl die Bindung des Antikörpers als auch die möglicher Interaktionspartner empfindlich stören.

Angenommen, das nc82-Antigen bindet nur vorübergehend oder unter ganz definierten Bedingungen an einen Interaktionspartner, kann es unter diesen Umständen fast unmöglich werden, eine Interaktion, in diesem Fall wie vermutet mit SAP47, nachzuweisen.

Ein weiterer interessanter Punkt wäre die Identifizierung des nc82-Antigens über die Präzipitation mit dem MAK nc82 gewesen. Da gezeigt werden konnte, dass das nc82-Antigen sich zwar über den MAK nc82 aufreinigen lässt, hätte sich eine unmittelbare massenspektrometrische Analyse, wie im Fall des MAK nc46-Antigens in Vertebraten beschrieben, anschließen können. Aufgrund der Empfindlichkeit des nc82-Antigens waren die aufgereinigten Mengen jedoch so gering, dass sie für eine Identifizierung des Proteins nicht ausreichten.

5.5. Neue Domäne

Durch den öffentlichen Zugang zu den ständig anwachsenden Sequenzdatenbanken bietet die Bioinformatik vielfältige Möglichkeiten für Sequenzvergleiche, Homologiesuchen Strukturvorhersagen und vieles mehr. Die meist gestellte Frage ist nach wie vor: Welche Sequenzen in der Datenbank haben die größte Ähnlichkeit zu meiner nicht charakterisierten Sequenz?

Über Datenbanksuchen wurden auch die Homologen von SAP47 von *C. elegans* bis *Homo sapiens* gefunden. Es handelt sich zweifelsfrei um eine neue Proteinfamilie mit unbekannter Funktion. Es wurde darüber hinaus jedoch auch versucht, über Ähnlichkeiten von einzelnen Domänen zu bereits charakterisierten Proteinen Hinweise auf die Funktion von SAP47 zu bekommen. Mit den üblicherweise verwendeten heuristischen Suchmaschinen BLAST und FASTA (extreme Schnelligkeit geht auf Kosten der Genauigkeit) konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Auch die Suche nach bekannten Domänen, Blöcken oder Fingerabdrücken innerhalb der Sequenz von SAP47 blieb erfolglos. Erst die Verwendung einer anderen statistischen Methode, dem sogenannten Hidden Markov Modell, führte zum Auffinden von Sequenzähnlichkeiten mit Arabidopsis- und Hefeproteinen. Der Vorteil von Suchen mit Hidden Markov Modellen gegenüber BLAST und FASTA besteht darin, dass die

Datenbanksuche nicht mit einer einzigen Sequenz durchgeführt wird, sondern mit einem multiplen Sequenzalignment verwandter Proteine.

In Zusammenarbeit mit Tobias Doerks und Peer Bork (TIBS, April 2002) wurde eine neue Domäne mit dem Namen BSD-Domäne identifiziert. Der Name dieser Domäne setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der die Domäne enthaltenden besser charakterisierten Proteine zusammen: BSD (**B**TTF2-like Transkriptionsfaktoren, **S**ynapsen-assoziierte Proteine, **D**OS-like Proteine). Insgesamt besteht die Domäne aus ca. 60 Aminosäuren, die sich laut Strukturvorhersage wahrscheinlich in ein Drei-Helix-Bündel falten. Innerhalb der dritten vorhergesagten Helix kommt der auffälligste Sequenzabschnitt der Domäne, benachbarte Phenylalanin- und Tryptophanreste, vor. Diese selten auftretenden Aminosäuren sind in allen BSD-Domänen unverändert an der gleichen Stelle zu finden. Da die Domäne sowohl in Protozoen als auch im Menschen vorkommt, kann eine wichtige konservierte Funktion angenommen werden.

Obwohl die BSD-Domäne in den verschiedensten Proteinfamilien auftritt (synapsen-assoziierte Proteine, hypothetische Proteine und Transkriptionsfaktoren), lässt das Vorkommen vor allem in Transkriptionsfaktoren eine Chromatin-assoziierte Funktion vermuten. Die Domänenarchitektur anderer die BSD-Domäne enthaltenden Proteine machen eine Chromatin-assoziierte Funktion nicht unwahrscheinlich, könnten aber auch Hinweise auf andere vorstellbare Funktionen geben. Das ist zum einen das Auftreten einer BSD-Domäne neben einer U-Box, die bekannterweise bei der Ubiquitinierung eine Rolle spielt. Zum anderen kann die BSD-Domäne einer BTB-Domäne vorausgehen. BTB-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die häufig in Transkriptionsfaktoren vorkommen und von Zinkfinger-DNA-Bindungsdomänen gefolgt werden. Diese Beobachtungen könnten allgemein für eine Rolle der BSD-Domäne in der DNA-Bindung sprechen.

Es stellt sich nun die Frage, was synapsenassoziierte Proteine mit DNA-Bindung zu tun haben könnten. Zunächst lässt sich bei genauem Hinsehen der Immunocytochemie mit dem MAK nc46 von *Drosophilagehirnschnitten* in ca. 10% der Fälle eine Kernfärbung beobachten. Dies ist in der folgenden Abbildung (Abb. 5.2) deutlich zu erkennen.



Abb. 5.2: Gehirnschnitt angefärbt mit dem MAK nc46, Verdünnung 1:100. Oberhalb der Pfeilspitze sind einige Kerne angefärbt.

Es wäre durchaus denkbar, dass SAP47 zwar nicht immer aber unter ganz bestimmten, noch unbekanntem Bedingungen im Kern zu finden ist. Es könnte, wie bereits für andere Synapsenproteine (FMRP = fragiles X-Protein, Yin und Warren, 2000) beschrieben, als Shuttle zwischen Synapse und Kern fungieren. Da es auf präsynaptischer Seite nach heutigem Wissensstand keine Translation vor Ort gibt, wie dies für die postsynaptische Seite gezeigt wurde (siehe Übersicht, Stewart und Schuman, 2001), ist die Frage nach wie vor ungeklärt, wie die Präsynapse auf unterschiedliche Anforderungen reagiert. Man könnte sich gut vorstellen, dass Proteine an der Synapse bei höheren Anforderungen, zum Beispiel für die Bereitstellung mehrerer aktiver Zonen, in den Kern transportiert werden und dort möglicherweise sogar als Transkriptionsfaktoren die Synthese und den Nachschub anderer Synapsenproteine bewirken. Für das Synapsenprotein Huntingtin wurde bereits eine Rolle als Transkriptionsfaktor im Kern beschrieben (Li et al., 2002).

Ein Blick in die genomische Region von Sap47 ist in der Abbildung (Abb. 5.3) auf der nächsten Seite dargestellt und ergibt ein interessantes Bild.

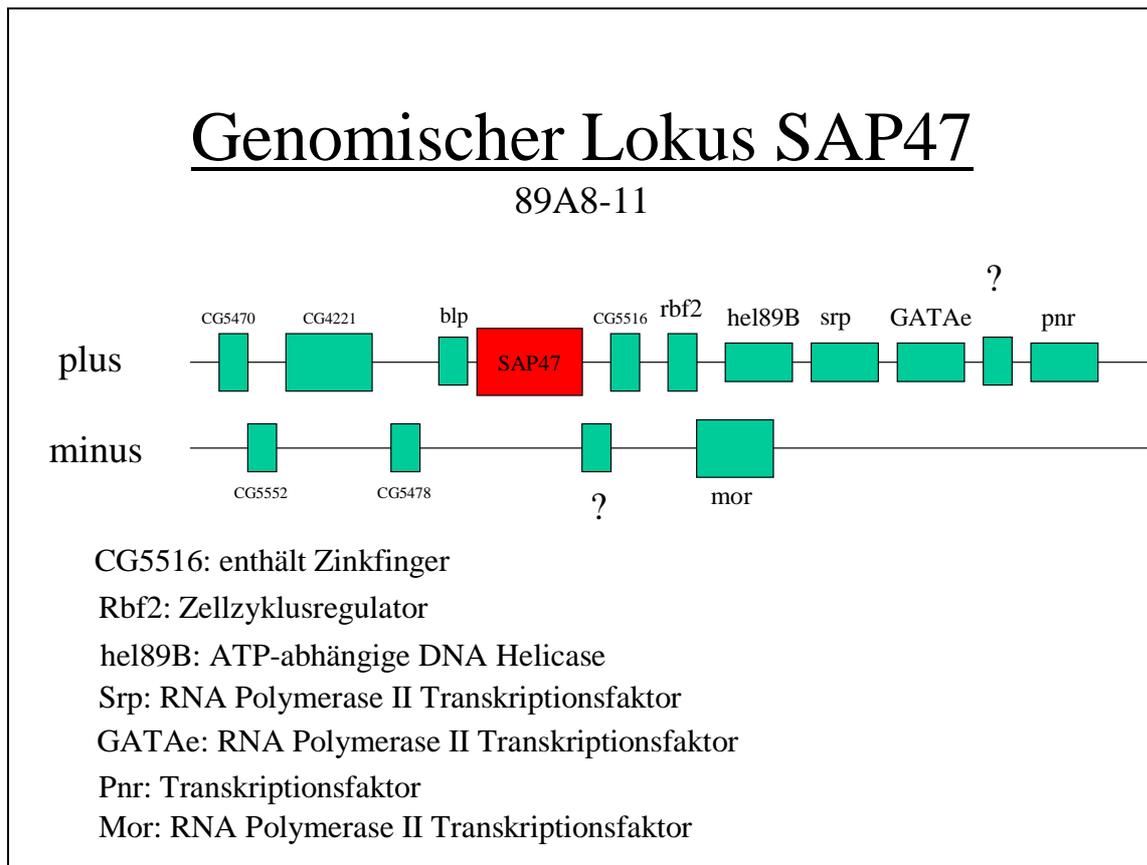


Abb. 5.3: Genomischer Locus von Sap47.

Das Gen für SAP47 befindet sich offensichtlich in einem Cluster von DNA-bindenden Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren.

Es bleibt nun experimentell zu klären, ob die Vermutung, dass es sich bei SAP47 tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, bestätigt werden kann.

Bis jetzt noch nicht besprochen wurde die Tatsache, dass zur Familie der synapsenassoziierten Proteine offensichtlich Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Leishmanien* und *Plasmodien* dazugehören. Da in keiner der drei Spezies von einer Synapsenassoziation gesprochen werden kann, stellt sich die Frage, ob der Name „synapsenassoziierte Proteine“ für die Beschreibung aller Familienmitglieder weiterhin gerechtfertigt ist. In *Drosophila* scheint SAP47 nicht, wie bisher vermutet (siehe unten), gehirnspezifisch zu sein, in Vertebraten ist es offenbar ubiquitär, wie durch eine Northern-Analyse (s. S.8, Brose, 1999) und die Präsenz zahlreicher EST-Klone in den cDNA-Bibliotheken verschiedenster Gewebe gezeigt werden konnte. Handelte es sich bei SAP47 und Homologen tatsächlich um Transkriptionsfaktoren, wären auch die Homologien zu Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, *Leishmanien* und *Plasmodien* leicht mit einzubeziehen.

5.6. Neues von SAP47

Bei einer Datenbanksuche nach neuen EST-Klonen für SAP47 fand sich einer neuer Klon (Accessionnummer Q960T2) mit einem offenen Leseraster für 551 Aminosäuren. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur zwei Spleißvarianten für SAP47 bekannt (Reichmuth et al., 1995): 347 Aminosäuren (Q24502) und 351 Aminosäuren (Q24503). In dem multiplen Alignment auf Seite 64 sind die Unterschiede zwischen den drei Spleißvarianten zu sehen. Die ersten 345 Aminosäuren sind fast identisch, bis auf Position 72-88 (RLPKSASLVDSLSEA), die ausschließlich im längsten offenen Leseraster vorkommen und einem zusätzlichen Exon entsprechen, und an Position 179 fehlt in Q24502 und Q24503 folgender Sequenzabschnitt: QGKGDEV. In letztgenanntem Fall werden alternative Exon/Introngrenzen verwendet. Eine BLAST-Suche mit den beiden zusätzlichen Sequenzabschnitten des längsten offenen Leserasters ergab keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen in den Datenbanken SwissProt und TrEMBL. Außer den oben bereits erwähnten Unterschieden zeichnet sich das längste offene Leseraster von SAP47 durch einen zusätzlichen, 200 Aminosäure langen C-Terminus aus. Gerade dieser C-Terminus zeigt erstaunliche Ähnlichkeiten zu den C-Termini der Vertebraten-SAPs (s. Abb. 4.51). Besonders zu beachten ist hierbei der Bereich von Aminosäure 478-495. Dieser Bereich beginnt mit einem konservierten Tryptophan, dann folgt die basische Aminosäure Lysin zwischen zwei sauren Aminosäuren, sowie ein konserviertes Tyrosin an Position 489, ebenfalls zwischen zwei sauren Aminosäuren. Die Bedeutung dieses hochkonservierten Bereiches ist unklar. Unklar ist außerdem das Ergebnis von Westernblots adulter Fliegenköpfe. Der monoklonale Antikörper nc46, der zur Identifizierung der kurzen Isoformen von SAP47 führte, erkennt das Epitop FSGLTNQFTS (Becker, 1997). Dieses Epitop befindet sich am N-Terminus aller drei SAP47-Isoformen. Auf Westernblots adulter Fliegenköpfe ist ein einziges Signal bei 47kD zu erkennen. Dieses Signal entspricht lediglich den beiden kurzen Spleißvarianten. Das längste offene Leseraster von SAP47 ist wahrscheinlich ca. 80kD groß (Natalja Funk, persönliche Mitteilung). Aufgrund von EST-Klonen lässt sich vermuten, dass das lange offene Leseraster nur in Fliegenembryonen vorkommt. Für die kurzen Isoformen von SAP47 gibt es EST-Klone aus Gehirn, Ovar und Hoden adulter Fliegen, sowie embryonaler, larvaler und puppaler Entwicklungsstadien. Mit Hilfe von Westernblots der verschiedenen Entwicklungsstadien sowie an Gefrierschnitten verschiedener Gewebe sollte die oben genannte Vermutung experimentell bestätigt werden.

6. Perspektiven

Um Hinweise über die Funktion eines neu identifizierten Proteins in *Drosophila* zu bekommen steht an erster Stelle das Erzeugen einer Nullmutante für dieses Protein. Da weder, wie von Sonja Becker (1997) gezeigt, EMS-Mutagenese, (-Strahlenmutagenese und Jump-out-Mutagenesen, noch wie in dieser Arbeit gezeigt, Rescue von black-pearl in Doppelmutanten gelang und auch die Überexpression des Proteins keinen offensichtlich veränderten Phänotyp ergab, bleiben nicht mehr viele Möglichkeiten offen. Die gezielte Mutagenese (gene targeting) einerseits und die Inhibierung des Proteins durch RNAi andererseits werden von Natalja Funk im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.

Parallel zu der in dieser Arbeit beschriebenen Co-Immunpräzipitation für SAP47 wurde von Natalja Funk ein Hefe-Zwei-Hybrid-System zum Auffinden von Interaktionspartnern angewendet. Damit sind auch die Möglichkeiten für Hinweise auf die Funktion von SAP47 über andere an SAP47-bindende Proteine ausgeschöpft.

Die Beschreibung einer neuen Domäne (BSD), welche in allen SAP47-Homologen auftritt, führte zu dem ersten Hinweis, dass SAP47 an Chromatin-assoziierten Prozessen beteiligt sein könnte. Demnach sind folgende Fragen offen: Unter welchen Bedingungen ist SAP47 oder möglicherweise nur ein Teil von SAP47 im Kern aktiv, zu welchem Zeitpunkt findet diese Aktivität statt, Entwicklung oder adulte Fliege? Wie wird SAP47 in den Kern und gegebenenfalls wieder zurück in die Synapse transportiert?

Die Kopplung von GFP (grünes fluoreszierendes Protein) an SAP47 könnte an der lebenden Larve ermöglichen, den Weg von SAP47 mitzuverfolgen.

Bindungsstudien von SAP47 an Riesenchromosomen oder an DNA könnten den Verdacht einer Chromatinassoziiierung erhärten.

Die Klärung der Frage, wann und wo die kurzen bzw. die lange Spleißvariante(n) von SAP47 auftreten, mithilfe von Westernblot, Entwicklungsstudien und Schnitten durch die verschiedenen Gewebe von *Drosophila*, könnte weitere Hinweise liefern.

7. Zusammenfassung

Synapsen als Kontaktstellen zwischen den Neuronen im Nervensystem repräsentieren das strukturelle und funktionelle Substrat für Abstraktionsleistungen sowie Lernen und Gedächtnis. Die Aufklärung der Funktion der einzelnen Komponenten der Synapsen ist daher von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Gehirnfunktion und seiner krankhaften Störungen.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem synapsen-assoziierten Protein SAP47 aus *Drosophila melanogaster*. Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Zuordnung von SAP47 und seinen Homologen in Säugern zu einer Proteinfamilie, zu der auch Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Leishmania major* und *Plasmodium falciparum* gehören. Grundlage hierfür war die Identifikation und Beschreibung einer in allen Familienmitgliedern vorkommenden hochkonservierten neuen Domäne (BSD). Diese Domäne ist ca. 60 Aminosäuren lang und faltet sich höchstwahrscheinlich in drei ∇ -Helices. Ihr Vorkommen in Transkriptionsfaktoren weist auf eine mögliche Chromatinassoziiierung von SAP47 und seinen Homologen hin. Die potentielle Chromatinassoziiierung, möglicherweise sogar als Transkriptionsfaktor, ist der erste Hinweis auf eine Funktion von SAP47 in *Drosophila*.

Die Erzeugung einer isolierten Nullmutante für das Sap47-Gen über die Rettung von black-pearl (blp) durch ubiquitäre Expression der blp-cDNA unter der Kontrolle eines Aktin- oder Hitzeschockpromoters in Doppelmutanten für Sap47 und black-pearl führte nicht zum Erfolg. Dagegen gelang die Herstellung von Fliegen mit neuronenspezifischer Überexpression von SAP47. Überraschenderweise zeigen diese Fliegen keinen offensichtlich veränderten Phänotyp.

Im nächsten Schritt wurde eine Co-Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper nc46, welcher zur Identifikation von SAP47 geführt hatte, auf der Suche nach Interaktionspartnern für SAP47 durchgeführt. Vorversuche ergaben einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion mit dem noch unbekanntem MAK nc82-Antigen (190kD, Protein der aktiven Zone). Dieser Hinweis konnte aber durch eine Co-Immunpräzipitation mit dem MAK nc82, hierbei hätte SAP47 aufgereinigt werden müssen, nicht bestätigt werden.

Der monoklonale Antikörper nc46, welcher in *Drosophila melanogaster* spezifisch SAP47 erkennt, detektiert im Westernblot von Vertebratengehirnhomogenat eine Doppelbande. Zur Klärung der Frage, ob es sich hier um das humane Homolog von SAP47 handelt, wurden die Proteine dieser Doppelbande durch Immunoaffinitätschromatographie gereinigt und

massenspektrometrisch identifiziert. Dadurch wurde gezeigt, dass der nc46 Antikörper in Maus, Ratte und Mensch kein SAP47-Homolog erkennt, sondern mit Synapsin I und BiP (Binding Protein aus der hsp70-Familie) kreuzreagiert.

Ein von Natalja Funk erzeugter und zur Verfügung gestellter Antikörper gegen das humane Homolog von SAP47 erkennt in immunhistochemischen Präparaten von Maus- und Rattengehirn Astrozyten des Corpus callosum sowie dopaminerge Neuronen. Ob es sich hierbei tatsächlich um das humane Homolog von SAP47 oder wiederum um eine Kreuzreaktion handelt, kann trotz der durchgeführten Kontrollexperimente nicht mit Sicherheit gesagt werden.

7. Summary

Synapses as contacts between neurons in the nervous system represent the structural and functional substrate for learning and memory. It is therefore of central interest to elucidate the function of single synapse components in order to understand the underlying mechanisms of brain function and its related disorders.

Here the synapse-associated protein SAP47 of *Drosophila melanogaster* was investigated. The most important result is the classification of SAP47 and its homologues into one protein family. This family consists not only of vertebrate homologues but includes also proteins from *Arabidopsis thaliana*, *Leishmania major* and *Plasmodium falciparum*. This classification was made possible by identification of a highly conserved domain (BSD) which occurs in all family members. The domain is about 60 amino-acids long and is characterized by three predicted α helices which probably form a three-helical bundle. The presence of this domain not only in synapse-associated proteins but also in basal transcription factors suggests a role in chromatin-associated processes. This is the first hint towards a possible function of SAP47.

The creation of an isolated null mutant for the SAP47 gene by rescuing black-pearl (blp) in double mutants for Sap47 and black-pearl was not successful. In contrast the neuronal overexpression of the SAP47 protein succeeded but surprisingly these flies do not show an obviously different phenotype.

The monoclonal antibody nc46 which is specific for SAP47 in *Drosophila* crossreacts with Synapsin I and BiP (Binding protein) in mouse, rat and human. Therefore, this antibody does not detect the vertebrate homologues of SAP47. To find this out the vertebrate proteins were purified by immunoaffinity chromatography and afterwards identified by mass spectrometry.

A monoclonal antibody against the human homologue of SAP47 which was provided by Natalja Funk detects astrocytes of the corpus callosum and dopaminergic neurons in rat brain. Despite all control experiments it is not sure if the antibody really detects the human homologue of SAP47 or if it is just another cross reaction.

8. Literaturverzeichnis

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-4010.

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

Ashburner, M. (1989). "*Drosophila* – a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Press, New York.

Augustine, G. J., M. E. Burns, et al. (1999). "Proteins involved in synaptic vesicle trafficking." J Physiol 520 Pt 1: 33-41.

Bajjalieh, S. M. (1999). "Synaptic vesicle docking and fusion." Curr Opin Neurobiol 9(3): 321-8.

Bajjalieh, S. (2001). "SNAREs take the stage: a prime time to trigger neurotransmitter secretion." Trends Neurosci 24(12): 678-80.

Becker, S. (1993). Charakterisierung des Gens für ein neues synapsen-assoziiertes Protein von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Becker S. (1997). sap47 und black-pearl. Molekulare Charakterisierung und Mutagenisierung zweier hochkonservierter Genloci von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Würzburg.

Becker S., Huber S., Brunner, M., Sauer, Ch., Weber, H.F., Bernhard, Köhler, M., Schmid, M., Rein, K., Brose, N., Schmidt, A., Lesch, K.-P., Rump, A., Rosenthal, A., Buchner, E. (1999). Characterization of HSAP und HBLP, human members of two novel conserved protein families identified in *Drosophila*. Abstract for the meeting "German Human Genom Project – Implications, Progress and the future".

Benfenati, F., M. Bahler, et al. (1989). "Interactions of synapsin I with small synaptic vesicles: distinct sites in synapsin I bind to vesicle phospholipids and vesicle proteins." J Cell Biol 108(5): 1863-72.

Benz, M. (1991). Charakterisierung von gehirnspezifischen cDNAs von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7(6): 1513-23.

Brand, A.H., Perrimon, N. (1993). Development 118, 401-415.

Broadie, K. S. und M. Bate (1993). "Development of larval muscle properties in the embryonic myotubes of *Drosophila melanogaster*." J Neurosci 13(1): 167-80.

Broadie, K. S. und M. Bate (1993). "Development of the embryonic neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster*." J Neurosci 13(1): 144-66.

- Brose, N. (1999). "Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system." Naturwissenschaften 86(11): 516-24.
- Brunger, A.T. (2001). Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. Annu.Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30: 157-171.
- Brunner, M. (1999). „HSAP und SAP47 – zwei homologe Proteine in Säugern und Insekten“. Staatsexamensarbeit, Universität Würzburg.
- Buchner, E., K. G. Gotz, et al. (1978). "Elementary detectors for vertical movement in the visual system of *Drosophila*." Biol Cybern 31(4): 235-42.
- Buchner E., Buchner S., Burg, M.G., Hofbauer, A., Pak, W.L., Pollack I. (1986). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of *Drosophila melanogaster*. Cell and Tissue Research 253: 357-370.
- Buchner, E. und C. B. Gundersen (1997). "The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release." Trends Neurosci 20(5): 223-7.
- Buchner, E. (1999). "Molecular complexity at the synapse: new proteins and multiple isoforms detected in *Drosophila*." Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova 85(1): 159-66.
- Buchner, E. (2001). "Understanding intercellular communication in the brain: identified neuromuscular synapses of the fruitfly *Drosophila* serve as a model." J Biosci 26(2): 127-9.
- Chapman, E. R., S. An, et al. (1994). "SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils." J Biol Chem 269(44): 27427-32.
- Chapman, E. R., P. I. Hanson, et al. (1995). "Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1." J Biol Chem 270(40): 23667-71.
- Chapman, E. R., P. I. Hanson, et al. (1995). "The neuronal exocytotic fusion machine: some new developments." Neuropharmacology 34(11): 1343-9.
- Chou, J. H. und R. Jahn (2000). "Binding of Rab3A to synaptic vesicles." J Biol Chem 275(13): 9433-40.
- Davidsson, P., R. Jahn, et al. (1996). "Synaptotagmin, a synaptic vesicle protein, is present in human cerebrospinal fluid: a new biochemical marker for synaptic pathology in Alzheimer disease?" Mol Chem Neuropathol 27(2): 195-210.
- Davletov, B. A. und T. C. Sudhof (1994). "Ca²⁺-dependent conformational change in synaptotagmin I." J Biol Chem 269(46): 28547-50.
- Debel, K. (1989). Identifikation und Charakterisierung gehirnspezifisch exprimierter Gene in *Drosophila* mit monoklonalen Antikörpern. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- De Camilli, P. und R. Jahn (1990). "Pathways to regulated exocytosis in neurons." Annu Rev Physiol 52: 625-45.

- De Camilli, P., M. Vitadello, et al. (1988). "The synaptic vesicle proteins synapsin I and synaptophysin (protein P38) are concentrated both in efferent and afferent nerve endings of the skeletal muscle." J Neurosci 8(5): 1625-31.
- Doerks, T., Huber, S., Buchner, E. und Bork, P. (2002). BSD, a novel domain in transcription factors and synapse-associated proteins. Trends Biochem Sci. 27(4): 168-70.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. Nucleic acids. Res. 16: 6127-6145.
- Dürrbeck, H. (2002). Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers nc82 im Gehirn von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Eberle, K. K., K. E. Zinsmaier, et al. (1998). "Wide distribution of the cysteine string proteins in *Drosophila* tissues revealed by targeted mutagenesis." Cell Tissue Res 294(2): 203-17.
- Eddy, S.R. (1996). Hidden Markov models. Curr. Opin. in Struct. Biol. 6: 361-365.
- Esser, L., Wang, C., Hosaka, M., Smagula, C.S., Südhof, T.C., Deisenhofer, J. (1998). Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes. Embo J. 17 (4): 977-984.
- Fasshauer, D., W. Antonin, et al. (2002). "SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis." Nat Struct Biol 9(2): 144-51.
- Fasshauer, D., W. K. Eliason, et al. (1998). "Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly." Biochemistry 37(29): 10354-62.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, et al. (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." Proc Natl Acad Sci U S A 95(26): 15781-6.
- Funk, N. (2000). Charakterisierung des sap47-Gens aus *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Geppert, M., B. Ullrich, et al. (1994). "Synaptic targeting domains of synapsin I revealed by transgenic expression in photoreceptor cells." Embo J 13(16): 3720-7.
- Godenschwege, T. A., N. Pohar, et al. (2000). "Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of *Drosophila*." Eur J Cell Biol 79(7): 495-501.
- Hofbauer, A. (1991). Eine Bibliothek monoklonaler Antikörper gegen das Gehirn von *Drosophila melanogaster*. Habilitationsschrift, Universität Würzburg.
- Hosaka, M., Südhof, T.C. (1998). Synapsin III, a novel Synapsin with an unusual regulation by Calcium. J.Biol.Chem. 273: 133371-133374.
- Hosaka, M., Südhof, T.C. (1998). Synapsins I and II are ATP-binding proteins with differential Calcium regulation. J.Biol.Chem. 273: 1425-1429.

- Hosaka, M., R. E. Hammer, et al. (1999). "A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles." Neuron 24(2): 377-87.
- Jahn, K., B. Mohammadi, et al. (2001). "Deactivation and desensitization of mouse embryonic- and adult-type nicotinic receptor channel currents." Neurosci Lett 307(2): 89-92.
- Jahn, R. (1999). "Recycling of synaptic vesicle membrane within nerve terminals." Brain Res Bull 50(5-6): 313-4.
- Jahn, R., J. Hell, et al. (1990). "Synaptic vesicles: key organelles involved in neurotransmission." J Physiol 84(1): 128-33.
- Jahn, R., W. Schiebler, et al. (1985). "A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A 82(12): 4137-41.
- Jahn, R. und T. C. Sudhof (1993). "Synaptic vesicle traffic: rush hour in the nerve terminal." J Neurochem 61(1): 12-21.
- Jahn, R. und T. C. Sudhof (1994). "Synaptic vesicles and exocytosis." Annu Rev Neurosci 17: 219-46.
- Kao, H.-T., Porton, B., Czernik, A.J., Feng, J., Yiu, G., Häring, M., Benfenati, F., Greengard, P. (1998). A third member of the synapsin gene family. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 4667-4672.
- Karlin, S. und Altschul, S.F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc Natl Acad Sci U S A 87(6): 2264-68.
- Khyse-Anderson, J. (1984). Electroblothing of multiple gels. Biochem. Biophys. Meth.10:203.
- Klagges, B. R., G. Heimbeck, et al. (1996). "Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*." J Neurosci 16(10): 3154-65.
- Körner, C. (1995). Versuche zur Translations-Suppression des Gens für das Cystein-String-Protein in transgenen *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Li, C., B. Ullrich, et al. (1995). "Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins." Nature 375(6532): 594-9.
- Li, J. Y., L. Edelman, et al. (1996). "Axonal transport and distribution of synaptobrevin I and II in the rat peripheral nervous system." J Neurosci 16(1): 137-47.
- Li, J. Y., R. Jahn, et al. (1995). "Rab3a, a small GTP-binding protein, undergoes fast anterograde transport but not retrograde transport in neurons." Eur J Cell Biol 67(4): 297-307.
- Li, J. Y., R. Jahn, et al. (1996). "Axonal transport and targeting of the t-SNAREs SNAP-25 and syntaxin 1 in the peripheral nervous system." Eur J Cell Biol 70(1): 12-22.
- Li, J. Y., R. Jahn, et al. (1996). "Distribution of Rab3a in rat nervous system: comparison with other synaptic vesicle proteins and neuropeptides." Brain Res 706(1): 103-12.

- Maier K. (1995). Suche nach konservierten Domänen des SAP47-Proteins von *Drosophila melanogaster* durch Interspeziesvergleich. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrock, J. (1982). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor.
- Otto, H., P. I. Hanson, et al. (1997). "Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A 94(12): 6197-201.
- Pohar, N., T. A. Godenschwege, et al. (1999). "Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human." Genomics 57(2): 293-6.
- Reich, J.-P. (1997). Molekulare Charakterisierung und zytogenetische Lokalisierung des humanen sap47-Homologs HSAP von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Reichmuth, C. (1993). DSAP47: Charakterisierung des Gens für ein neues synapsenassoziiertes Protein in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Reichmuth, C., S. Becker, et al. (1995). "The sap47 gene of *Drosophila melanogaster* codes for a novel conserved neuronal protein associated with synaptic terminals." Brain Res Mol Brain Res 32(1): 45-54.
- Reisch, D. (1994). Untersuchungen zur Evolution des synapsenassoziierten Proteins SAP47 in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Reisch, D. (2000). Strukturelle und physiologische Charakterisierung der larvalen Nerv-Muskel-Synapse von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Rost, B. und Sander C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. J Mol Biol 232: 584-599.
- Sambrock, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schiebler, W., R. Jahn, et al. (1986). "Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles." J Biol Chem 261(18): 8383-90.
- Spradling A.C. und Rubin G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. Science 218 (4570): 348-53.
- Steward, O. und E. M. Schuman (2001). "Protein synthesis at synaptic sites on dendrites." Annu Rev Neurosci 24: 299-325.
- Storm-Mathisen, J., Otterson, O.P. (1989). Excitatory and inhibitory amino acids in the hippocampus. The Hippocampus- News Vistas: 97-117.

- Sudhof, T. C., F. Lottspeich, et al. (1987). "The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin." Nucleic Acids Res 15(22): 9607.
- Sudhof, T. C., F. Lottspeich, et al. (1987). "A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions." Science 238(4830): 1142-4.
- Sudhof, T. C. (1989). "Synaptic vesicles." Curr Opin Cell Biol 1(4): 655-9.
- Sudhof, T. C., M. Baumert, et al. (1989). "A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*." Neuron 2(5): 1475-81.
- Sudhof, T. C., A. J. Czernik, et al. (1989). "Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins." Science 245(4925): 1474-80.
- Sudhof, T. C. (1990). The Structure of the Human Synapsin I Gene and Protein. J. Biol.Chem. 265: 7849-7852.
- Sudhof, T. C. und R. Jahn (1991). "Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling." Neuron 6(5): 665-77.
- Sudhof, T. C., A. G. Petrenko, et al. (1993). "Molecular approaches to synaptic vesicle exocytosis." Prog Brain Res 98: 235-40.
- Sudhof, T. C., P. De Camilli, et al. (1993). "Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins." Cell 75(1): 1-4.
- Sudhof, T. C. (1995). "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions." Nature 375(6533): 645-53.
- Sudhof, T. C. (2000). "The synaptic vesicle cycle revisited." Neuron 28(2): 317-20.
- Sudhof, T. C. (2001). "alpha-Latrotoxin and its receptors: neurexins and CIRL/latrophilins." Annu Rev Neurosci 24: 933-62.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, et al. (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution." Nature 395(6700): 347-53.
- Tobaben, S., P. Thakur, et al. (2001). "A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine." Neuron 31(6): 987-99.
- Thomson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTALW improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids. Res. 22: 4673-4680.
- Umbach, J. A., K. E. Zinsmaier, et al. (1994). "Presynaptic dysfunction in *Drosophila* csp mutants." Neuron 13(4): 899-907.
- Zinsmaier, K.E., Hofbauer, A., Heimbeck, G., Pflugfelder, G.O., Buchner, S., Buchner, E. (1990). A cysteine-string-protein is expressed in retina and brain of *Drosophila*. J. Neurogenetics 7: 15-29.

Zinsmaier, K. E., K. K. Eberle, et al. (1994). "Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*." Science 263(5149): 977-80.

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich versichere, dass diese Dissertation weder in dieser noch in einer ähnlichen Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

München, den 28.02.03

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich versichere, die Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

München, den 28.02.03