

Das *Sap47*-Gen aus *Drosophila melanogaster*:

Gezielte Mutagenisierung und Suche nach Interaktionspartnern

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

vorgelegt von

Natalja Funk
aus
Balchasch

Würzburg, 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag der Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus	1
1.2. Chemische Synapse	2
1.3. Das synapsenassoziiertes Protein von 47 kDa aus <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.4. Problemstellung	7
1.5. Strategien für die <i>Sap47</i> Mutagenese	7
<u>Gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination bei</u>	
<u><i>Drosophila melanogaster</i></u>	7
<u>RNA interference</u>	10
2. Material	13
<u>Organismen</u>	13
Bakterienstämme	13
Hefe-Stämme	13
Fliegen Stämme (<i>Drosophila melanogaster</i>)	13
<u>Vektoren, cDNA Bibliotheken</u>	14
<u>Nukleotide und Primer</u>	14
<u>Immunglobuline</u>	15
<u>Reaktionskits und Säulen</u>	15
<u>Chemikalien und Enzyme</u>	16
<u>Puffer und Lösungen</u>	16
3. Methoden	18
<u>Bakterienkulturen</u>	18
<u>Molekularbiologische Methoden</u>	18
DNA-Präparative Methoden	18
Sequenzierung	18
Markierung von DNA Fragmenten	18
<u>Proteinchemische Methoden</u>	19
SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)	19
Färbung der Gele mit Coomassie Blue und Silbernitrat	19
Western Blot	19
Induktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen	19
Co-Immunpräzipitation	19
<u>Immunhistochemische Methoden</u>	20
Immunhistochemie an Kryostatschnitten von <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Larvales Nerv-Muskel Präparat von <i>Drosophila melanogaster</i>	20
<u>Yeast-Two-Hybrid</u>	20
<u>CytoTrap Two-Hybrid System</u>	21
<u>Methoden für den Umgang mit Hefe</u>	21
Plasmidtransformation in die Hefezellen	21
Proteinextraktion aus den Hefezellen	21
Plasmid-DNA Minipräparation aus der Hefe	21

4. Ergebnisse	23
4.1. Mutagenese des <i>Sap47</i> - Gens aus <i>Drosophila melanogaster</i>	23
4.1.1. Gezielte Mutagenese des <i>Sap47</i> -Gens durch homologe Rekombination	23
<u>5 kb <i>Sap47</i> genomisches Fragment</u>	23
<u>7,6 kb <i>Sap47</i> genomisches Fragment</u>	28
4.1.2. Versuche zur Ausschaltung der SAP47-Proteinexpression mit Hilfe von RNA interference (RNAi)	32
<u>cDNA-Konstrukt</u>	33
<u>RNAi genomisch</u>	42
4. 2. Vergleich der beiden RNAi Konstrukte	47
4. 3. Versuche zur Charakterisierung der SAP47 RNAi Fliegen	48
4. 4. Jump-out Mutagenese des <i>Sap47</i> Gens	50
4. 5. Suche nach Interaktionspartnern für das SAP47-Protein aus <i>Drosophila melanogaster</i>	55
4. 4. 1. Yeast-Two-Hybrid Screen	55
4. 4. 2. CytoTrap Screen	57
4. 6. SAP47 Protein aus <i>Drosophila melanogaster</i> : Zusätzliche Spleißvarianten	59
5. Diskussion	63
5. 1. Gezielte Mutagenese des <i>Sap47</i> Gens durch homologe Rekombination	63
5. 2. Versuche zur Unterdrückung der SAP47 Expression mittels RNA interference	66
5. 3. Versuche zur Phänotypisierung der RNAi Tiere	70
5. 4. Jump-out Mutagenese des <i>Sap47</i> -Gens	71
5. 5. Suche nach den Interaktionspartnern für SAP47	74
5. 6. <i>Sap47</i> : Genorganisation und neue Spleißvarianten	77
6. Perspektiven	80
7. Zusammenfassung	81
7. Summary	84
8. Literaturverzeichnis	87
9. Abkürzungen	94
10. Anhang	95

1. Einleitung

1.1. *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Das menschliche Gehirn mit seiner immensen Anzahl von ca. 100 Milliarden Nervenzellen und unzähligen synaptischen Verbindungen (ca. 1000 pro Neuron) (Featherstone & Broadie, 2000) gehört zu den komplexesten bekannten Strukturen überhaupt. Seit hundert tausenden von Jahren ist die Menschheit im Besitz dieses exquisiten Produktes der Evolution, ist aber noch sehr weit davon entfernt es zu verstehen. Zahlreiche Wissenschaftler bemühen sich daher, „einfachere“ Alternativen zu finden, um Gehirnfunktionen zu analysieren.

1909 begann T. H. Morgan an der Columbia Universität die ersten genetischen Studien an *Drosophila* (Rubin, 1988) und eröffnete damit eine neue Epoche in der Biologie. Die Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf rein genetische Fragestellungen. Ein Großteil unseres heutigen Wissens über Rekombination, Mutationen, Chromosomen „rearrangement“ und andere genetische Phänomene stammten aus den Studien, die an *Drosophila* durchgeführt wurden (Rubin, 1988). Vor allem die kurze Generationszeit, unkomplizierte Züchtbedingungen und die große Anzahl an Nachkommen sowie die relativ einfache Manipulierbarkeit des Genoms machten die kleine Fruchtfliege zu einem klassischen Modellorganismus in der Biologie (Featherstone & Broadie, 2000). Mit der Entwicklung von neuen Techniken sowie durch Etablierung einer großen Vielfalt an genetischen „tools“ wurde auch die Aufklärung der Funktion solch komplexer Strukturen wie z.B. des Nervensystems möglich.

Mit seinen ca. 200 000 Neuronen besitzt *Drosophila* ein vergleichbar „einfaches“ und „übersichtliches“ Nervensystem, dessen morphologischer Aufbau weitgehend aufgeklärt und charakterisiert ist (Armstrong et al., 1995). Das eindrucksvolle Verhaltensrepertoire der Fliegen zeigt jedoch, dass es kompliziert genug ist, um für die vielfältigen Leistungen des Nervensystems auch von Säugern als Modellsystem dienen zu können. Vor allem die Tatsache, dass die wichtigste biologische Prozesse (und nicht nur die des Nervensystems) und die grundlegenden molekularen Mechanismen im Laufe der Evolution hoch konserviert wurden (Featherstone & Broadie, 2000), macht die bei Studien an *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse auch auf das menschliche Gehirn übertragbar. In jüngster Zeit eröffnete die Sequenzierung und Annotation des *Drosophila* Genoms durch die Zusammenarbeit des Berkeley *Drosophila* Genom Projekts und Celera Genomics (Adams et al., 2000) neue Perspektiven für den Einsatz von *Drosophila* als Modellorganismus bei der Aufklärung der

wichtigsten biologischen Vorgänge (Celniker, 2000; Yoshihara et al., 2001; Kornberg & Krasnow, 2000).

1. 2. Chemische Synapse

Die einzelnen Neurone des Nervensystems gehen Verknüpfungen untereinander und bilden ein kompliziertes Gebilde: das neuronale Netzwerk. Die Hauptform der Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen stellt die fein geregelte Neurotransmittersekretion dar. Der Neurotransmitter wird als Reaktion auf ein Aktionspotential aus der präsynaptischen Endigung eines Neurons in den synaptischen Spalt freigesetzt, erreicht die postsynaptische Spezialisierung der Ziel-Zelle und löst hier das physiologische Signal durch die spezifische Bindung an Rezeptoren der Postsynapse aus (Fon & Edwards, 2001).

Synaptische Vesikel sind abundante sekretorische Organellen der präsynaptischen Nervenendigungen. Sie akkumulieren eine hohe Konzentration an Neurotransmitter und setzen es nach Bedarf durch die Fusion mit der präsynaptischen Plasmamembran frei (Fernández-Chacón & Südhof, 1999). Die Neurotransmittersekretion wird durch einen spezialisierten Membrankreislauf (= Zyklus der synaptischen Vesikel) vermittelt (zur Übersicht: Betz & Angleson, 1998; Schiavo & Stenbeck, 1998; Bajjalieh, 1999; Fernández-Chacón & Südhof, 1999; Südhof, 2000; Fon & Edwards, 2001; Richmond & Broadie, 2002; Jahn et al., 2003). In einem vollen synaptischen Vesikelzyklus sind neun aufeinander folgende Schritte (Abb. 1.1) zu unterscheiden (Südhof, 1995):

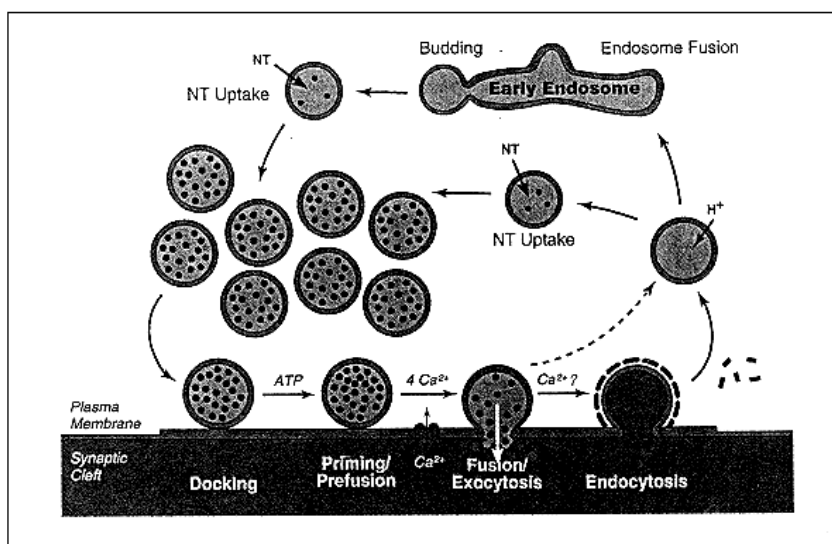


Abb. 1.1: Zyklus der synaptischen Vesikel (aus Fernández-Chacón & Südhof, 1999).

Docking. In diesem Schritt werden die mit dem Neurotransmitter gefüllten synaptischen Vesikel an der aktiven Zone angedockt.

Priming. Die synaptischen Vesikel laufen einen Reifungsprozess durch und entwickeln dabei Kompetenz zu einer raschen Ca^{2+} -ausgelösten Fusion mit der Plasmamembran.

Fusion/Exocytose. Als eine Reaktion auf den Ca^{2+} -Einström in die Zelle fusionieren die synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran und schüttern ihren Inhalt aus.

Endocytose. Die Membran der synaptischen Vesikel wird wieder in die Zelle aufgenommen.

Translokation. Die Vesikel wandern ins Innere der Boutons und werden zu Recyclingvesikel.

Fusion mit Endosomen. Ein Teil der Recyclingvesikel fusioniert mit frühen Endosomen, andere werden direkt wieder mit Neurotransmitter gefüllt.

Knospung. Regeneration der synaptischen Vesikel durch Knospung von den Endosomen.

Neurotransmitter Aufnahme. In diesem Schritt werden die synaptischen Vesikel erneut mit dem Neurotransmitter gefüllt.

Translokation. In dem zweiten Translokationsschritt werden gefüllte Vesikel zu der aktiven Zone der Synapse transportiert.

Um den Zyklus genau regulieren zu können besitzt die Synapse ein breites Spektrum an unterschiedlichsten Proteinen, die je nach Funktion in vier großen Gruppen unterteilt wurden (Südhof, 1995), in den nacheinander folgenden Schritten des Zyklus zum Einsatz kommen und durch die fein geregelte Zusammenarbeit den präzisen Ablauf des Zyklus gewährleisten. Manche dieser Proteine wie z. B. Synaptobrevin, Syntaxin, SNAPs, NSF, Synaptotagmine, Rab3 Isoformen, Calmodulin, Synapsine usw. sind bereits längere Zeit bekannt und vergleichbar gut charakterisiert. Auch die Rolle dieser Proteine im Zyklus der synaptischen Vesikel ist mehr oder weniger bekannt. Allerdings geht man davon aus, dass ein wesentlicher Teil der am Zyklus beteiligten Proteine noch unbekannt bzw. nicht charakterisiert ist. Die Charakterisierung eines solchen neuen neuronalen Proteins war das Ziel der gegenwärtigen Arbeit.

1. 3. Das synapsenassoziiertes Protein von 47 kDa aus *Drosophila melanogaster*

Das *Sap47* Gen aus *Drosophila melanogaster* kodiert für ein neues neuronales Protein, das an den synaptischen Endigungen von Nervenzellen lokalisiert ist. Das SAP47 (Synapsen-assoziiertes Protein von 47 kDa) wurde ursprünglich mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers mit der Bezeichnung MAK nc46/1 aus der Hybridomabibliothek von Alois Hofbauer identifiziert (Reichmuth et al., 1995). Immunhistochemische Färbungen mit MAK nc46 an *Drosophila* Kopfschnitten und larvalen Nerv-Muskel Präparaten (Abb. 1.2) sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen sprechen dafür, dass das Antigen im Cytoplasma von synaptischen Endigungen zu finden ist (Reisch, 2000).

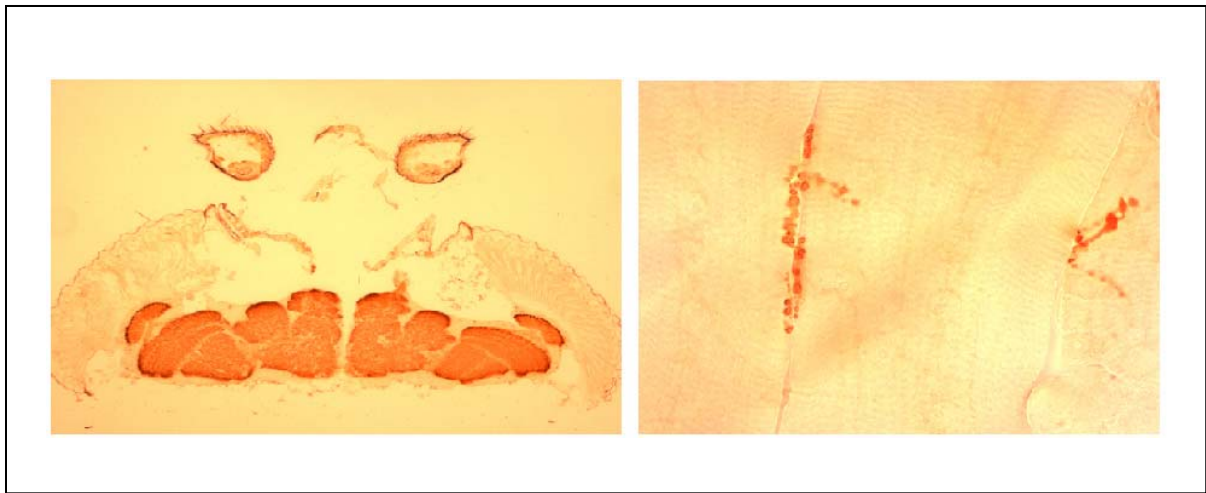


Abb. 1. 2: Dargestellt sind ein Horizontalschnitt eines *Drosophila* Kopfes (links) und ein larvales Nerv-Muskel Präparat (rechts) gefärbt mit dem MAK nc46 aus der Hybridomabibliothek von A. Hofbauer.

Das *Sap47* Gen wurde in der Region 89 A8-B3 auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms lokalisiert. Der genomische Bereich erstreckt sich über eine Länge von ca. 25 kb und besteht (nach den bisherigen Angaben) aus sieben Introns und acht Exons (Abb. 1.3) (Reichmuth et al., 1995), wobei die Exons 7 und 8 in zwei Spleißvarianten alternativ benutzt werden (Becker, 1997). Die beiden alternativ gespleißten Transkripte des *Sap47*-Gens kodieren für zwei nahezu identische Proteine mit 347 und 351 Aminosäuren, die sich nur um sechs Aminosäurenreste am C-Terminus unterscheiden (Reichmuth et al., 1995).

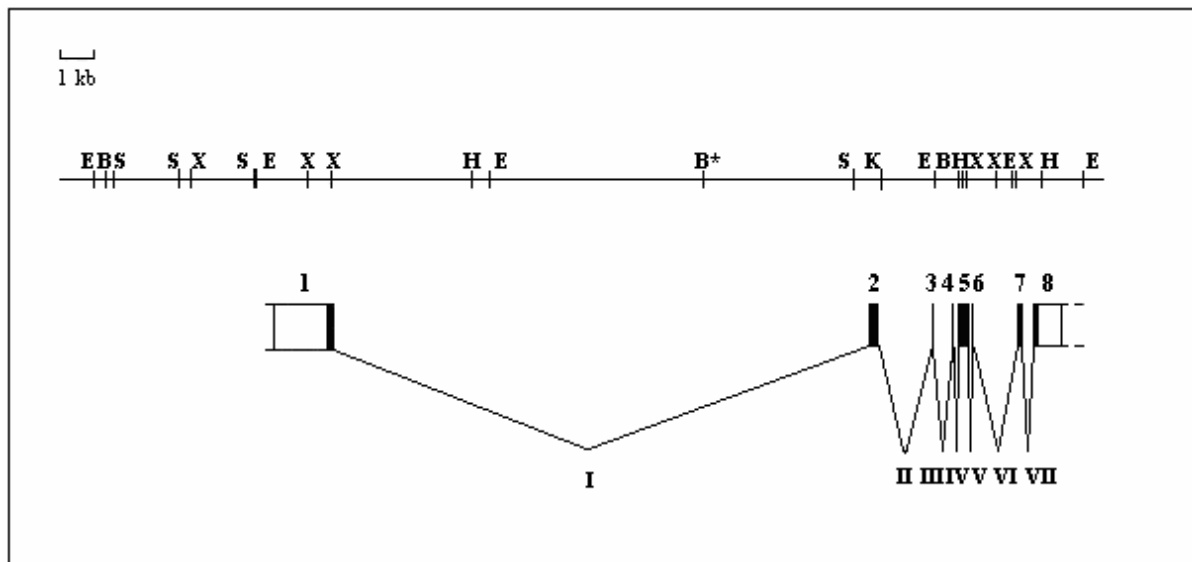


Abb. 1. 3: Vorläufige Exon-Intron Organisation des *Sap47*-Gens. Die Exons sind als horizontale Balken unterhalb der Restriktionskarte dargestellt, wobei die leeren Balken nicht translatierte Anteile symbolisieren. Schnittstellen sind mit dem jeweiligen Kürzel beschriftet: B = *Bam*HI, E = *Eco*RI, H = *Hind*III, S = *Sst*I, X = *Xho*I (aus Becker, 1997).

Das berechnete Molekulargewicht der Proteine sollte ca. 35 kDa betragen. Allerdings liefert im Western Blot MAK nc46/1 ein Signal mit dem Molekulargewicht von ca. 47 kDa (Reichmuth et al., 1995). Diese Diskrepanz kann eventuell durch einige besondere Kennzeichen der SAP47 Proteine erklärt werden. Beide Varianten besitzen im N-terminalen Bereich eine Region mit hohem Gehalt an Alaninresten, die in der Lage sind ungewöhnlich stabile α -Helices zu bilden (Reichmuth, 1993). Diese Helices könnten die Konformation des SDS-Polypeptid-Komplexes ändern und so das Laufverhalten in der SDS-PAGE beeinflussen (Reichmuth, 1993).

Das *Sap47* Gen wurde in Laufe der Evolution hoch konserviert. Homologe Sequenzen findet man nicht nur bei anderen Insekten (*Muska domestica*, *Calliphora erythrocephala*) sondern auch bei *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Xiphophorus maculatus*, *Danio rerio*, *Mus musculus* und *Homo sapiens*. Trotz der hohen Konservierung zeigen sowohl das SAP47 Protein aus *Drosophila* als auch seine Homologe in anderen Spezies keine auffällige Ähnlichkeit mit anderen Proteinen und bilden damit eine neue Proteinfamilie.

Eine Besonderheit der SAP47 Proteine von *Drosophila* stellt ein repetitives Tripeptid Met/Ile-Pro-Ser/Ala in der Region von Aminosäure 90 bis Aminosäure 107 dar. Bei der Suche nach Sequenzhomologien zu anderen Proteinen konnte in der „M“-Domäne des SRH1-Proteins aus Hefe eine gewisse Ähnlichkeit festgestellt werden (Reichmuth, 1993). Das SRH1-Protein stellt ein Homolog zur 54 kDa Untereinheit des **S**ignal-**R**ecognition-**P**article (SRP) aus Säugern dar (Amaya, 1990). Der SRP-Komplex erkennt Signalsequenzen von Proteinen, die mit dem

1. 4. Problemstellung

In Laufe dieser Arbeit sollte eine *Sap47* Null-Mutante hergestellt werden. Dafür sollten zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt werden: Die gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination und RNA interference. Falls eine der beiden Methoden zum gewünschten Erfolg führt, sollte versucht werden die entstandenen Tiere zu charakterisieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu versuchen, einen Interaktionspartner für das SAP47 Protein mittels des Yeast-Two-Hybrid Verfahrens zu identifizieren. Anschließend sollte versucht werden, die Interaktion zwischen dem SAP47 und in Frage kommenden Interaktionskandidaten mit Hilfe von GST-Pulldown bzw. Co-Immunpräzipitation näher zu charakterisieren.

1. 5. Strategien für die *Sap47* Mutagenese

Um das Hauptziel der Arbeit (Herstellung einer *Sap47* Null-Mutante) zu erreichen, wurden zwei verschiedene Methoden in Betracht gezogen: „gene targeting“ und RNA interference. Um den Ablauf der beiden Verfahren nachvollziehbar zu machen und das Verständnis für die Vorgehungsweise zu erleichtern, sollen an dieser Stelle die Grundprinzipien und der Mechanismus der beiden Methoden geschildert werden.

Gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination bei *Drosophila melanogaster*

Unter der gezielten Mutagenese durch homologe Rekombination („gene targeting“) versteht man eine Modifizierung beliebiger endogener DNA-Sequenzen mit Hilfe von homologer Rekombination zwischen einem extrachromosomalen DNA-Fragment („donor“) und dem homologen Gen („target“).

Homologe Rekombination zwischen einem extrachromosomalen DNA-Fragment und dem entsprechenden chromosomalen Locus wird bereits seit Jahren als ein effektives Verfahren zur gezielten Erzeugung bzw. Rettung von Mutationen in der Maus und Hefe eingesetzt. Für die Maus kann das Prinzip der Mutagenese im wesentlichen folgendermaßen kurz zusammengefasst werden: ein lineares DNA-Fragment mit der Homologie zum „Zielgen“ (sprich „donor“-Konstrukt) wird in embryonale Stammzellen in Kultur eingeschleust. Findet eine Rekombination zwischen dem „donor“ und dem Genom einer Zelle statt, können diese unter dem Selektionsdruck überleben. Diese Zellen werden in eine Blastocyste injiziert, so dass sich ein chimärer Organismus entwickelt. Wird hierbei die Keimbahn besiedelt, produzieren die Chimeren Nachkommen mit der gewünschten Mutation (Müller, 1999).

Lange Zeit hinderte das Fehlen einer Möglichkeit, ein lineares DNA-Molekül in *Drosophila* Keimzellen einzubringen, die Etablierung dieser Methode für die Fruchtfliege. Eine vom Yikang S. Rong und Kent G. Golic (2000) beschriebene Methode zur Generierung eines solchen linearen „donor“-Moleküls bei der Fliege *in vivo* erlaubt seit kurzem eine ähnliche Manipulationen auch für das *Drosophila* Genom.

Die Methode erfordert drei Haupt-Komponenten (Abb. 1.5), welche beim Zusammenwirken in einer Zelle zum gewünschten Ergebnis führen können.

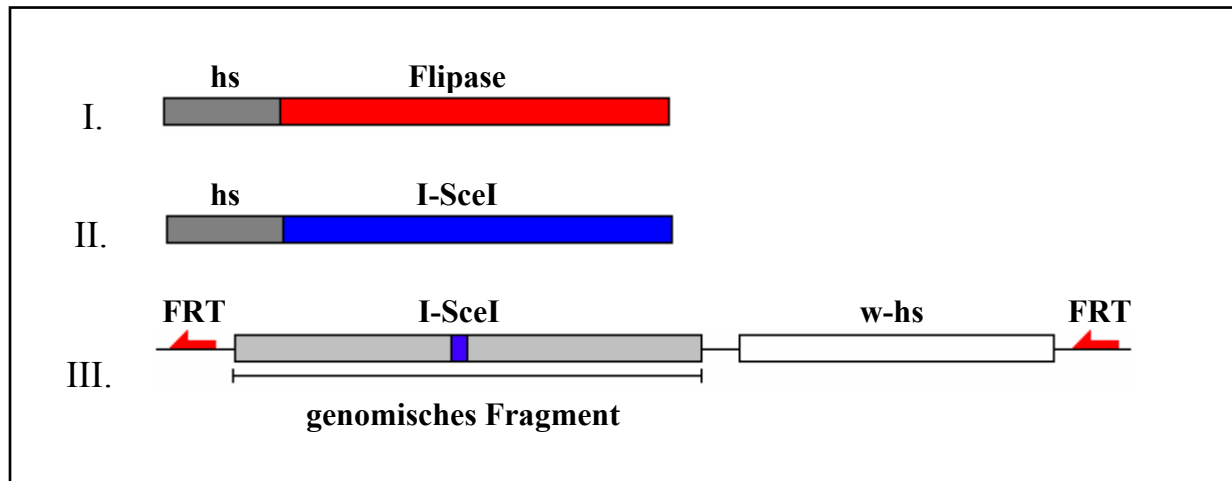


Abb. 1. 5: Schematische Darstellung der Hauptbestandteile der Mutagenese. Es sind folgende Elemente zu sehen (von oben nach unten): I. Flipase Transgen; II. I-SceI Meganuklease Transgen; III. „Donor“ Konstrukt.

Die erste Komponente der Mutagenese ist ein transgenes Flipase Konstrukt. Flipase ist eine sequenzspezifische Rekombinase aus der Hefe (Cox, 1988). Es wurde bereits gezeigt, dass die Flipase eine sequenzspezifische Rekombination auch im *Drosophila* Genom ermöglicht (Golic & Lindquist, 1989). Das Konstrukt befindet sich unter der Kontrolle eines hs-Promoters und kann daher durch einen Hitzeschock aktiviert werden (Rong & Golic, 2000).

Die zweite Komponente der Mutagenese ist ein Transgen für eine sequenzspezifische Endonuklease mit der Bezeichnung *I-SceI* Meganuklease. Das Enzym stammte ursprünglich aus Mitochondrien von Hefe-Zellen, bindet an eine 18 bp lange Erkennungssequenz und erzeugt einen Doppelstrangbruch (Bellaiche et al., 1999). Das Endonuklease-Transgen steht ebenfalls unter der Kontrolle eines hs-Promoters (Rong & Golic, 2000).

Der dritte Bestandteil der Methode ist ein transgenes „donor“-Konstrukt. Es ist aus mehreren unabhängigen Fragmenten aufgebaut, welche bei den einzelnen Schritten der Mutagenese nacheinander ins Spiel kommen. Das Konstrukt enthält ein unvollständiges bzw. durch einzelne Punktmutationen verändertes Fragment aus dem „Ziel-Gen“, das man modifizieren möchte. In die Mitte des genomischen Fragmentes wird die Erkennungssequenz für die bereits

erwähnte *SceI* Meganuklease eingebracht. Damit man das Vorhandensein des „donor“-Konstruktes später in der Fliege auch verfolgen kann, wird am 3'-Ende des genomischen Fragmentes ein mini-*white* Gen als Marker kloniert. Diese ganze 3-Komponenten Kassette (genomisches Fragment, *SceI*-Erkennungssequenz und mini-*white* Gen) befindet sich zwischen zwei gleichgerichteten „FRT sites“, welche durch die Flipase erkannt werden können.

Nachdem sich alle drei Bestandteile (Flipase- und *SceI*-Transgene sowie das „donor“-Konstrukt) in einer Zelle befinden, kann die Herstellung von Flipase und *SceI*-Meganuklease durch einen Hitzeschock ausgelöst werden. Danach spielt sich in der Zelle folgendes ab (Abb. 1.6): Die Flipase erkennt spezifisch beide FRT sites und bindet an sie, was zu einer Rekombination zwischen den beiden FRTs führt. Durch dieses Ereignis entsteht ein geschlossenes ringförmiges extrachromosomales DNA Fragment, welches alle ursprünglich zwischen den beiden FRTs liegende „Komponente“ und eine FRT site enthält. Ebenfalls durch den Hitzeschock wird auch die Herstellung von *SceI*-Meganuklease induziert. Das Enzym bindet an die entsprechende Erkennungssequenz des „donors“ und erzeugt an der Stelle einen Doppelstrangbruch. Dadurch entsteht ein lineares extrachromosomales DNA-Fragment, welches sich eventuell mit den homologen endochromosomalen Sequenzen paaren kann. Die Erzeugung eines linearen DNA-Moleküls ist der entscheidende Schritt bei dieser Art der gezielten Mutagenese, da die durch die Nukleaseaktivität erzeugten freien, ungeschützten DNA-Enden extrem „aggressiv“ sind und die Fähigkeit besitzen, die Reparatursysteme der Zelle zu einer Rekombination zwischen dem „donor“-Konstrukt und homologen Sequenzen im Genom („Ziel-Gen“) zu provozieren. Als Produkt der homologen Rekombination entsteht ein Chromosom mit zwei defekten „in tandem“ angeordneten Kopien des „Ziel-Gens“ (Abb.: 1.6), welche durch das mini-*white* Gen aus dem ursprünglichen „donor“-Konstrukt getrennt sind (Rong & Golic, 2000).

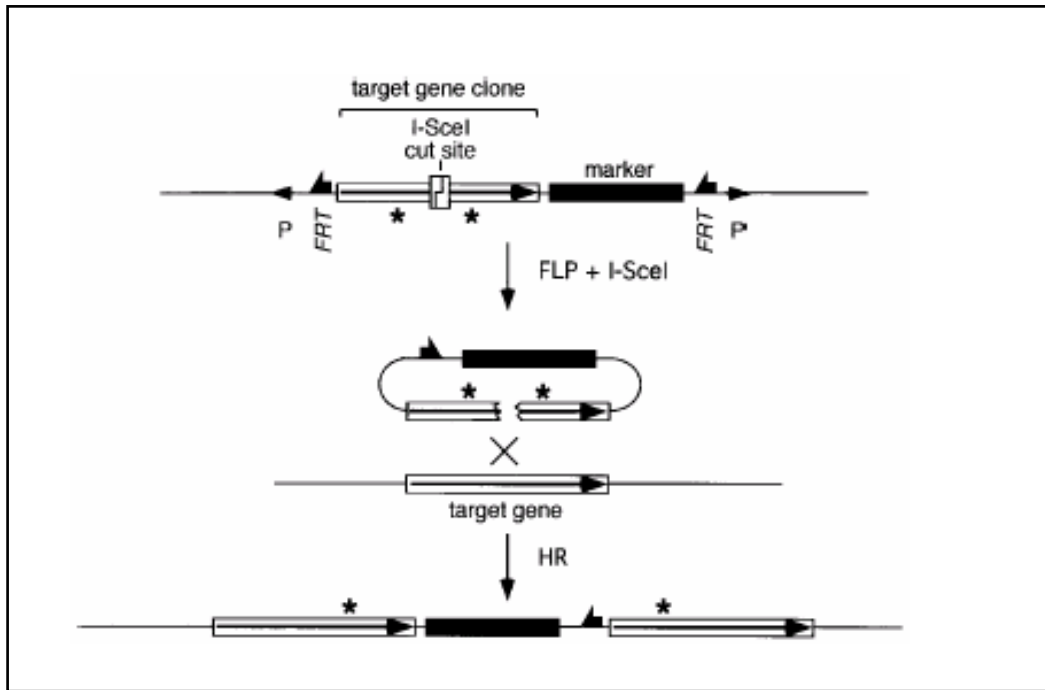


Abb. 1. 6: Schematische Darstellung des Mechanismus von gezielter Mutagenese durch homologe Rekombination (aus Rong et al., 2002).

RNA interference

Unter dem RNA interference (RNAi) Phänomen versteht man die sequenzspezifische Regulation der Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene, indem die dazugehörige mRNA spezifisch abgebaut wird. Folge des RNAi Mechanismus ist daher sequenzspezifisches Gen-Silencing.

Das ursprünglich bei *C. elegans* entdeckte Phänomen der RNAi (Hannon, 2002) hat sich im Laufe der Eukaryontenevolution als eine Art Abwehrreaktion gegen exogene (z.B. Viren) und endogene (z.B. mobile genetische Elemente) Parasiten entwickelt (Waterhouse et al., 2001; Bernstein et al., 2000). Heute wird RNAi immer öfter zur gezielten Inaktivierung bzw. Runterregulierung bestimmter Gene ausgenutzt (zur Übersicht: Misquitta & Peterson, 1999; Kennerdell & Carthew, 2000; Piccin et al., 2001; Kunath et al., 2003; McCaffrey et al., 2003; Hamasaki et al., 2003; Peters et al., 2003; Tilli et al., 2003). Der Mechanismus der RNAi ist relativ kompliziert und viele Details sind noch weitgehend ungeklärt. Vor allem die vielseitigen Modifikationen der RNAi bei unterschiedlichen Gruppen von Organismen (Pflanzen, *Neurospora*, *Drosophila*, *C. elegans*, Säuger) hindern bei der Aufklärung des Phänomens. In der Abb. 1. 7 ist die vorläufige schematische Darstellung der RNAi zu sehen,

es basiert auf den genetischen Studien in *C. elegans*, Pflanzen sowie biochemischen Studien von *Drosophila* Extrakten. Vor allem die grau und blau unterlegten Schritte sind für die gegenwärtige Arbeit von Bedeutung.

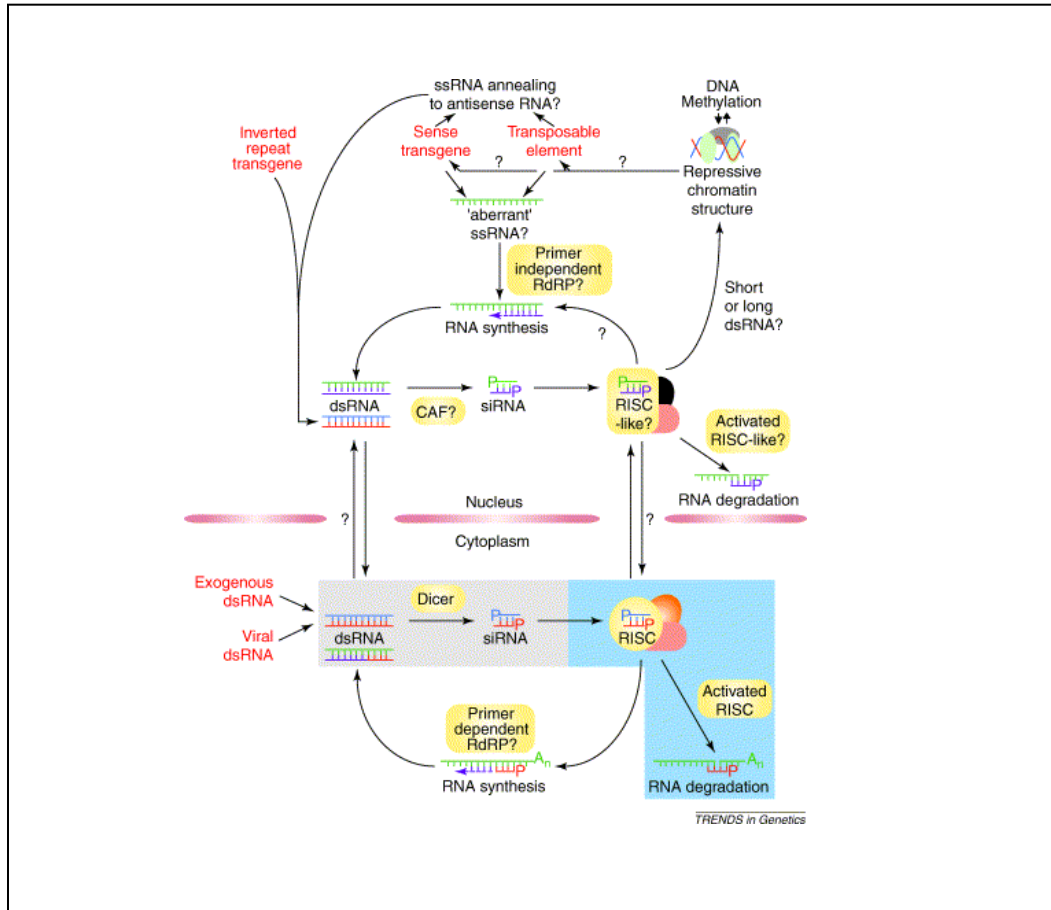


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des RNAi Mechanismus unterschiedlicher Organismen (aus Cerutti, 2003). Abkürzungen: s. Text.

RNAi kann in vier aufeinander folgende Schritte unterteilt werden (Szweykowska-Kulinska et al., 2003):

1. Spaltung der doppelsträngigen RNA
2. Bildung des „Silencing“ Komplexes
3. Aktivierung des „Silencing“ Komplexes
4. Degradation der komplementären RNA.

Im ersten Schritt der RNAi wird die lange doppelsträngige RNA (dsRNA) exogenen oder endogenen Ursprungs durch das Ribonuklease III (RNase III) Typ Protein Dicer erkannt und in Fragmente gespaltet. Homologe zur Dicer Nuklease wurden bei vielen Organismen wie z.B. *S. pombe*, *C. elegans*, *Drosophila*, Pflanzen und Säugern gefunden, was die hohe evolutionäre Konservierung des Mechanismus belegt. Bei der Hydrolyse durch Dicer werden kurze (21-23 nt lang) doppelsträngige RNA Fragmente (siRNAs = small interfering RNAs) mit

Phosphatgruppen am 5'- und Hydroxylgruppen am 3'-Ende sowie 2 Nukleotiden langen Überhängen an jedem 3'-Ende gebildet (Kim, 2003; Zamore, 2000).

Im zweiten Schritt der RNAi wird die siRNA vom RISC Komplex (RNA-induced silencing complex) aufgenommen. In einem ATP-abhängigen Schritt entfaltet sich das siRNA-Duplex, der RISC Komplex wird remodelliert und aktiviert. Der letzte Schritt (Schritt 4) umfasst die Erkennung und Spaltung der zum siRNA Strang komplementären mRNA (zur Übersicht: Bass, 2000; Vance & Vaucheret, 2001; Waterhouse et al., 2001; Bernstein et al., 2001; Matzke et al., 2001; Hannon, 2002; Szweykowska-Kulinska et al., 2003; Cerutti, 2003). In manchen Organismen wie z. B. *C. elegans* oder *Arabidopsis thaliana* spielt ein zusätzlicher Mechanismus eine wichtige Rolle bei der RNAi: die Bildung einer sekundären siRNA Population. Dabei werden die primären siRNAs als Primer zur Synthese zusätzlicher dsRNAs unter Verwendung der entsprechenden mRNA als Matrize in einer durch eine zelluläre RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP) katalysierten Reaktion verwendet. Die neu synthetisierten dsRNAs werden von Dicer erkannt und in siRNAs zerlegt, was zur Amplifizierung des ursprünglichen Signals führt (Cerutti, 2003; Szweykowska-Kulinska et al., 2003). Bei *Drosophila* und Säugern spielt der letzte Mechanismus keine obligatorische Rolle (Cerutti, 2003), obwohl in *Drosophila* Embryonenextrakten RdRP-ähnliche Aktivität nachgewiesen wurde (Lipardi et al., 2001).

2. Material

Organismen

Bakterienstämme

E. coli XL1-blue (Stratagene)

E. coli BL21 (Novagen)

E. coli SolR (Stratagene)

E. coli SURE2 (Stratagene)

Hefe-Stämme

S. cerevisiae HF7c

S. cerevisiae Y190

S. cerevisiae Cdc25Ha

S. cerevisiae Cdc25Ha

S. cerevisiae CG1945

Fliegen Stämme (*Drosophila melanogaster*)

Wildtyp w¹¹¹⁸

Würzburg

w⁻; +; $\frac{\text{TM3 Sb, e}}{\text{TM6 Tb, e}}$

Würzburg

w⁻; $\frac{\text{Sco}}{\text{CyO}}$; +

Würzburg

P-Insertionslinien

w⁻; P[elav-Gal4, w⁺]; +

Würzburg

w⁻; $\frac{\text{P[actin - Gal4, w⁺]}]{\text{CyO}}$; +

Würzburg (G. Pflügfelder)

w⁻; +; $\frac{\text{P[tubulin - Gal4, w⁺]}]{\text{TM3 Sb}}$

Würzburg (E. Jauch)

w⁻; +; $\frac{\text{P[70FLP, ry⁺]23 P[70I - SceI, v⁺]4 Ary}}{\text{TM3 Ser}}$

Kent G. Golic, Utah

v⁻; $\frac{\text{P[70FLR, ry⁺]4 P[70I - SceI, v⁺]2B Sco}}{\text{SM6}}$; ry⁻

Kent G. Golic, Utah

w⁻, y⁻, (v[?]); $\frac{P[70FLP, ry^+]4 P[70I - SceI, v^+]2B Sco}{CyO}$; +

Kent G. Golic, Utah

w⁻; + ; EY07944

Hugo Bellen

w⁻; $\frac{Sp}{CyO}$; $\frac{P[\Delta 2 - 3, ry^+] Sb}{P[\Delta 2 - 3] TM2 Ubx}$

Würzburg

w⁻; + ; $\frac{\Delta blp/\Delta sap47 Jo 253}{TM3 Sb, e}$

Würzburg (S. Becker)

Vektoren, cDNA Bibliotheken

pBlueskript II KS (+/-) (Stratagene)

pBS(NotI) (Kent G. Golic)

pET28a-c(+) (Novagen)

pUAST (Brand & Perrimon, 1993)

pTV2 (Rong & Golic, 2000)

pACT2 AD (Clontech)

pAS2-1 (Clontech)

pSos (Stratagene)

pMyr (Stratagene)

CytoTrap XR Adult *Drosophila* cDNA Bibliothek (Stratagene)

Drosophila melanogaster, adult MATCHMAKER cDNA Bibliothek (Clontech)

Nukleotide und Primer

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

PEQLAB

[α -³²P]-dCTP

Amersham

Sequenzspezifische Primer (alle von MWG)

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

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

pUAST up 5'-TCT CTG TAG GTA GTT TGT CCA-3'

pUAST down 5'-AAA TCA ACT GCA ACT ACT GAA-3'

pSos-sense 5'-CAA TGC CAT GGC CAA CAT GTT TTC GGG C-3'

pSOS sense 5'-CCA AGA CCA GGT ACC ATG-3'

pSOS anti 5'-GCC AGG GTT TTC CCA GT-3'

pMyr sense 5'-ACT ACT AGC AGC TGT AAT AC-3'

pMyr anti 5'-CGT GAA TGT AAG CGT GAT GAC AT-3'

YTH sense 5'-GGC AGC GAA TTC GGA GCC AAC ATG TTT TCG G-3'

YTH sense2 5'-GGC AGG GAA TTC GAC AAG TCG AGG TAT ATT AG-3'

YTH sense3 5'-CAG GAA TTC ATG CCA GCG ATG CCA TC-3'

YTH sense4 5'-GCA GGA ATT CAC ATC TGT GGA GGC CAC G-3'

YTH sense5 5'-CGG AAT TCG AGG AAG CTG GCA AAA GCG GAT-3'

YTH- α -sense 5'-GGC AGC GTC GAC TCC ATT CAA TCT TCA TCT T-3'

GAL4BD 5'-TCA TCG GAA GCG AGT AG-3'

pAC2-AD 5'-TAA TAC CAC TAC AAT GGA TGA TG-3'

pACT2 anti 5'-GCG GGG TTT TTC AGT ATC TAC G-3'

pUASTSAP47sense1 5'-GGC GTG AAT TCA ACA TGT TTT CGG GCC TAA C-3'

pUASTSAP47anti1 5'-CAT GAT CCG GAA TCT TCA TCT TCG CCG C-3'

SAP47senseKpn2I 5'-CTG ACA TCC GGA CAA TCT TCA TCT TCG CCG-3'

SAP47antiNotI 5'-AAA TAG CGG CCG CTT TCG GGC CTA ACA AAT C-3'

Sap47-ExonVII sense 5'-GGT CCT CCG GGA TTT TGG TTT TAA TCC ATT CAA TC-3'

Sap47-ExonII anti 5'-GTT CAG GTA CCG ATG GCT GGG CAG TGC-3'

RNAi-Intron 6 5'-GGG TCC AGA ATT CTC GCG AAT TTG GTT TTC C-3'

RNAi-ExonVII 5'-CCT GAT CCG GAG TCT TTT GGT TTT AAT CCA TTC AAT-3'

pTV2 sense 5'-CCT CTA CAT CAA CAG GCT TCC-3'

pTV2 anti 5'-GAG CAA TAG TAC AGA GAG GGA GAG-3'

Sap47-A-sense 5'-CAC ATC TGT GGA GGC CAC-3'

Sap47-A-anti 5'-GTG GCC TCC ACA GAT GTG-3'

Sap47-B-sense 5'-CGA TGC CAT CGA TAC CAT-3'

Sap47-C-sense 5'-TTC TTG TCA TCG GCC ATC-3'

Sap47-D-sense 5'-TTT AGC TAC GAC ACC GCC-3'

Sap47anti/NotI 5'-AAA TAG CGG CCG CTT TCG GGC CTA ACA AAT C-3'

SapI ORF Not-anti 5'-CAA GCG GCC GCT TAC TTT AAA TCA TCG GTA TCC TC-3'

SapI ORF Sac-sense 5'-CCA CTG AGC TCA TGT TTT CGG GCC TAA GAA ATC-3'

Linker-Oligonukleotide (alle von MWG)

SAP47GTMKpn2I-sense 5'-CCG GTA GGG ATA ACA GGG TAA T-3'

SAP47GTMKpn2I-anti 5'-CCG GAT TAC CCT GTT ATC CCT A-3'

SAP47GTMSalI-sense 5'-TCG ATA GGG ATA ACA GGG TAA T-3'

SAP47GTMSalI-anti 5'-TCG AAT TAC CCT GTT ATC CCT A-3'

pKS-SalI-EcoRIsense 5'-TCG AAA GCT TTC GCG ATG ATA TCG-3'

pKS-SalI-EcoRIanti 5'-AAT TCG ATA TCA TCG CGA AAG CTT-3'

Immunglobuline

MAK nc46 (A. Hofbauer)
MAK nb200/7 (A. Hofbauer)
MAK ab49 (A. Hofbauer)
Goat α -mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate (BIO-RAD)
Goat α -rabbit IgG HRP-Conjugate (Sigma)

Reaktionskits und Säulen

ECL Western blotting detection reagents	Amersham
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN
QIAgen Plasmid Mega Kit	QIAGEN
QIAgen Plasmid Midi Kit	QIAGEN
Hexa Label DNA Labeling Kit	MBI Fermentas
DNA Sequencing Kit/ ABI PRISM	Perkin Elmer
VECTASTAIN Peroxidase Mouse IgG ABC-Kit	Vector Laboratoris
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratoris
TALON Metal Affinity Resin	Clontech

Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von verschiedenen Herstellern (AppliChem, BD Biosciences, Boehringer, Gibco BRL, ICN Biomedicals, Invitrogen, Merck, Roth, Serva und Sigma) bezogen. Weiterhin wurden Enzyme von den Firmen Amersham Biosciences, Gibco BRL, MBI Fermentas, New England BioLabs, PEQLAB, Promega, Roche, Sigma und Stratagene verwendet.

Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen wurde dem Laborhandbuch Sambrook et. al., 1989 entnommen oder entspricht den Angaben in den jeweiligen Reaktionskit-Protokollen bzw. den angegebenen Referenzen. Lösungen, die dort nicht angegeben sind oder zur Optimierung verändert wurden sind unten angegeben:

2x Laemmli Probenpuffer	125 mM Tris, pH 6,8 6% Glycerin 2% SDS 0,025% Bromphenolblau 5% 2-Mercaptoethanol
10xTBST	100 mM Tris, pH7,6 1,5 M NaCl

	0,5% Tween 20
IP-Puffer	50 mM KCl 10 mM HEPES, pH 7,4 2 mM MgCl ₂ 1% Triton X-100 frisch zugeben: 0,5 mM PMSF 1x Proteasen-Inhibitoren-Coctail, complete, EDTA-free (Roche)
IP-Waschpuffer	50 mM KCl 10 mM HEPES, pH 7,4 2 mM MgCl ₂ 0,1% Triton X-100 frisch zugeben: 0,5 mM PMSF 1x Proteasen-Inhibitoren-Coctail, complete, EDTA-free (Roche)
Ca ²⁺ -freie Saline	7,6 g NaCl 12,32 g Sucrose 0,37 g KCl 0,38 g MgCl ₂ 1,3 g HEPES 0,19 g EGTA ad 1l dH ₂ O
PBS	1,48 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 0,43 g KH ₂ PO ₄ 7,2 g NaCl ad 1l dH ₂ O, pH 7,4-7,6 einstellen
PBST	PBS plus 0,1% Triton X-100
STET-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 8% Sucrose 50 mM EDTA 5% Triton X-100
<i>Drosophila</i> -Homogenisierungspuffer	0,1 M NaCl 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 50 mM EDTA 0,5% SDS

3. Methoden

Bakterienkulturen

Die Grundprinzipien der Arbeit mit Bakterien (*E. coli*) sowie die Zusammensetzung der Medien und Antibiotika-Stocklösungen wurden aus dem Laborhandbuch (Sambrook et. al., 1989) entnommen.

Molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden (DNA-Verdau, DNA-Gelelektrophorese, Ligation, Southern Blot, PCR usw.) wurden aus Sambrook et. al., 1989 übernommen. Bei Verwendung von Enzymen und Reaktionskits wurden die Angaben der jeweiligen Protokolle befolgt.

DNA-Präparative Methoden

Alkalische Plasmid-DNA Minipräparation aus *E. coli* wurde nach der Methode von Birnboim und Doly, 1979 durchgeführt.

Plasmid-DNA Großpräparationen erfolgten nach dem QIAGEN Protokoll für QIAGEN Plasmid Midi bzw. QIAGEN Plasmid Mega Kits.

Bei der Gewinnung der DNA-Fragmente aus Agarose Gelen wurde das Protokoll für den QIAquick Gelextraction Kit befolgt.

Genomische DNA aus *Drosophila melanogaster* wurde mit Hilfe der Kaliumacetat-Methode wie folgt isoliert:

100 Tiere wurden in 2 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (s. Material) homogenisiert, das Homogenat 30 min bei 68°C inkubiert und die Proteine mit 0,3 ml 8 M K-Acetat 45 min auf Eis gefällt. Das Homogenat wurde zweimal je 10 min zentrifugiert und der Überstand mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl TE, pH 8.0 gelöst.

Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA Fragmenten erfolgte mit Hilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) nach der modifizierten Didesoxynukleotid-Strangabbruchmethode (Sanger, 1977). Dabei wurde die Angaben des Herstellers befolgt. Die Ansätze wurden anschließend im ABIprism Sequencer von Perkin Elmer analysiert.

Markierung von DNA Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit dem Hexa Label DNA Labeling Kit (MBI Fermentas) durch den Einbau radioaktiven [α -³²P]-dCTPs (Amersham) durchgeführt. Die Markierung verlief nach dem Protokoll des Herstellers, dabei wurde auf die Zugabe von nicht radioaktiv markierten dNTP Mixes verzichtet und die Inkubationszeit von 10 min auf 1 h verlängert.

Proteinchemische Methoden

SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Durchführung der SDS-PAGE sowie die Zusammensetzung der benötigten Puffer und Lösungen wurde aus Bollag et. al., 1996 übernommen. Zur Elektrophorese wurden 10 und 12,5%-ige Acrylamidgele verwendet. Zur Probenherstellung wurde 2xLaemmli Probenpuffer verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen aufs Gel 5 min bei 68 °C denaturiert. Zur Elektrophorese wurde Minigel-Twin System (Whatman Biometra) benutzt.

Färbung der Gele mit Coomassie Blue und Silbernitrat

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine im Gel angefärbt. Die Färbung mit Coomassie Blue wurde aus Bollag et al., 1996 entnommen.

Proteinfärbung mit Silbernitrat erfolgte wie folgt:

Nach der Elektrophorese wird das Gel ÜN in 30% EtOH, 10% Essigsäure bei RT inkubiert, danach zweimal je 30 min mit 30%EtOH und dreimal je 10 min mit dH₂O gewaschen. Nach der 30 min Inkubation mit 0,1% AgNO₃ Lösung (in dH₂O) wird das Gel gründlich mit Wasser gewaschen. Durch Zugabe von 2,5% Natriumcarbonat, 0,02% Formaldehyd werden Proteinbanden nach einigen Minuten sichtbar gemacht. Die Färbereaktion wird anschließend mit 1% Essigsäure abgestoppt und das Gel im Wasser gewaschen.

Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe eines Semi-Dry-Blotting Verfahrens (Khyse-Anderson, 1984) auf eine Nitrocellulose Transfer Membran (45 µm, Schleicher & Schuell) überführt. Das Blotting erfolgte mit Hilfe des Semi-Dry-Electroblotters der Firma PEQLAB. Nach dem Blotten wurde die Membran in 5% Milchpulver geblockt. Die Verdünnung von Antikörpern erfolgte in 1xTBST. Zum Nachweis der Proteine wurden die „ECL Western blotting detection reagents“ (Amersham) verwendet.

Induktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen

Zur Herstellung von rekombinanten Proteinen wurde das pET-28a-c(+) System der Firma Novagen verwendet. Die Induktion der Proteinsynthese erfolgte in BL21 Flüssigkultur durch Zugabe von IPTG. Die Synthese verlief bei 37°C.

Zur Aufreinigung der Proteine wurde das TALON Metal Affinity Resin System von Clontech benutzt. Die Aufreinigung verlief unter den nichtdenaturierenden Bedingungen nach dem Protokoll des Herstellers.

Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation wurde mit Hilfe von Protein A Agarose Beads (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Dafür wurden zunächst Fliegenköpfe im IP-Puffer homogenisiert (s. Puffer und Lösungen) und das Homogenat ÜN mit dem Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von 40 µl Protein A Agarose Beads und 2 h Inkubation bei RT wurde der Ansatz mehrmals mit IP-Waschpuffer gewaschen, die Beads in 20 µl 2xLaemmli gelöst und mittels SDS-PAGE und Western Blots analysiert.

Immunhistochemische Methoden

Immunhistochemie an Kryostatschnitten von *Drosophila melanogaster*

Die Kryostatschnitte adulter *Drosophila* Köpfe wurden wie bei Buchner et al. (1986) beschrieben angefertigt. Die Färbung erfolgte mit VECTASTAIN Peroxidase Mouse IgG ABC-Kit und DAB Peroxidase Substrate Kit nach den Protokollangaben des Herstellers.

Larvales Nerv-Muskel Präparat von *Drosophila melanogaster*

Die 3. Instar-Larven wurden in Ca^{2+} -freier Saline präpariert und in 4% Paraformaldehydlösung 30 min bei RT fixiert. Das Blocken erfolgte in 1,5% normalem Pferdeserum in PBST (0,1% Triton X-100). Die Larven wurden ÜN bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei RT nach Herstellerangaben mit dem VECTASTAIN ABC Kit durchgeführt. Die Färbereaktion erfolgte nach Protokoll mit dem DAB Peroxidase Substrate Kit.

Yeast-Two-Hybrid

Das Yeast-Two-Hybrid System stellt ein Verfahren dar, welches die Eigenschaften des GAL4-Proteins aus der *Saccharomyces cerevisiae* nutzt, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* festzustellen. In der Hefe wird die Aktivität der Gene, deren Produkte für den Galaktosemetabolismus zuständig sind, durch GAL4 und GAL80 reguliert (Guthrie & Fink, 1991; Heslot & Gaillardin, 1992). Die Kontrolle findet über die enhancerähnliche stromaufwärts-Aktivatorsequenz UAS_G . Das GAL4 Protein übt mehrere Funktionen aus, die sich auf verschiedenen Domänen des Proteins lokalisieren lassen. Die N-terminale DNA-Bindungsdomäne bindet spezifisch an die GAL1UAS-Sequenz, die C-terminale Transaktivierungsdomäne ist für die Aktivierung der Transkription zuständig. Die beiden Domänen sind voneinander trennbar, eine Eigenschaft, die das Yeast-Two-Hybrid System ausnutzt. Es wurden mehrere Hefe-Stämme entwickelt, die selber kein GAL4 mehr produzieren, sowie eine ganze Reihe an unterschiedlichsten Expressionsvektoren, welche unter anderem für eine der beiden Domänen des GAL4 Proteins kodieren. So kodiert z. B. der pAS2-1 Vektor, welcher auch in Laufe dieser Arbeit verwendet wurde, für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne, der pACT-2 Vektor für die GAL4-Aktivierungsdomäne. Kloniert man eine Polypeptid kodierende DNA-Sequenz, die man untersuchen möchte, in die MCS des pAS2-1 Vektors, entsteht in der Hefe ein Fusionsprotein (sog. molekularer „Köder“), das die GAL4-DNA-Bindungsdomäne am N-terminus und das Polypeptid (=Protein) der Wahl (X) am C-terminus trägt. Das Fusionsprotein bindet an die in der Hefe vorhandene GAL1UAS. Allerdings können die unter der Kontrolle von GAL1UAS stehende Reportergene (in unserem Fall *lacZ* und *HIS3*) nicht aktiviert werden, da die Transaktivierungsdomäne fehlt. Analog kann eine beliebige DNA-Sequenz in den pACT-2 Expressionsvektor kloniert werden. In der Hefe entsteht dann ein zweites Fusionsprotein (sog. molekulare „Beute“), das die GAL4 Aktivierungsdomäne und das gewünschte Protein Y trägt. Allerdings kann das Protein von alleine nicht an DNA binden.

Bringt man beide Proteine in eine Hefe-Zelle zusammen, kann es dazu kommen, dass die beide Proteine X und Y miteinander interagieren. Dadurch werden die Reportergene aktiviert,

was durch Selektion der Klone auf histidinfreiem Medium sowie einen β -Galaktosidase Test nachgewiesen werden kann.

Anstatt einer bestimmten cDNA kann eine ganze cDNA-Bibliothek in den pACT-2 Expressionsvektor inkloniert werden. Durch die gemeinsame Transformation der Bibliothek und des pAS2-1 Vektors (mit dem Insert der Wahl) kann man Interaktionspartner aus der Bibliothek „fischen“.

CytoTrap Two-Hybrid System

Das CytoTrap Two-Hybrid Verfahren der Firma Stratagene stellt eine modifizierte Form des „klassischen“ Two-Hybrid Systems dar und basiert auf der Herstellung von zwei Fusionsproteinen („Köder“ und „Beute“) deren Interaktion im Cytoplasma der Hefe-Zellen zur Aktivierung der „Ras-signaling“ Proteinkaskade führt. Durch diese Kaskade wird anschließend das Zellwachstum induziert, was auch das Selektionskriterium dieser Methode ist.

Für das Verfahren wird der temperatursensitive *cdc25H* Stamm von *S. cerevisiae* benutzt, welcher eine Punktmutation in dem *cdc25* Gen trägt (*cdc* = cell division control). Diese Mutation äußert sich dadurch, dass die Zellen nur bei den Temperaturen im Bereich 22-25°C wachsen können. Wird die Temperatur erhöht, stellen die Zellen ihr Wachstum ein und sterben.

Das CDC25 Protein ist Hefe-Homolog zum humanen SOS, welches einen „guanyl nukleotide exchange“ Faktor darstellt, an Ras bindet und dadurch die „Ras-signaling“ Kaskade aktiviert. Das hSOS Protein ist imstande die *cdc25* Mutation der Hefe zu retten und den „Ras-signaling Pathway“ der Hefe zu aktivieren. Durch Fusion des hSOS Proteins mit dem Polypeptid der Wahl erhält man das „Köder“-Fusionsprotein. Um den „Ras-signaling Pathway“ zu aktivieren muss der „Köder“ allerdings an die Plasmamembran der Zelle gebracht werden.

Das „Beute“ Fusionsprotein enthält die Aminosäuresequenz eines beliebigen Proteins fusioniert an ein Myristylierungs-Signal, das die „Beute“ in der Plasmamembran verankert. Findet eine Interaktion zwischen dem „Köder“ und der „Beute“ statt, wird der „Köder“ in die Nähe der Plasmamembran gebracht und der hSOS-Anteil des „Köders“ aktiviert Ras-Kaskade. Dadurch wird die Temperatursensitivität der Zellen aufgehoben so dass sie auch bei höheren Temperaturen (37°C) wachsen können.

Methoden für den Umgang mit Hefe

Der Großteil der Methoden für den Umgang mit Hefe-Zellen sowie die Zusammensetzung von Medien und Lösungen wurden aus dem Yeast Protocols Handbook (Clontech) und dem CytoTrap Vector Kit Handbook (Stratagene) übernommen. Die cDNA Transformation im Bibliothekenmaßstab erfolgte nach dem 2 Hybrid System TRAF0 Protokoll (frei zugänglich unter <http://www.umanitoba.ca/academic/faculties/medicina/biochem/gietz/2hs.html>).

Plasmidtransformation in die Hefezellen

Plasmidtransformation in die Hefe erfolgte nach dem modifizierten Quick and Easy TRAF0 Protokoll von Gietz and Woods (1994) (frei zugänglich unter http://www.umanitoba.ca/faculties/...ts/human_genetics/gietz.Quick.html).

5-10 ml Flüssigkultur mit Einzelkolonie animpfen und max. 16 h bei 30°C, 200 rpm wachsen lassen. Pro Transformationsansatz wird 1 ml Kultur pelletiert und die LiAc Transformation durchgeführt (nach dem Quick and Easy TRAF0 Protokoll von Gietz and Woods, ab Punkt 2).

Proteinextraktion aus den Hefezellen

Die Zellen einer 25 ml Flüssigkultur ($OD_{600} = 0,9-1$) 5 min pelletieren, mit dH_2O waschen und in 0,5 ml eiskaltem 2xLaemmli Puffer (frisch zugeben: 0,5 mM PMSF und 0,5 mM Benzamidin) resuspendieren. Nach der Zugabe von ca. 0,5 ml säuregewaschenen Glass Beads (Sigma) werden die Zellen durch 4x45 sec vortexen mit je 30 sec Pause auf Eis aufgebrochen. Nach dem Zentrifugieren kann das Proteinextrakt mittels SDS-PAGE analysiert werden.

Plasmid-DNA Minipräparation aus der Hefe

Die Plasmid-DNA Präparation aus der Hefe wurde nach dem modifizierten Protokoll von Robzyk und Kassir, 1992, durchgeführt.

Die Zellen einer 2 ml Hefekultur (hochziehen ÜN) werden in 0,1 ml STET-Puffer resuspendiert, ca. 0,1 ml säuregewaschene Glass Beads (Sigma) zugegeben und der Ansatz wird 5 min bei 4°C in IKA-Vibrax-VXR (Janke&Kunkel) gevotext. Nach der erneuten Zugabe von 0,1 ml STET-Puffer wird die Probe für 3 min bei 94°C aufgeköcht und 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird nach Zugabe von 85 μ l 7,5 M Ammonium Acetat 30 min bei -20°C inkubiert und 10 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird anschließend mit 0,5 ml eiskaltem Ethanol gefällt und nach dem Waschen in 20 μ l TE, pH 8,0 gelöst.

4. Ergebnisse

4.1. Mutagenese des *Sap47*- Gens aus *Drosophila melanogaster*

Um das *Sap47*-Gen aus *D. melanogaster* zu mutagenesieren, wurden zwei verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen:

1. Gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination (nach Kent G. Golic);
2. Gezielte Unterdrückung der Funktion des *Sap47*-Gens mittels RNA interference (RNAi)

4.1.1. Gezielte Mutagenese des *Sap47*-Gens durch homologe Rekombination

Die gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination wird bereits seit Jahren erfolgreich bei der Hefe und Maus eingesetzt. Seit kurzem (Rong & Golic, 2000) wird dieses Verfahren auch zur Modifizierung des *Drosophila*-Genoms angewendet (näheres: s. Einleitung).

Da das kritischste Moment, das die Effizienz dieser Methode beeinflusst, die Länge der „donor:target“ Homologie ist, die möglichst ≥ 4 kb sein soll (Kent G. Golic, persönliche Mitteilung), wurden zwei unterschiedlich große (ca. 5 und 7,6 kb) Bereiche des *Sap47*-Gens für die Mutagenese ausgewählt.

5 kb *Sap47* genomisches Fragment

Um das *Sap47*-Gen von *D. melanogaster* zu mutieren wurde zunächst ein Donor-Konstrukt wie folgt kloniert:

1. Restriktionsverdau des genomischen Phagens Φ IV (Becker, 1997) mit *Bam*HI und *Asp*718 (*Kpn*I), Isolierung des entstehenden 5 056 bp großen Fragmentes und Klonierung in den mit *Bam*HI und *Asp*718 (*Kpn*I) geschnittenen pKS-Vektor. Amplifikation des Produktes in *E. coli*.

2. Restriktionsverdau des Amplifikates mit *Kpn*2I und Religation unter Einfügen der *I* *Sce*-I Meganuklease Erkennungssequenz (5'- TAG GGA TAA CAG GGT AAT – 3'). Die Erkennungssequenz stellt ein Produkt der Hybridisierung zweier von MWG synthetisierten Oligonukleotide SAP47GTMKpn2I-sense und SAP47GTMKpn2I-anti (s. Material) dar. Vermehrung in *E. coli*.

3. Restriktionsverdau des Produktes aus dem Schritt 2 mit *Asp718* (*KpnI*) und *NotI*, Isolierung des ca. 5 kb großen Insert-Fragmentes und Ligation des Fragmentes mit dem entsprechend geschnittenen pTV2 Vektor. Amplifikation des Produktes in *E. coli*.

Das auf diese Weise fertig gestellte Donor-Konstrukt ist in der Abbildung 4.1 dargestellt.

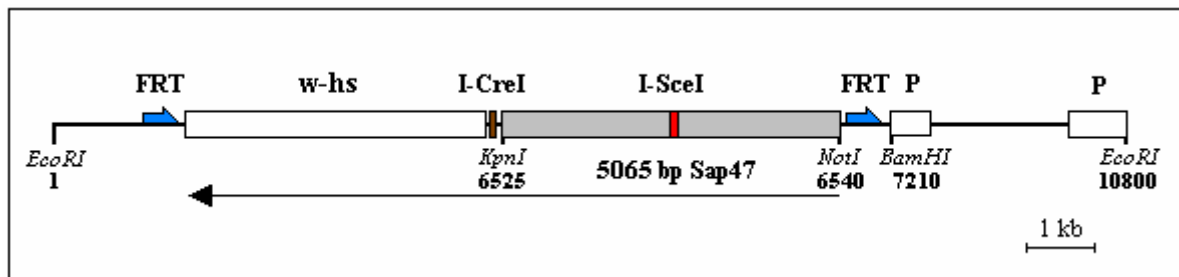


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Donor-Konstruktes für die gezielte Mutagenese durch die homologe Rekombination. Der *Sap47* genomische Bereich befindet sich zwischen den *KpnI* (6525) und *NotI* (6540) Erkennungssequenzen des pTV2 Vektors.

Der genomische Bereich des *Sap47*-Gens (in der Abb. 4.1 grau dargestellt) erstreckt sich über eine Länge von 5065 bp (von der Position 11 866 (*BamHI* Schnittstelle) bis 16 931 (*KpnI* Schnittstelle) des *Sap47*-Gens) und umfasst ein ca. 4,6 kb großes 3'-Fragment des Introns 1, das vollständige Exon II und ein ca. 200 bp großes 5'-Fragment des Introns 2 (*Sap47*-Genorganisation nach Becker, 1997). In die Mitte (Position 13 979 des *Sap47*-Gens) wurde eine *I Sce-I* Meganuclease Erkennungssequenz (in der Abb. 4.1 rot dargestellt) über die *Kpn2I* Schnittstelle eingebracht. Das genomische Fragment befindet sich in dem pTV2-Transformationsvektor, welcher ein *white*-Gen (in der Abb. 4.1 als weiße Kasette mit der Bezeichnung w-hs dargestellt) und zwei FRT-sites (blau) enthält. Das Konstrukt wurde anschließend in w^{1118} Embryonen injiziert und die injizierten Tiere wie in der Abb. 4.2 dargestellt weiter gekreuzt.

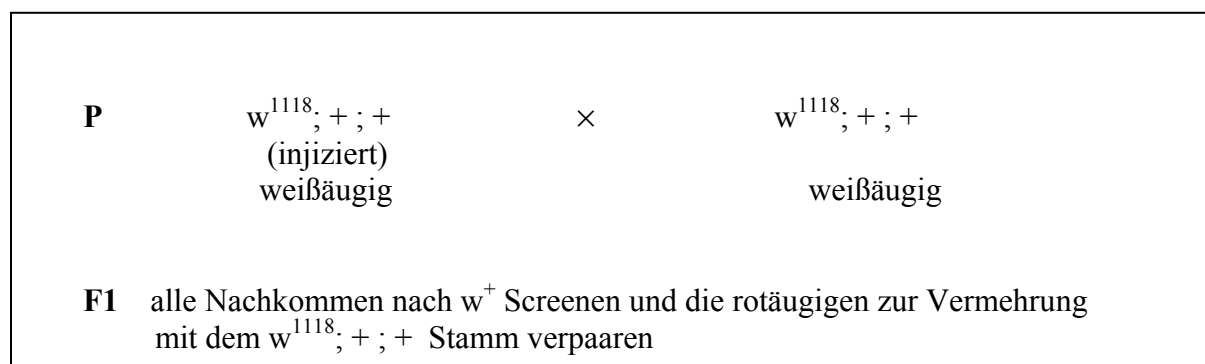


Abb. 4.2: Kreuzungsschema der injizierten Tiere. Die injizierten Fliegen haben weiße Augen, tragen aber möglicherweise in ihrer Keimbahn das injizierte P-Element. Dieses kann durch die rote Augenfarbe der F1 Generation erkannt werden.

Auf diese Weise wurden vier unabhängige Transformantenlinien isoliert. Durch Kreuzungen mit dem $w^{1118}; +; +$ Wildtyp und dem $w^{-}; +; \frac{TM3 Sb, e}{TM6 Tb, e}$ Balancer-Stamm (s. Abb. 4.3) hat sich herausgestellt, dass zwei der vier Linien die Insertion auf dem I. und die zwei anderen auf dem II. Chromosom tragen.

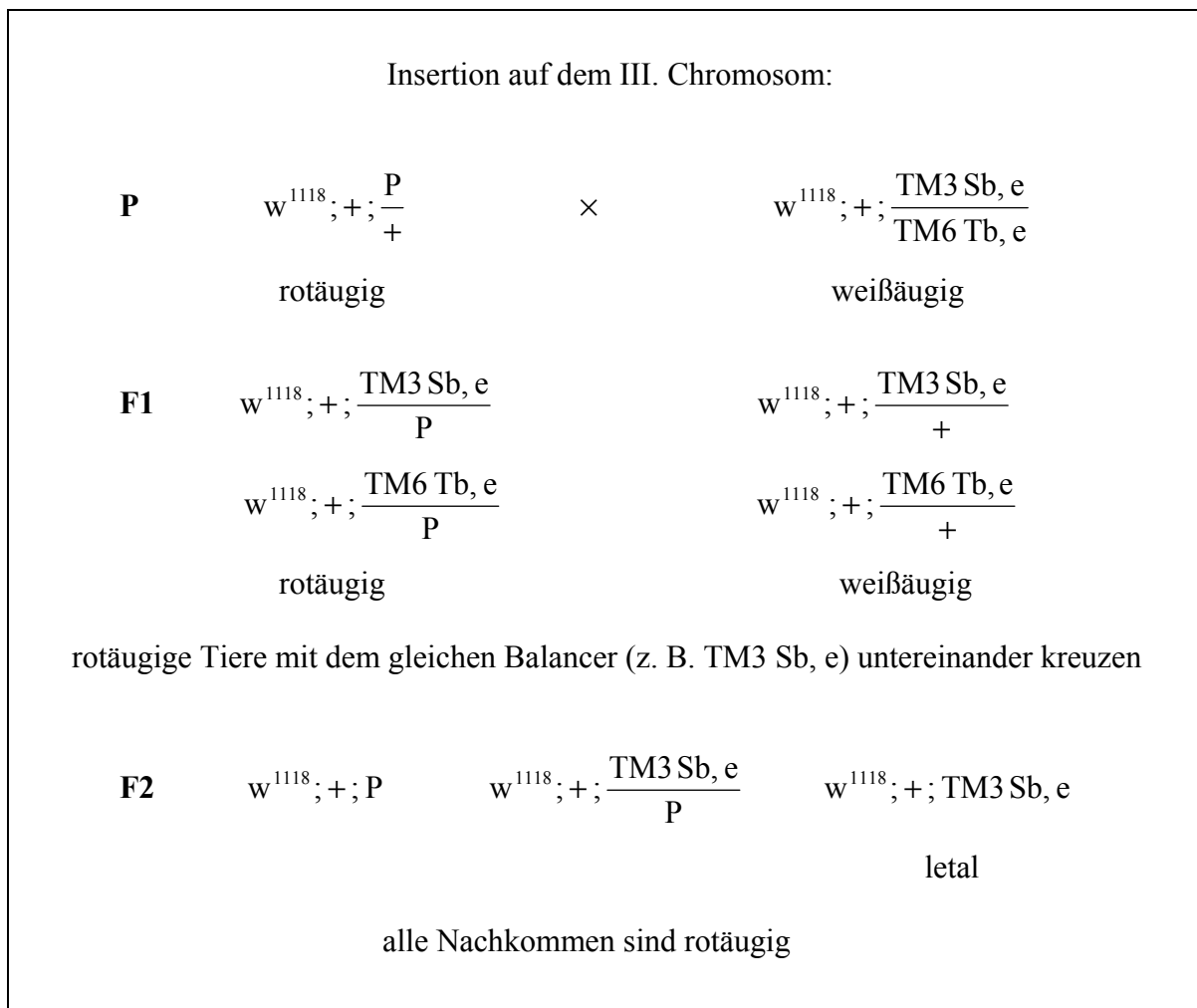


Abb. 4.3: Dargestellt ist das Kreuzungsschema mit dem w - Doppelbalancer Stamm für das dritte Chromosom zur Kartierung von P-Element Insertionen (näheres s. Text).

Die Transformante (rotäugig) wurde mit einer Doppelbalancer-Linie (weißäugig) für das Dritte Chromosom gekreuzt und die rotäugigen Nachkommen (F1) mit dem gleichen Balancer untereinander verpaart. Liegt die Insertion auf dem dritten Chromosom, haben alle Nachkommen (F2) rote Augen, da die homozygote Balancer Kombination letal ist. Bei der Insertion auf dem zweiten Chromosom kommen in der F2-Generation auch die weißäugigen Individuen raus. Insertionen auf dem X-Chromosom werden durch Rückkreuzung von rotäugigen transgenen Männchen mit den w^{1118} Weibchen erkannt. In diesem Fall ist die

Vererbung der Augenfarbe geschlechtsgebunden: alle weibliche F1 Tiere haben rote Augenfarbe, der männliche Teil der Nachkommen ist dagegen weißäugig. Die Insertionen auf den Y-Chromosom und dem Chromosom IV sind aufgrund deren geringen Größe sehr unwahrscheinlich.

Die transgene Tiere wurden einer Testkreuzung mit FLP/I-SceI Fliegen unterzogen (s. auch Abb. 4.4, P und F1) und die Augenfarbe der Nachkommen analysiert. Man erwartet in der F1-Generation Mosaik-Tiere, die sich durch die rot-weiß gefleckte bzw. weiße Augen auszeichnen. Die Ergebnisse dieser Kreuzung sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	Insertions-chromosom	Genotyp der Nachkommen	Phänotyp der Nachkommen
1	I	$\frac{w^- P[sap47, w^+]}{w^- v^- / \neg}$, $\frac{[ry^+, 70FLP][v^+, 70I - SceI] Sco}{+}$; $\frac{+}{ry^-}$	lebensfähig, rot-weiße Augen
2	I	$\frac{w^- P[sap47, w^+]}{w^- v^- / \neg}$, $\frac{[ry^+, 70FLP][v^+, 70I - SceI] Sco}{+}$; $\frac{+}{ry^-}$	lebensfähig, alle rotäugig (keine Mosaik-Tiere)
3	II	$\frac{w^-}{w^- v^- / \neg}$, $\frac{[ry^+, 70FLP][v^+, 70I - SceI] Sco}{P[sap47, w^+]}$; $\frac{+}{ry^-}$	lebensfähig, rot-weiße Augen
4	II	$\frac{w^-}{w^- v^- / \neg}$; $\frac{[ry^+, 70FLP][v^+, 70I - SceI] Sco}{P[sap47, w^+]}$; $\frac{+}{ry^-}$	letal

Tabelle 1: Ergebnisse einer Testkreuzung mit FLP/I-SceI Stamm. Bei den Nachkommen handelt es sich um die F1 Generation. In der ersten Spalte ist Nummer der transgenen Linien zu sehen.

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, haben sich nur zwei der vier Linien (Nr. 1 und 3) als verwendbar erwiesen. Diese wurden für die Mutagenese eingesetzt.

Die Mutagenese verlief nach dem folgenden Schema (als Beispiel nur für X. Chromosom):

P	w^- , P[sap47, w^+]; +; +	×	$\frac{w^- v^-}{-}$; $\frac{[ry^+, 70FLP][v^+, 70I - SceI] Sco}{SM6}$; ry^-
	rotäugige vir. ♀♀♀		weißäugige ♂♂♂
F1	$\frac{w^- P[sap47, w^+]}{w^- v^- / -}$; $\frac{[ry^+, 70FLP][v^+, 70I - SceI] Sco}{+}$; $\frac{+}{ry^-}$	×	w^- ; +; $\frac{TM3 Sb}{TM6 Tb}$
	(HS in dem 1. Larvenstadium) rot-weiß gefleckte bzw. weißäugige vir. ♀♀♀		weißäugige ♂♂♂
F2	Nachkommen nach w^+ screenen und mit w^- ; +; $\frac{TM3 Sb, e}{TM6 Tb, e}$ kreuzen		
F3	Screenen nach w^+ auf dem III. Chromosom		

Abb. 4.4: Ablauf der gezielten Mutagenese durch homologe Rekombination mit dem ca. 5 kb großen genomischen Fragment des *Sap47*-Gens. Die Kreuzungen für das II. Chromosom verliefen analog.

Die für das P[Sap47, w^+] Donor-Transgen homozygote Tiere wurden mit dem FLP/I-SceI Fliegenstamm gekreuzt und die Nachkommen (F1) früh in der Entwicklung (= 1. Larvenstadium) 1 Stunde im 37°C Raum hitzegeschockt. Zur weiteren Kreuzung wurden nur die F1-Tiere mit rot-weiß gefleckten bzw. weißen Augen genommen und mit dem weißäugigen Doppelbalancer Stamm für das dritte Chromosom verpaart. Alle Nachkommen der F2 Generation wurden nach die Augenfarbe selektioniert und die rotäugige Tiere (= mögliche „Kandidaten“ für die homologe Rekombination) weiter mit w^- ; +; $\frac{TM3 Sb, e}{TM6 Tb, e}$ Doppelbalancer gekreuzt. Anschließend folgte die Selektion nach den Tieren, die das mit dem w^+ gekennzeichnete Donorkonstrukt auf dem dritten Chromosom tragen. Die Ergebnisse der Mutagenese sind in der Tabelle 2 zu sehen.

Chromosom	Weibliche Keimbahn			Männliche Keimbahn		
	N	T	NT	N	T	NT
X	1 733	0	0	182	0	0
II	210	0	1	104	0	0
Total: 2 229 Tiere (F1) => ca. 280 000 Nachkommen (F2)						

Tabelle 2: Ergebnisse der gezielten Mutagenese mit dem 5 056 bp großen genomischen Fragment des *Sap47* Gens. Weibliche und Männliche Keimbahn sind separat dargestellt. N: die Anzahl der zur Mutagenese verwendeten F1 Tiere; T: Anzahl der F2 Nachkommen mit homologer Rekombination; NT: Anzahl der F2 Tiere mit nichthomologer Rekombination.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, verlief die gezielte Mutagenese des *Sap47*-Gens ohne Erfolg. Bei keinem der ca. 280 000 Nachkommen der F2 Generation wurde homologe Rekombination im *Sap47* Genlokus beobachtet. Es wurde auch nur ein einziges Individuum mit nichthomologer Rekombination gefunden. In diesem Fall fand eine Mobilisierung des Donors vom Chromosom II (ursprünglichen Insertionsort) auf das X. Chromosom statt. Diese Linie wurde aber nicht weiter untersucht.

7,6 kb *Sap47* genomisches Fragment

Der entscheidende Faktor bei der Effizienz der homologen Rekombination ist die Länge des homologen Bereiches im Donor-Konstrukt. Die Erfolgsrate steigert sich rasant mit der Länge des Donors und kann bei den Konstrukten mit ca. 8 kb großer „donor:target“ Homologie im Durchschnitt ca. 1 homologes Rekombinationsereignis in 2000 Gameten erreichen (Rong et al., 2002).

Aus diesem Grund wurde ein zweites Donor-Konstrukt für *Sap47* fertig gestellt und für eine „gene targeting“ Mutagenese verwendet. Die „donor:target“ Homologie dieses Konstruktes erstreckt sich über eine Länge von ca. 7,6 kb (Bereich zwischen zwei *BamHI* Erkennungssequenzen an der Positionen 11 866 und 19 500 des *Sap47*-Gens) und umfasst ein ca. 4,6 kb großes 3'-Fragment des Introns 1, die vollständigen Exons II und III sowie Introns 2 und 3 und 35 Basen aus dem Exon IV (*Sap47*-Genomorganisation nach Becker, 1997). Der Aufbau des Konstruktes ist in der Abb. 4.5 zu sehen.

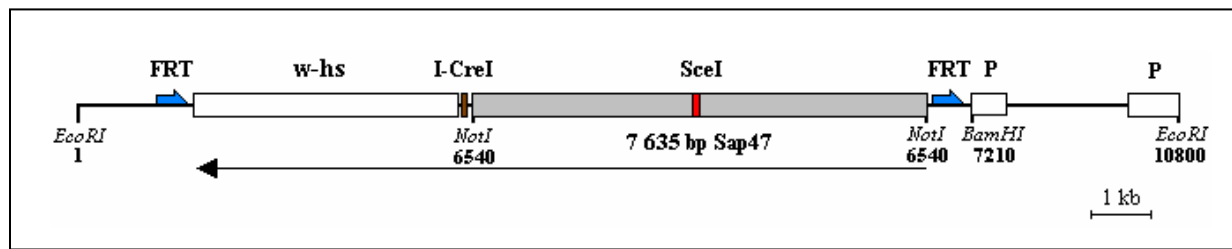


Abb. 4.5: Schematische Darstellung des Donor-Konstruktes mit der 7 635 bp großen „donor-target“ Homologie. Der genomische Bereich des *Sap47*-Gens befindet sich zwischen den *NotI* Schnittstellen des Vektors und ist als graue Kasette dargestellt; *I-SceI* Erkennungssequenz ist in rot und beide FRT Stellen in blau zu sehen. Der Vektor trägt einen w^+ Marker, gekennzeichnet als w-hs.

Das Konstrukt wurde wie folgt fertig kloniert:

1. Schneiden des pBS(*NotI*)-Plasmids (modifizierte pKS Vektor von Kent G. Golic. Das Plasmid enthält eine zusätzliche *NotI* Erkennungssequenz am 5'-Ende der MCS) mit *SallI*. Die Schnittstelle mit Hilfe von 5' Fill-In füllen und die Enden wieder zusammenfügen. Nach der Amplifikation der Ligationsprodukte in *E. coli* werden sie durch *SallI* und *BamHI* Probeverdau auf das Vorhandensein der *SallI* Schnittstelle überprüft. Das auf diese Weise entstandene modifizierte pBS(*NotI*) Plasmid wurde als pBS(*NotI*) Δ *SallI* gekennzeichnet.
2. pBS(*NotI*) Δ *SallI* Vektor mit *BamHI* schneiden und anschließend mit CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) 5' dephosphorylieren.
3. DNA der genomischen Phagen Φ IV (Becker, 1997) mit *BamHI* inkubieren und das ca. 7,6 kb großen *BamHI* Fragment des *Sap47*-Gens isolieren.
4. Fragmente aus den Schritten 2 und 3 durch eine Ligation zusammenfügen. Selektion und Vermehrung des Ligationsproduktes in *E. coli* (SURE2).
5. Klonierung der *I-SceI* Meganuklease Erkennungssequenz in die Mitte des 7,6 kb großen genomischen Fragmentes von *Sap47*: Das Produkt des Klonierungsschrittes 4 wurde mit *SallI* (Schnittstelle in der Position 15 862 des Gens) linealisiert und die 5'-Schnittenden mit CIAP dephosphoryliert. Die *I-SceI* Schnittstelle wurde durch die Hybridisierung zweier Oligonukleotide (SAP47GTMS*SallI*-sense und SAP47GTMS*SallI*-anti, s. auch Material) hergestellt und mit dem durch Schneiden mit *SallI* vorbereiteten Fragment ligiert. Selektion und Amplifikation des Ligationsproduktes erfolgte in *E. coli*. Durch Behandlung mit *I-SceI* Meganuklease wird der Erfolg der Ligation überprüft.

6. Das ca. 7,6 kb große genomische Fragment von *Sap47* mit der *I-SceI* Erkennungssequenz in der Mitte (Produkt aus dem Schritt 5) durch Schneiden mit *NotI* aus dem pBS(*NotI*) Δ *SaII* isolieren und in den mit *NotI* linealisierten pTV2 Transformationsvektor einbringen. Selektion und Amplifikation des Konstruktes in *E. coli*. Durch Probeverdau mit *EcoRI* wird die Orientierung des Insertes in den Ligationsprodukten bestimmt und das geeignete Donor-Konstrukt in die w^{1118} Embryonen injiziert.

Die Injektion von ca. 2000 Embryonen führte zur Isolierung von nur einer transgenen Linie.

Durch Kreuzen mit $w^{1118}; +; \frac{TM3 Sb, e}{TM6 Tb, e}$ Tieren (s. Abb. 4.3) wurde die Position des Donors

auf das III. Chromosom festgelegt.

Um das *Sap47*-Gen durch die homologe Rekombination zu mutieren wurden die transgene Tiere wie in der Abb. 4.6 dargestellt gekreuzt:

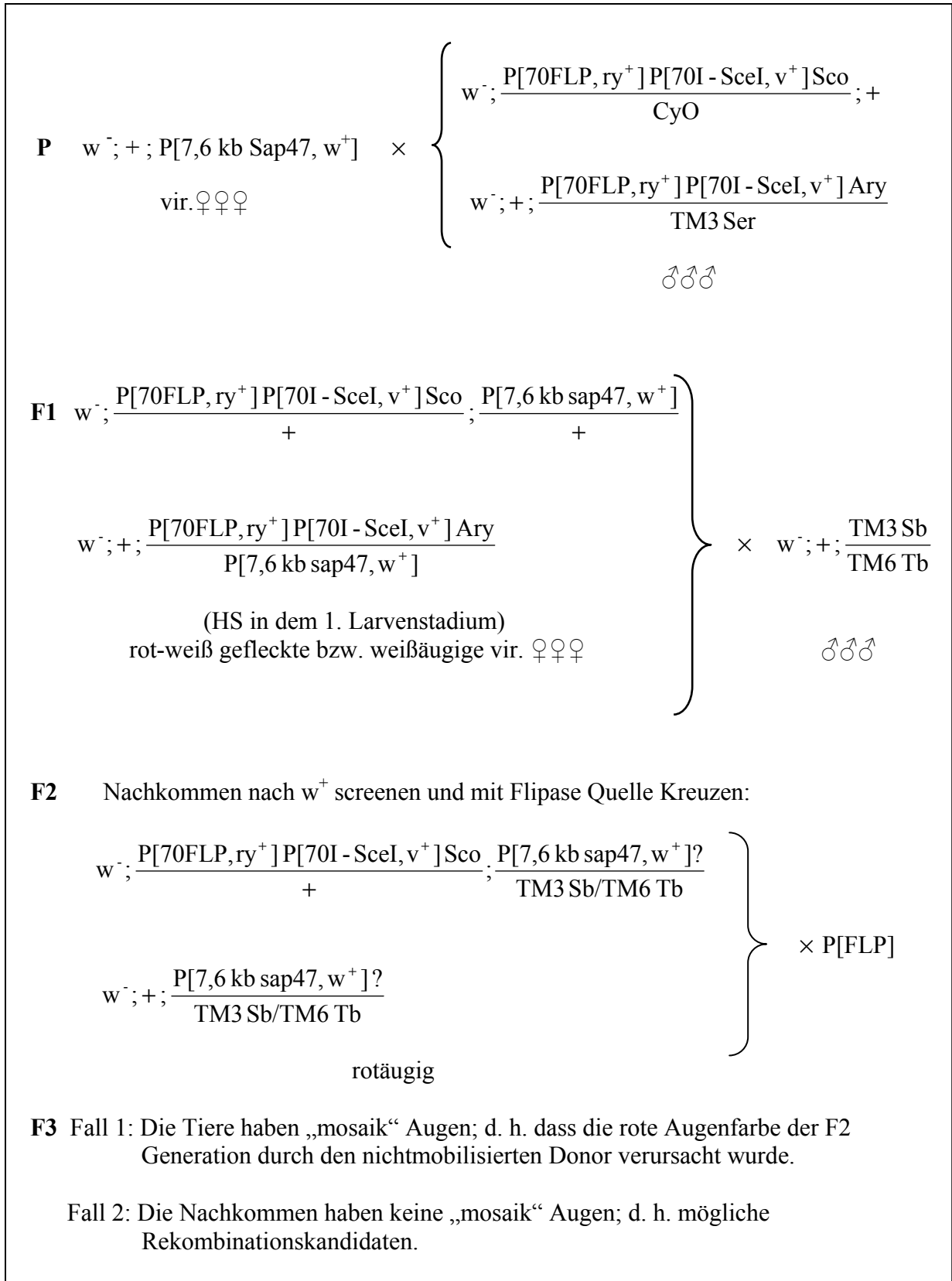


Abb. 4.6: Kreuzungsschema der „gene-targeting“ Mutagenese mit dem ca.7,6 kb großen genomischen Fragment des *Sap47*-Gens.

Die für das $P[7,6 \text{ kb Sap47}, w^+]$ Transgen homozygote Tiere wurden mit FLP/I-SceI Stämmen von Kent. G. Golic verpaart, früh in der Entwicklung (1. Larvenstadium) 1 Stunde

bei 37°C (Luft) hitzegeschockt und Adulte (F1) nach der Augenfarbe und Vorhandensein der FLP/I-SceI Transgene selektioniert. Die weißäugigen bzw. „mosaik“ Weibchen der F1 Generation wurden mit ♂ $w^{-}; +; \frac{TM3 Sb}{TM6 Tb}$ gekreuzt und die F2 Generation nach die rote Augenfarbe sortiert. Dieser Schritt wurde in Form von Massenkreuzungen durchgeführt. Dabei wurden je 6 weißäugige/„mosaik“ F1 Weibchen pro großes Breiglas (Durchmesser ca. 50 mm) eingesetzt. Es wurden insgesamt 1011 Tiere der F1 Generation weiter verpaart. Alle Tiere der F2 Generation wurden nach der Augenfarbe selektioniert und die rotäugigen Fliegen (unabhängig von dem Geschlecht) mit Flipase Quelle gekreuzt. Die rote Farbe der Augen bei der F2 Nachkommenschaft kann durch zwei Möglichkeiten verursacht werden. Die erste Möglichkeit wäre, dass die Tiere das ursprüngliche nichtmobilisierte Donor-Konstrukt im Genom tragen und dadurch ihre Augenfarbe erhalten („Hintergrund“ Fliegen). Die zweite Möglichkeit ist, dass der Donor nach dem rausrekombinieren aus dem Genom und anschließende homologe bzw. nichthomologe Rekombination eine neue Position besitzt und dadurch ebenfalls die rote Augenfarbe verursacht. Alle Tiere, die sich aus den F1-Keimzellen ohne Donor-Konstrukt entwickelt haben, besitzen auch keinen w^{+} Marker mehr und sind deswegen weißäugig.

Eine Kreuzung der rotäugigen „Kandidaten“ mit Flipase Quelle erlaubt es zwischen den „Hintergrund“ Tieren und den Fliegen mit echten Rekombinationsereignissen zu unterscheiden. Die nichtmobilisierten Konstrukte können auf diese Weise mobilisiert werden, man erhält Mosaik Nachkommen. Nach einem Rekombinationsereignis verliert der ursprüngliche Donor eine FRT Stelle und kann nicht mehr mobilisiert werden. Deswegen können die Nachkommen auch keine Mosaiken sein.

Leider führte das Screenen von ca. 125 000 Tieren der F2 Generation zum keinen positiven Ergebnis. Die Einzelkreuzungen mit Flipase Linie haben gezeigt, dass es sich bei allen rotäugigen F2 Fliegen um die „Hintergrund“ Tiere mit dem nicht mobilisierten Donor-Konstrukt handelte.

4.1.2. Versuche zur Ausschaltung der SAP47-Proteinexpression mit Hilfe von RNA interference (RNAi)

Als eine andere Strategie, die Expression von SAP47 zu unterdrücken, wurde die RNA interference eingesetzt (s. auch Einleitung). Diese Methode hat sich in den letzten Jahren als ziemlich effektiv erwiesen, allerdings ist es kaum möglich die Expression des gewünschten

Genprodukts vollständig (100%-ig) abzuschalten und es muss mit einem gewissen Prozent Restexpression gerechnet werden.

Um stabile Sap47 RNAi Linien zu erzeugen wurden zwei unterschiedliche Konstrukte hergestellt. Grundsätzlich gilt aber, dass die RNAi Konstrukte aus zwei Teilen bestehen: der erste Teil enthält (meistens) eine gewünschte Sequenz in der „sense“ Orientierung, der zweite Teil besteht aus dem dazugehörigen komplementären Fragment, so dass das Konstrukt im Endeffekt eine Art „inverted repeat“ darstellt.

Bei dem ersten RNAi Konstrukt für *Sap47* handelt es sich um ein so genanntes „cDNA Konstrukt“, welches aus zwei Sap47 cDNAs besteht. Das zweite „genomische RNAi“ Konstrukt, enthält einen genomischen Bereich aus dem Gen, fusioniert mit dem entsprechenden cDNA-Fragment in umgekehrter Orientierung.

cDNA-Konstrukt

Wie oben bereits erläutert wurde besteht das Sap47 RNAi cDNA-Konstrukt aus zwei cDNAs. Beide cDNAs sind ca. 1,1 kb groß und enthalten das vollständige aminosäurekodierende Fragment (s. Anhang) aus der Sap47-1 cDNA (Becker, 1997). Beide Fragmente wurden als PCR-Produkte gewonnen und in einen pUAST Transformationsvektor (Brand & Perrimon, 1993) gebracht (s. Abb. 4.7).

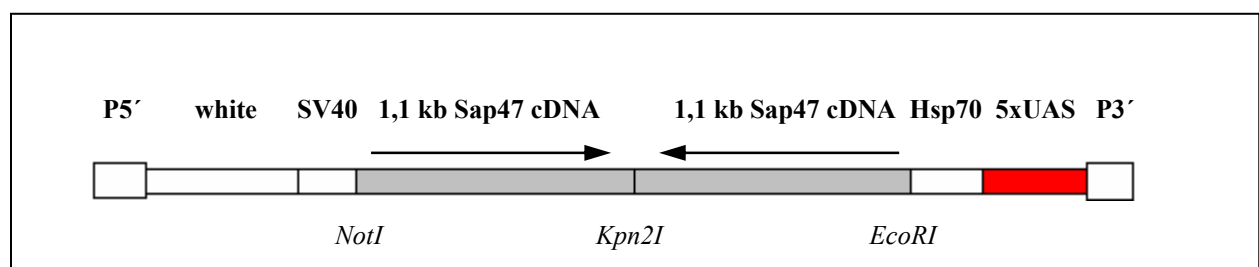


Abb. 4.7: Schematische Darstellung des Sap47 RNAi cDNA Konstruktes (nicht maßstabsgerecht). Die beiden Sap47 cDNAs sind als zwei graue Kassetten dargestellt.

Die Klonierung des Konstruktes erfolgte wie folgt:

1. Amplifikation der cDNAs durch eine Linker-PCR (verwendete Primer: s. Anhang). Durch die Linker-PCR wurden die cDNAs mit den Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme versehen (*EcoRI* und *Kpn2I* für „sense“ cDNA; *Kpn2I* und *NotI* für „antisense“ cDNA).

2. PCR-Produkte mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandeln und mit einem mit *EcoRI/NotI* geschnittenen pKS Vektor ligieren. Die Selektion und Amplifikation des Produktes erfolgt in Bakterien (SURE 2).

3. Insert wird aus dem pKS Vektor durch Schneiden mit *EcoRI* und *NotI* gewonnen und in ein durch Verdau mit *EcoRI/NotI* vorbereitetes pUAST Plasmid kloniert. Selektion und Vermehrung des Konstruktes in *E. coli* (SURE 2).

4. Das Konstrukt wurde anschließend aus Bakterien isoliert und nach einer Sequenzierung in Embryonen des w¹¹¹⁸ Stammes injiziert.

Die injizierten Fliegen wurden wie in Abb. 4.2 dargestellt gekreuzt und mehrere unabhängige transgene Linien isoliert. Die Ergebnisse der Transformation sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Linie:	Insertionsort (Chromosom)	Western Blot Analyse	Bemerkungen
1	2	3	4
I.1	X	2	
I.2	X und II	2	DNA-Analyse
I.2.1			
I.2.2	nicht untersucht	6	
I.2.3	nicht untersucht	6	
I.3	III	4-5	homozygot Letal
I.4	III	5-6	DNA-Analyse
I.5	X und II	2	
I.6	X	2-3	
I.6.1	nicht untersucht	6	
I.6.2	nicht untersucht	6	
I.7	II	5	
I.9	III	4-5	
I.13	II	6	
I.15	X	2	DNA-Analyse

1	2	3	4
I.21	X und II	2	
I.24	II	6	DNA-Analyse
I.28	nicht untersucht	2	
I.28.1	X	2	
I.28.2	nicht untersucht	6	
I.28.3			
I.31	III	4-5	
I.35	X	2-3	
I.35.1	II	6	DNA-Analyse
II.2	III	2-6	Starke Streuung in der Intensität der Reduktion DNA-Analyse
IV.1	III	3	DNA-Analyse
IV.2	III	5-6	DNA-Analyse
V	II	3	DNA-Analyse
V.1	nicht untersucht	2	
V.2	II	2-3	
V.3	II	2-3	
V.4	II	2	
V.5	II	2	
V.6	nicht untersucht	2-3	
V.7	II	3	DNA-Analyse
VI	II	6	
VI.1	X	6	
VI.2	nicht untersucht	6	
VI.3	III	6	
VII.5		1-2	mehrere Insertionen (2)
VII.7	nicht untersucht	5-6	
VII.7.1	III	5-6	
VII.8	nicht untersucht		mehrere Insertionen (2)
VII.8.1	III und ?	1-2	mehrere Insertionen (2)
VII.10	II und II	1	
IX	nicht untersucht	6	DNA-Analyse

1	2	3	4
IX.1	II	3	
IX.1.2	II		
IX.1.3	nicht untersucht	3	
IX.1.4	nicht untersucht	3	
IX.2	X	6	
IX.3	nicht untersucht	6	
X	III und ?	2	mehrere Insertionen (2)
X.1	III	2	
X.1.1	III	2	
X.1.2	III	2-3	
X.1.3	II	2-3	
X.2	nicht untersucht	2	
X.3	II	2	
X.4	III	2-6	Starke Streuung in der Intensität der Reduktion
X.5.1	nicht untersucht	2	
X.5.2	nicht untersucht	1-2	mehrere Insertionen (2)
X.6	III	2	
X.7	II	2	
X.8	II	2	DNA-Analyse
X.9	III	2-3	
XII.1	nicht untersucht	6	
XIII	III	2-3	
XIII.1	III	2-3	
XIII.1.1	nicht untersucht	2-3	
XIII.2	III	3	
XIII.5	nicht untersucht		mehrere Insertionen (2)
XIII.6	III	2-3	
XIV	nicht untersucht		mehrere Insertionen (2)
XIV.1	nicht untersucht	6	
XIV.1.2	nicht untersucht	6	
XIV.2	nicht untersucht		mehrere Insertionen (2)
XIV.3	nicht untersucht		mehrere Insertionen (2)

1	2	3	4
XIV.4	II	4-5	
XIV.5	III und ?		mehrere Insertionen (2)
XIV.6	nicht untersucht		mehrere Insertionen (2)
XIV.7	nicht untersucht	6	
XV	nicht untersucht	5	semiletal
XV.1	nicht untersucht	6	
XV.2	nicht untersucht	6	
XV.3	nicht untersucht	6	

Tabelle 3: Ergebnisse der Sap47 RNAi cDNA Transformation und Western Blot Analyse. In der Spalte 1 (Linie) ist die Bezeichnung der transgenen Linie zu sehen. Linien, deren Bezeichnung mit der gleichen römischen Zahl anfangen, stammen von einer injizierten Fliege (waren also ursprünglich Geschwister).

Die Benotung (= Auswertung) der Ergebnisse der Western Blot Analyse (Spalte 3) erfolgte nach einem 1 bis 6 System.

1- die Restexpression liegt unter 6%;

2- die Restexpression beträgt 15% oder weniger;

3- 15-25%;

4- 25-35%;

5- 35-50%;

6- die Restexpression beträgt mehr als 50% der wildtypischen Protein Menge bzw. ist gar keine Reduktion der Signalstärke zu sehen.

Die Kartierung der Insertionen erfolgte durch die Kreuzungen mit $w^{1118}; +; \frac{TM3 Sb, e}{TM6 Tb, e}$

Fliegenstamm (s. Abb. 4.3). Die transgene Linien wurden als homozygote Stämme etabliert

und mit einer $w^-; \frac{P[actin Gal4, w^+]}{CyO}; +$ Linie (G. Pflügfelder) verpaart (s. Abb. 4.8).

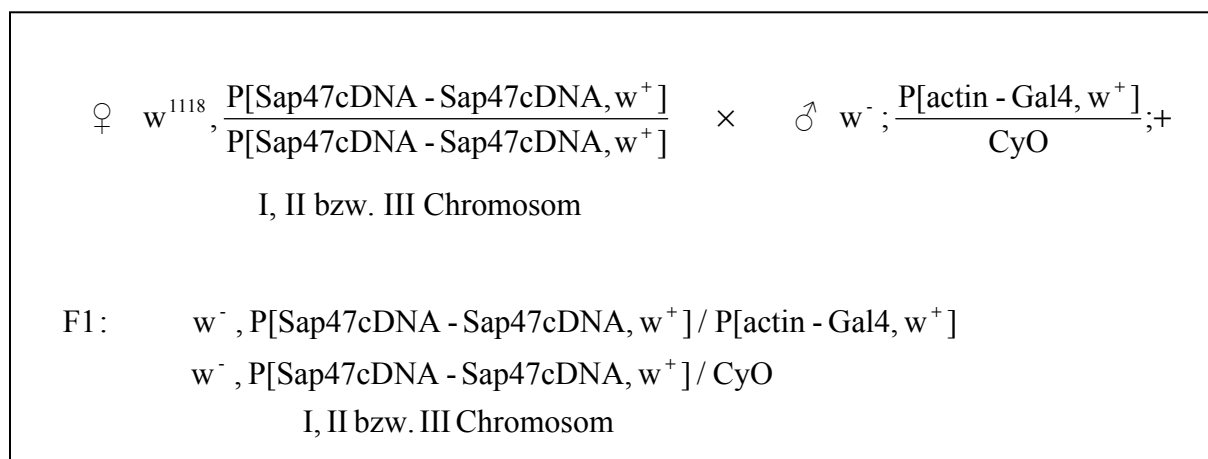


Abb. 4.8: Kreuzungsschema der transgenen Sap47 RNAi Tiere mit der actin-Gal4 Treiber Linie.

Die nichtbalancierte F1 Generation wurde mit Hilfe von Western Blots auf das Vorhandensein bzw. die Abundanz des SAP47 Proteins analysiert. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse sind der Tabelle 3 Spalte 3 zu entnehmen. In der Abbildung 4.9 ist ein Beispiel für den Western Blot zu sehen. Da das SAP47 prominent im Nervensystem von *D. melanogaster* exprimiert wird, wurden als Proben Kopfhomogenate aufs Gel aufgetragen (jeweils Homogenat eines Fliegenkopfes/Spur).

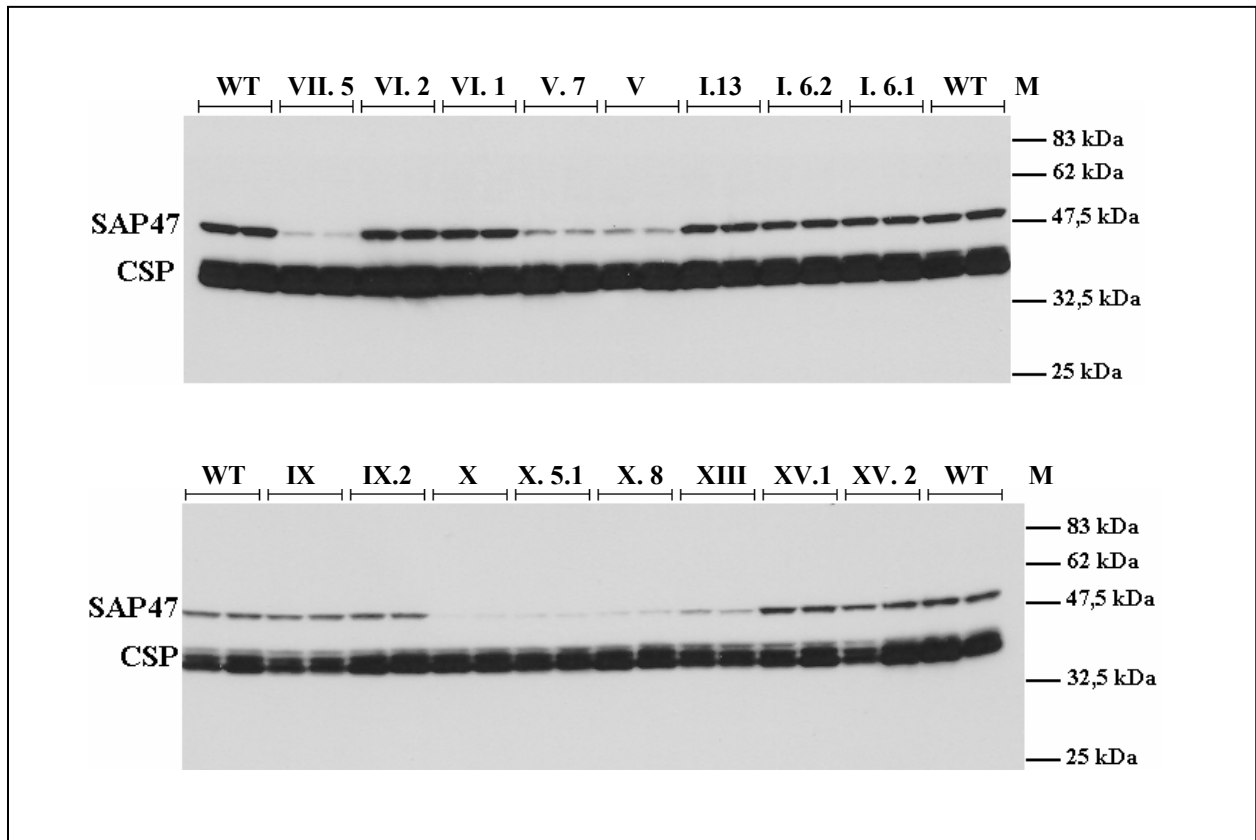


Abb. 4.9: Western Blot mit Fliegenkopfhomogenaten. Geprobt mit MAK nc46 (Verdünnung 1:150) gegen SAP47 und MAK ab49 (1:150 verdünnt) gegen CSP (Beladungskontrolle). Die äußeren Spuren enthalten Homogenate von wildtypischen Fliegen (WT). Die mittleren Spuren wurden mit Homogenaten aus RNAi Tieren beladen. M: Marker.

Ca. 50% der transgenen Linien zeigten eine deutliche Reduktion der Proteinexpression, allerdings in unterschiedlichem Grad, was aus der Stärke der SAP47-Signale hervorgeht. Manche Linien zeigten keine sichtbare Reduktion des Signals.

Die Unterschiede in der Expression von SAP47 bei den RNAi cDNA Fliegen gegenüber Wildtyp wurden auch durch immunhistologische Versuche nachgewiesen (Abb. 4.10 und 4.11).

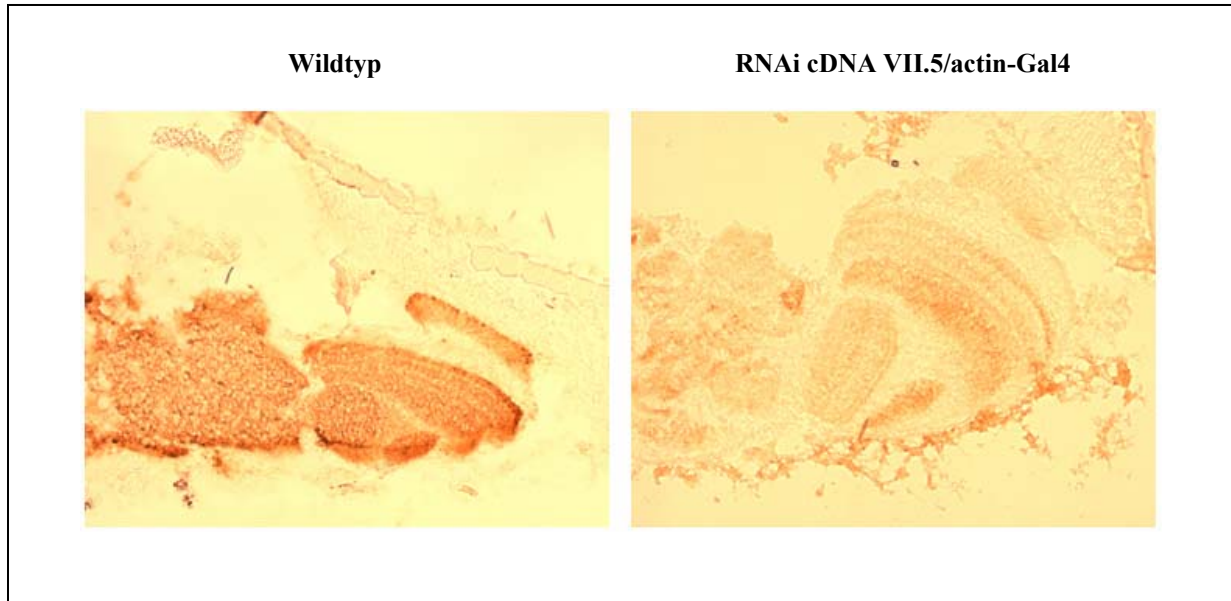


Abb. 4.10: Immunhistochemische Färbung von Schnitten adulter *Drosophila* Köpfe mit MAK nc46 (1:200). Zu sehen sind ein Schnitt aus dem Kopf der Sap47 RNAi cDNA Linie VII.5 und einer Wildtyp Kontrolle (20x).

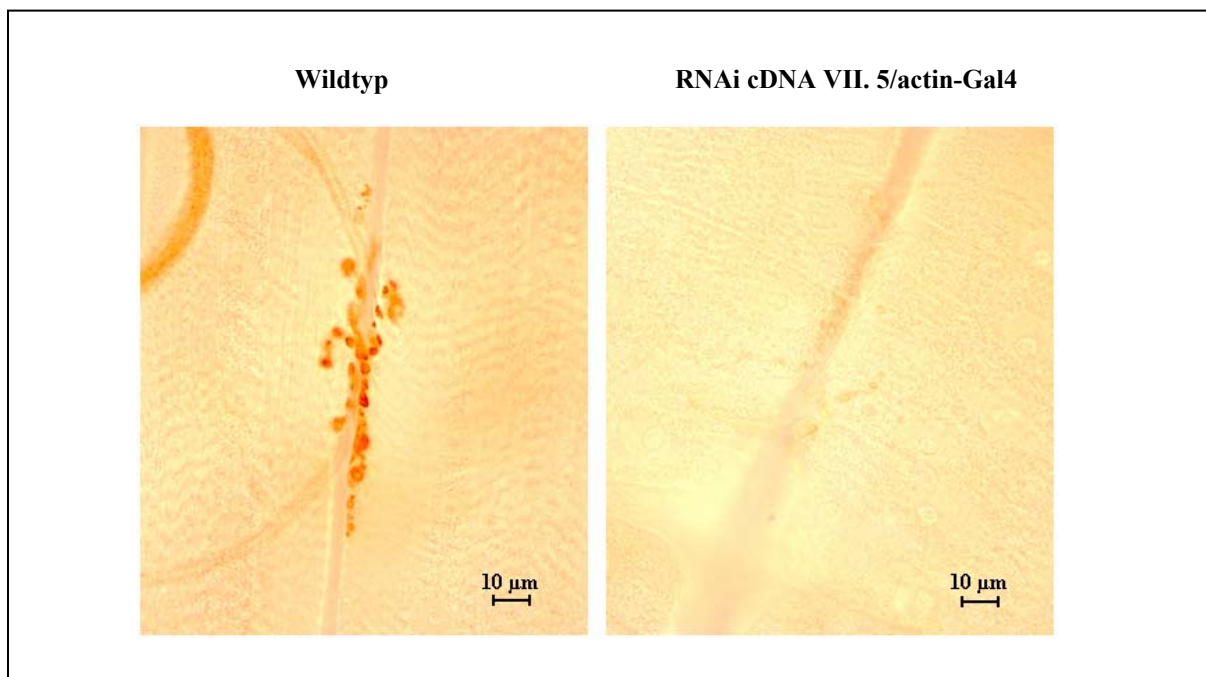


Abb. 4.11: Larvales Nerv-Muskel Präparat. Färbung mit MAK nc46 1:50. Zu sehen sind synaptische Endigungen auf den Muskeln 6/7.

Mit Hilfe eines Southern Blots wurde versucht, die Tiere auf genomischer Ebene zu analysieren. Dafür wurde die genomische DNA aus 12 zufällig ausgewählten Linien isoliert und vor der Gel-Elektrophorese mit *EcoRI* und *NotI* behandelt. Die Auswahl der Restriktionsenzyme wurde durch die Klonierungsstrategie des RNAi-Konstruktes festgelegt und sollte optimal dem Ziel des Southern Blots entsprechen, das Vorhandensein und die Vollständigkeit des Konstruktes im Fliegen-Genom überprüfen zu können.

Als Sonde wurde das komplette *EcoRI/NotI* Fragment (= Insert) verwendet, welches durch Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem ursprünglichen Transformationskonstrukt isoliert wurde.

Der Southern Blot ist in der Abb. 4.12 dargestellt.

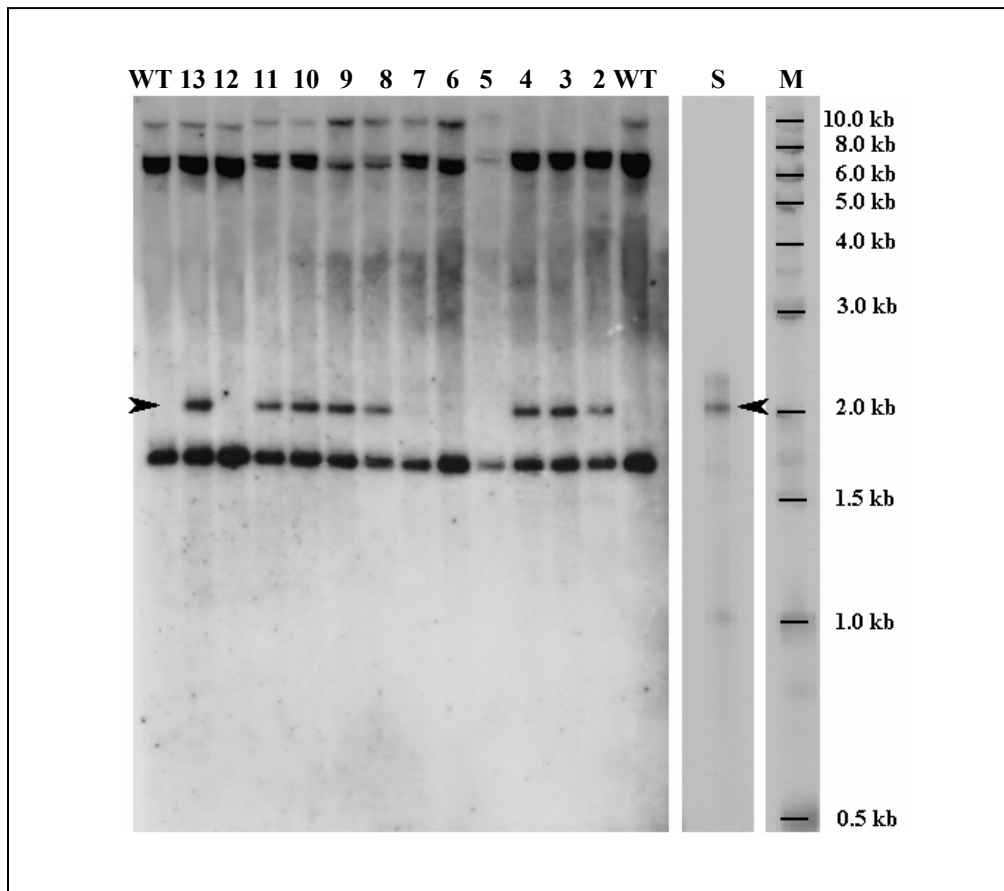


Abb. 4.12: Southern Blot Analyse der genomischen DNA . In den äußeren Spuren (WT) ist die wildtypische genomische DNA aufgetragen. Die Spuren 2-13 enthalten DNA aus den Sap47 „RNAi cDNA“ Fliegen. Spur 2 = genomische DNA der Linie I.2; Spur 3 = Linie I.4; Spur 4 = I.15; Spur 5 = I.24; Spur 6 = I.35.1; Spur 7 = II.2; Spur 8 = IV.1; Spur 9 = IV.2; Spur 10 = V; Spur 11 = V.7; Spur 12 = IX und Spur 13 = X.8. In der Spur S (= Sonde) ist zur Analyse verwendetes *EcoRI/NotI* Fragment (= Insert) zu sehen. M steht für Marker. Das Insert-Fragment läuft bei ca. 2,2 kb (Pfeilspitze).

In den Spuren mit der genomischen DNA aus den Wildtyp Fliegen sind Signale bei ca. 11,5 kb, 7 kb und 1,8 kb zu sehen. Diese Fragmente entsprechen dem endogenen Locus des *Sap47*-Gens. 2/3 aller RNAi cDNA Linien weisen außerdem ein starkes Signal bei ca. 2,2 kb (Pfeilspitze) auf, welches im Wildtyp abwesend ist. Ein Vergleich der Größe des Signals mit der Spur S (= Sonde), welche nur das *EcoRI/NotI* Fragment des Transformationsvektors enthält, zeigt, dass es sich dabei um das vollständige RNAi Konstrukt handelt (s. auch Diskussion). Das Blot zeigt auch, dass ein Teil der Fliegen kein Signal bei 2,2 kb zeigen. D. h.

dass die Tiere auch kein RNAi Konstrukt mehr besitzen, zumindest nicht in der ursprünglichen Form, obwohl sie durch die rote Augenfarbe ausgezeichnet sind. Nicht auszuschließen ist auch die Möglichkeit, dass die noch im Genom vorhandenen Reste des Konstruktes so klein sind, dass sie in diesem Versuch nicht mehr nachzuweisen sind. Die Linie Nr. II.2 (Spur 7) ist durch ein schwaches Signal bei 2,2 kb ausgezeichnet (s. auch Diskussion).

Mit Hilfe eines Western Blots kann auch ungefähr die Stärke der Restexpression eines Proteins abgeschätzt werden, indem die Intensität der Signale einer „Standard Verdünnungsreihe“ mit der Signalstärke der „Probe“ verglichen wird. Dies wurde auch für die Sap47 RNAi Fliegen durchgeführt. Für den Versuch wurden Linien ausgewählt, die die stärkste Reduktion der Expression in den vorherigen Western Blot Experimenten zeigten. Zwei solche Beispiele sind in der Abb. 4.13 dargestellt.

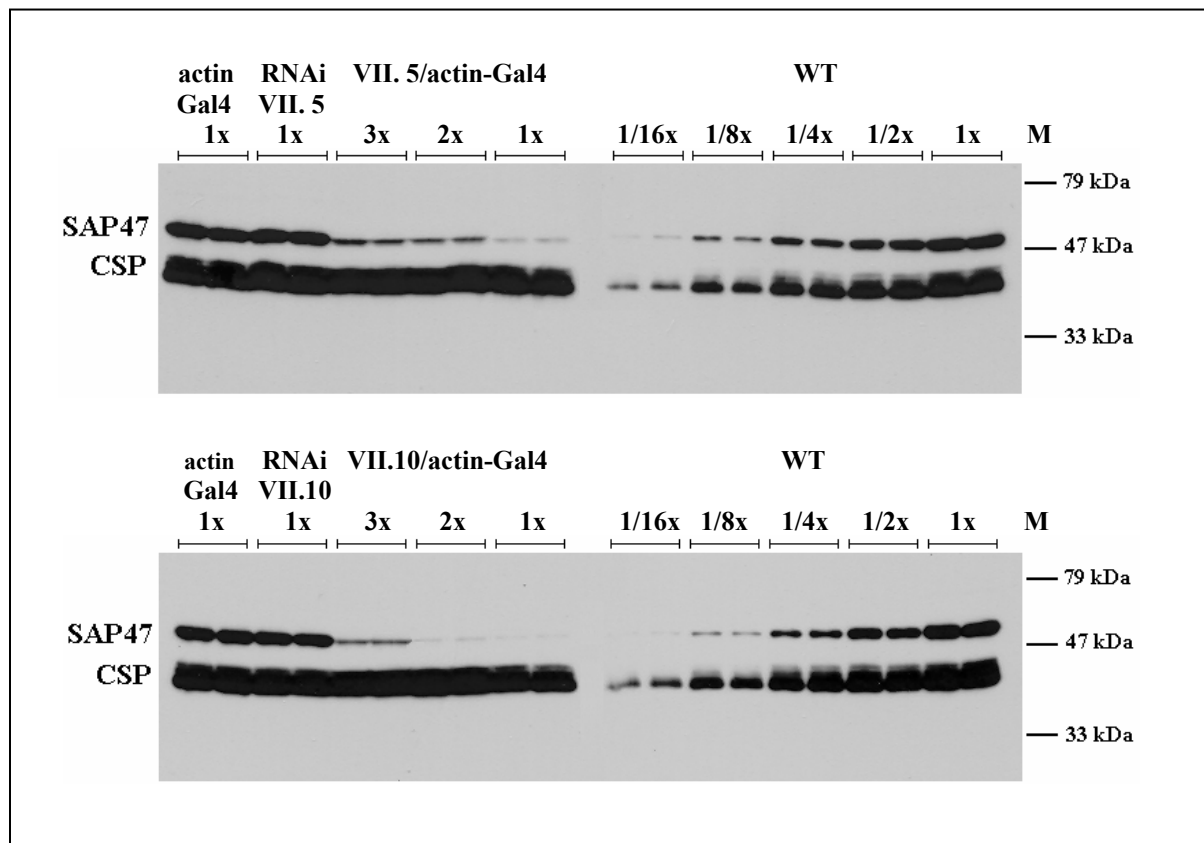


Abb. 4. 13: Konzentrations-Western Blot. Auf der rechten Seite des Blots sind Kopfhomogenate wildtypischer Tiere (WT), aufgetragen in Form einer Konzentrationsreihe, zu sehen. Es sind jeweils ein ganzes bis 1/16 Kopf-Äquivalent pro Spur aufgetragen. Auf der linken Seite des Blots sind jeweils ein bis drei Köpfe der RNAi/actin-Gal4 Tiere zu sehen. Zum Vergleich sind auch Kopfhomogenate der actin-Gal4 Treiber Linie allein sowie der RNAi Linien ohne Treiber zu sehen.

Der Western Blot zeigt, dass die Intensität des SAP47 Signals bei der RNAi Linie VII.5 ungefähr der Menge des Proteins in 1/16 des wildtypischen Kopfhomogenates entspricht, d. h. die Restexpression beträgt ca. 6 % der ursprünglichen Expression. Die Expression von SAP47

in der Linie VII.10 wird noch etwas effektiver unterdrückt. Die Restexpression liegt in diesem Fall unter 6 %.

RNAi genomisch

Das zweite Sap47 RNAi Konstrukt beruht auf sog. genomischer RNAi. Als Anregung zur Herstellung dieses Konstruktes diente Publikation einer Gruppe aus Dallas (Kalidas & Smith, 2002). Die Autoren konnten zeigen, dass RNAi Konstrukte, welche in „sense“ Richtung ein genomisches Fragment eines Gens enthalten, fusioniert mit einer dazugehörigen „antisense“ cDNA, die Fähigkeit besitzen, Proteinexpression stark zu unterdrücken.

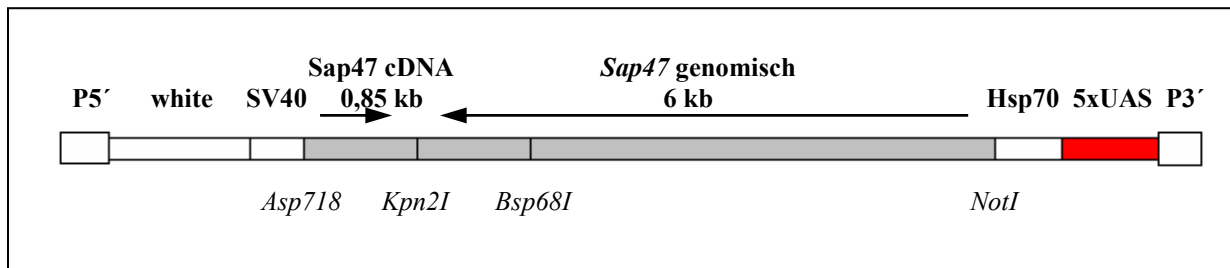


Abb. 4.14: Schematisch Darstellung des Sap47 „RNAi genomisch“ Konstruktes (nicht Maßstabgerecht).

Klonierung des Sap47 „RNAi genomisch“ Konstruktes (Abb. 4.14) erfolgte in folgenden Schritten:

1.1. Modifizierung des pKS-Plasmids: Über die *Sall/EcoRI* Schnittstellen in der MCS des Plasmids wurde ein *Sall-EcoRI* Linker (s. Methoden) eingefügt. Der Linker enthält unter anderen eine *Bsp68I* Erkennungssequenz. Schneiden des erhaltenen pKS-Derivates mit *Bsp68I*.

1.2. Durch Schneiden des *Sap47* genomischen Fragmentes IV/4 (*SstI/SstI* in pKS, Becker, 1997) mit *MspAII* und *Bsp68I* wird ein 5 025 bp großes Fragment isoliert und anschließend in den Vektor aus Klonierungsschritt 1.1 ligiert. Selektion und Amplifikation des Produktes erfolgt in Bakterien. Anschließend die Orientierung des Inserts im Plasmid durch einen Probeverdau mit *BamHI* prüfen.

1.3. Vektor mit dem korrekt orientierten Insert mit *NotI* (Schnittstelle aus der MCS des pKS Vektors) und *Bsp68I* schneiden, dabei entstehendes ca. 5 kb großes Fragment isolieren.

2.1. Einen ca. 1 kb großen genomischen Bereich von *Sap47*, der an das 5 kb Fragment angrenzt, durch eine Linker-PCR amplifizieren (Primer: s. Anhang) und mit *EcoRI* und *Kpn2I* Schnittstellen versehen. PCR Produkt mit *EcoRI* und *Kpn2I* behandeln.

2.2. Ein 0,85 kb großes ExonII-ExonVII Fragment der *Sap47-1* cDNA wurde mit Hilfe einer Linker-PCR vermehrt (Primer: s. Anhang) und die *Asp718I/Kpn2I* Erkennungsequenzen angehängt. PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauen.

2.3. Die Produkte aus den Punkten 2.1 und 2.2 werden in einem Schritt in einen mit *EcoRI* und *Asp718I* geschnittenen pKS ligiert. Selektion und Vermehrung des Ligationsproduktes in Bakterien.

2.4. Durch die Inkubation des Endproduktes aus den Klonierungsschritt 2.3 mit *Asp718I* und *Bsp68I* wird ein ca. 1,85 kb großen Fragment isoliert (beide PCR Produkte in einem Stück).

3.1. DNA-Fragmente aus den Schritten 1.3 und 2.4 mit einem durch Schneiden mit *NotI* und *Asp718I* vorbereiteten pUAST Transformationsvektor zusammenfügen. Selektion und Amplifikation in Bakterien.

3.2. Anschließend wurde das fertige „RNAi genomisch“ Konstrukt in w¹¹¹⁸ Embryonen injiziert.

Die injizierten Tiere wurden wie in der Abbildung 4.2 dargestellt weiter gekreuzt und neun unabhängige transgene Linien isoliert. Für jede Linie wurden mehrere Stämme etabliert. Die Ergebnisse der Transformation sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Linie:	Insertionsort (Chromosom)	Western Blot Analyse
1	2	3
1. 2	III	3
1. 4	X	3
1. 5	III	2
2. 1	III	2
2. 2	III	2
2. 3	III	2

1	2	3
2.4	III	2
2.5	III	2
2.6	III	2
2.7	III	2
3.1	III	6
3.2	nicht untersucht	6
3.3	III	3
3.5	III	5-6
3.6	II	3
4.1	II	3
4.2	II	3
4.3	nicht untersucht	3
4.4	II	3
5.1	X	3
5.2	X	3
5.3	X	3
6.1	III, homozygot letal	3
6.2	III, homozygot letal	3
6.3	III, homozygot letal	3
7.3	nicht untersucht	6
7.5	II	6
7.6	II	5-6
7.8	nicht untersucht	5-6
7.9	nicht untersucht	6
7.10	nicht untersucht	6
8.1	III	3
8.5	III	3
8.7	III	5
9.1	nicht untersucht	3
9.2	III	3

Tabelle 4: Ergebnisse der Sap47 „RNAi genomisch“ Transformation und Western Blot Analyse. Aus der ersten Spalte ist die Bezeichnung der transgenen Linie zu entnehmen. Alle Linien, deren Bezeichnung mit der gleichen Zahl anfängt, stammten von einer injizierten Fliege, d. h. waren ursprünglich Geschwister.

Die Benotung (= Auswertung) der Ergebnisse der Western Blot Analyse (Spalte 3) erfolgte nach einer 1 bis 6 System.

1- die Restexpression liegt unter 6%;

2- die Restexpression beträgt 15% oder weniger;

3- 15-25%;

4- 25-35%;

5- 35-50%;

6- die Restexpression beträgt mehr als 50% der wildtypischen Protein Menge bzw. es ist gar keine Reduktion der Signalstärke zu sehen.

Analog zu den transgenen RNAi cDNA Linien, wurden auch „RNAi genomisch“ Tiere mit einer actin-Gal4/CyO Treiber-Linie gekreuzt (s. Abb. 4.8) und die Nachkommen mittels Western Blot Analyse auf die Intensität der SAP47 Expression untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind in der Tabelle 4, Spalte 3 zusammengefasst. Als Beispiel ist in der Abb. 4.15 ein solcher Western Blot zu sehen.

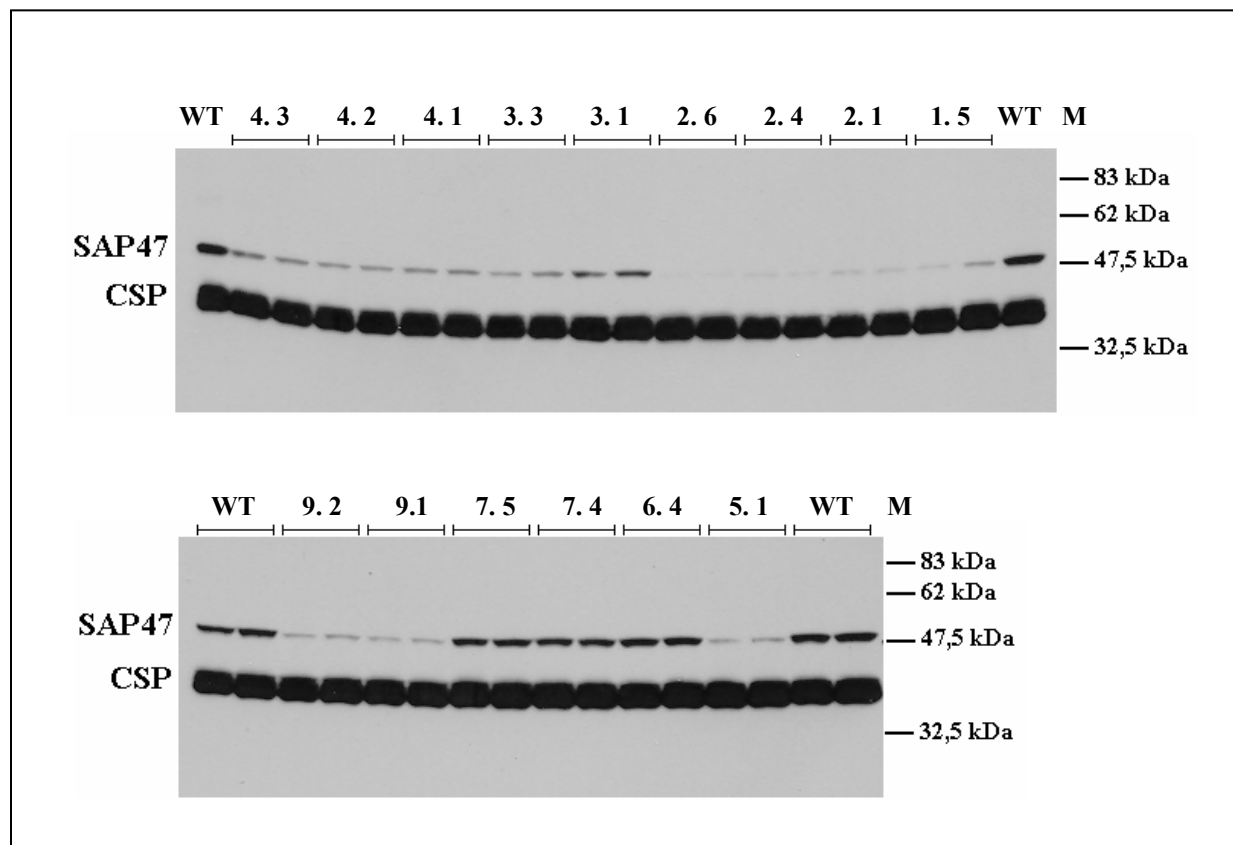


Abb. 4.15: Western Blot Analyse der SAP47 Expression bei den Sap47 „RNAi genomisch“ Tieren. Färbung mit dem MAK nc46 (1:150) und MAK ab49 gegen CSP (1:150) als Beladungskontrolle. Es wurde jeweils Homogenat eines *Drosophila*-Kopfes pro Spur aufgetragen. Zum Vergleich sind in den äußeren Spuren des Blots die Wildtypmengen zu sehen (WT). In den mittleren Spuren befinden sich Homogenate aus den Köpfen der RNAi Tiere. M: Marker.

Die Unterschiede in der Expression des SAP47 Proteins konnten auch mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen an *Drosophila* Gehirnschnitten und larvalem Nerv-Muskel Präparat nachgewiesen werden (Abb. 4.16 und 4.17).

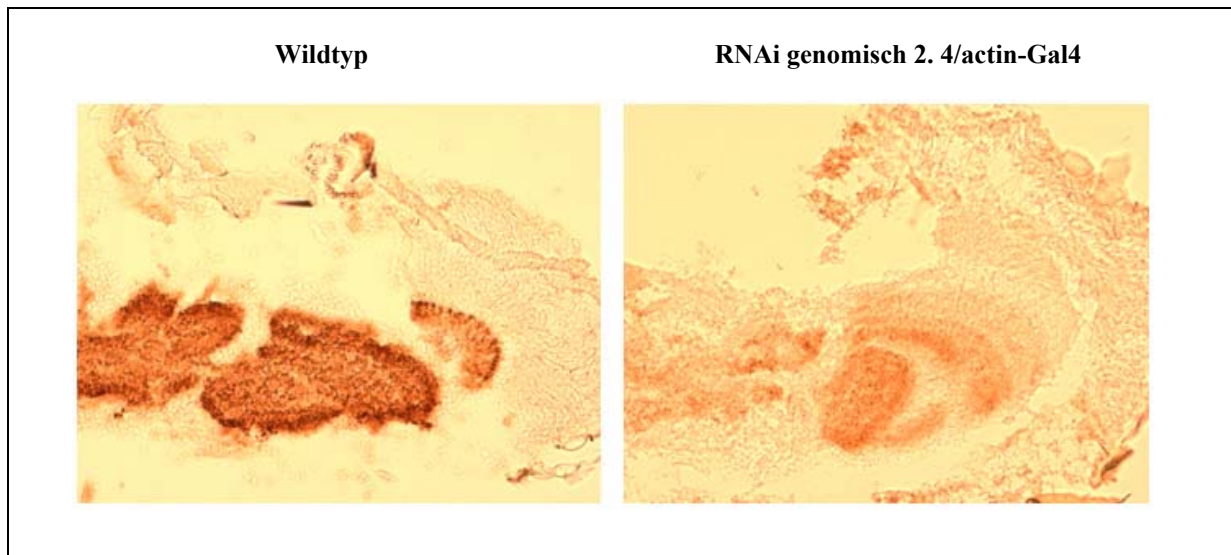


Abb. 4. 16: Immunhistochemie an *Drosophila* Kopfschnitten. Färbung mit dem MAK nc46 (1:200). Zu sehen sind ein Schnitt durch den Kopf der Sap47 „RNAi genomisch“ Linie 2.4 und Wildtyp Kontrolle (20x).

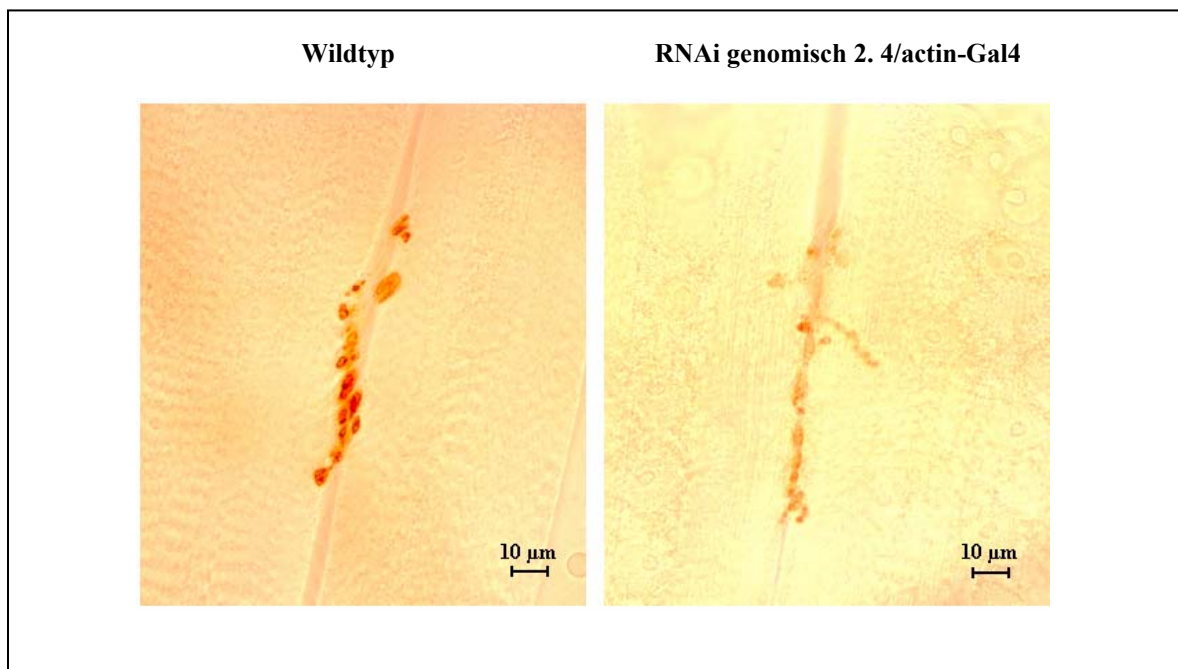


Abb. 4. 17: Larvales Nerv-Muskel Präparat. Färbung mit MAK nc46 1:50. Zu sehen sind die synaptischen Endigungen auf den Muskeln 6/7.

Analog zu den Sap47 RNAi cDNA Linien wurde auch die Stärke der Restexpression bei den Sap47 „RNAi genomisch“ Tieren mittels eines Konzentrations-Western Blots quantifiziert. In der Abb. 4.18 ist ein solcher Western Blot für die „RNAi genomisch“ Linie 2.4 zu sehen.

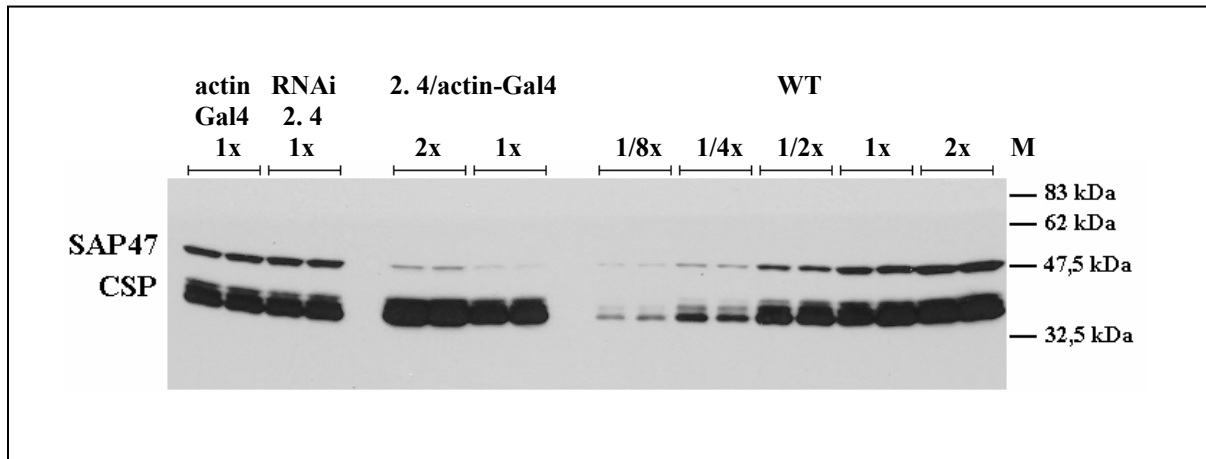


Abb. 4. 18: Konzentrations-Western Blot. Auf der rechten Seite des Blots sind Kopfhomogenate wildtypischer Tiere (WT), aufgetragen in Form einer Konzentrationsreihe, zu sehen. Es sind jeweils ein ganzes bis 1/8 Kopf-Äquivalent pro Spur aufgetragen. Auf der linken Seite des Blots sind jeweils ein bis zwei Köpfe der RNAi/actin-Gal4 Tiere zu sehen. Zum Vergleich sind auch die Kopfhomogenate der actin-Gal4 Treiber Linie allein sowie der RNAi Linie ohne Treiber zu sehen.

Der Western Blot zeigt, dass die Restexpression in diesem Fall ca. der Menge des Proteins in 1/8 des Wildtyp Kopfes entspricht und somit ca. 12% beträgt.

4. 2. Vergleich der beiden RNAi Konstrukte

Um die Effektivität der beiden Sap47 RNAi-Konstrukte direkt zu vergleichen, wurde eine kleine Auswahl der „besten“ transgenen Linien des RNAi cDNA Konstruktes mit solchen des „RNAi genomisch“ auf einem Western Blot analysiert. Der dazugehörige Immunoblot ist in der Abbildung 4.19 dargestellt.

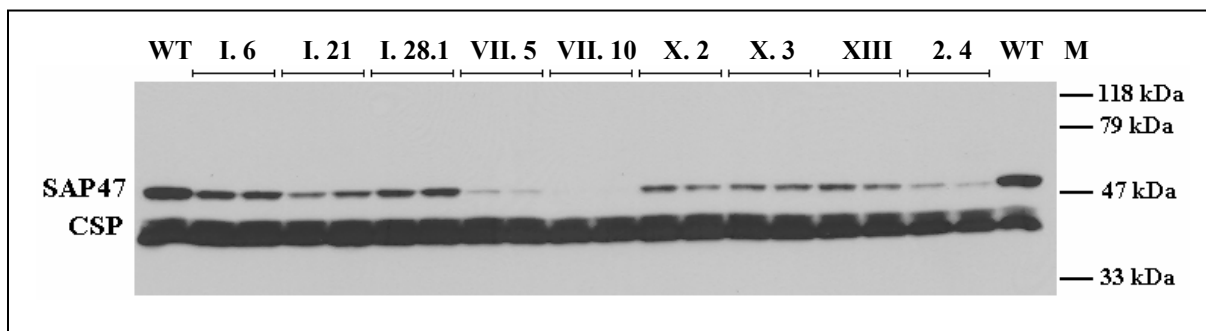


Abb. 4. 19: Analyse der Restexpressionsstärke verschiedener RNAi Linien mittels Western Blots. Inkubiert mit dem MAK nc46 (1:150) und MAK ab49 gegen CSP (1:150) als Beladungskontrolle. Die äußeren Spuren wurden mit den wildtypischen Kopfhomogenaten beladen (WT). In der Mitte des Blots sind Homogenate der RNAi Linien zu sehen. Pro Spur wurde jeweils Homogenat eines Kopfes aufgetragen. M: Marker.

Verglichen wurden 8 verschiedene RNAi cDNA Linien, deren Reduktionsstärke im Bereich 6 bis 25% der Restexpression liegt, mit der „besten“ „RNAi genomisch“ Linie 2.4 (Restexpression beträgt ca. 12% der wildtypischen Proteinmenge). Der Western Blot zeigt eindeutig, dass zwei der RNAi cDNA Linien eine stärkere Reduktion der SAP47 Expression zeigen als die Linie 2.4 (vergleiche die Intensität der Signale bei den Linien VII.5 und VII.10 mit der Signalstärke der Linie 2.4). Allerdings tragen diese beiden Linien zwei unabhängige Insertionen des Transgens, die Aktivität jedes einzelnen davon wurde nicht separat untersucht. Außerdem wurden für das RNAi cDNA Konstrukt insgesamt wesentlich mehr Linien als für „RNAi genomisch“ untersucht. Aus diesem Grund kann auch keine endgültige Schlussfolgerung über die Effektivität der beiden Konstrukte im direkten Vergleich gezogen werden.

4. 3. Versuche zur Charakterisierung der SAP47 RNAi Fliegen

Der wichtigste Schritt nach der Herstellung eines genetisch veränderten Organismus ist seine Charakterisierung, oder, mit anderen Worten, die Suche nach dem Phänotyp, welcher durch die Abwesenheit, Reduktion oder Überexpression eines bestimmten Gen-Produktes verursacht wird.

Da das SAP47 Protein in der Nervensystem von *D. melanogaster*, vor allem in den synaptischen Endigungen lokalisiert ist, kann seine Abwesenheit morphologische Veränderungen wie z.B. bei der Größe der Boutons und deren Anzahl oder Abweichungen in der Struktur der Verzweigungen hervorrufen. Um dies zu überprüfen wurde die Struktur des larvalen Nerv-Muskel Präparates der RNAi Tiere mit der des Wildtyps verglichen. Hierbei wurden bei den Sap47 RNAi Tieren keine auffälligen qualitativen Unterschiede in der Morphologie des Nerv-Muskel Präparates im Vergleich zum Wildtyp beobachtet.

Bei den Kreuzungen der RNAi Linien mit $w^- ; \frac{P[\text{actin} - \text{Gal4}, w^+]}{\text{CyO}} ; +$ Treiber-Linie (s. auch

Abb. 4.8) fielen die weiblichen Nachkommen der Linie 2.4 mit dem Genotyp $w^- ; \frac{P[\text{actin} - \text{Gal4}, w^+]}{+} ; \frac{P[\text{sap47 gen} - \text{sap47cDNA}, w^+]}{+}$ durch ihre Sterilität auf. Da bisher

noch nicht bekannt ist, welche Gewebe außer dem Nervensystem bei *D. melanogaster* das SAP47 Protein exprimieren, ist es auch nicht ausgeschlossen, dass das SAP47 eine Rolle in den Ovarien spielen kann. Deswegen wurde dieses „Sterilitäts-Phänomen“ genauer untersucht. Getestet wurden die Weibchen mit den Genotypen

$w^-; \frac{P[\text{actin-Gal4}, w^+]}{+}, \frac{P[\text{sap47gen-sap47cDNA}, w^+]}{+} 2.4$ und
 $w^-; +; \frac{P[\text{sap47gen-sap47cDNA}, w^+]}{\text{tubulin-Gal4}} 2.4$, und $w^{1118}; +; +; w^-; \frac{P[\text{actin-Gal4}, w^+]}{\text{CyO}}; +$ und
 $w^-; +; P[\text{sap47gen-sap47cDNA}, w^+] 2.4$ Linien als Kontrolle. Für jede Linie wurden je 50 Einzelkreuzungen mit $w^{1118}; +; +$ Männchen in kleinen Breigläsern (Durchmesser 25 mm) angesetzt. Die Ergebnisse des Experimentes sind in der Abbildung 4. 20 dargestellt.

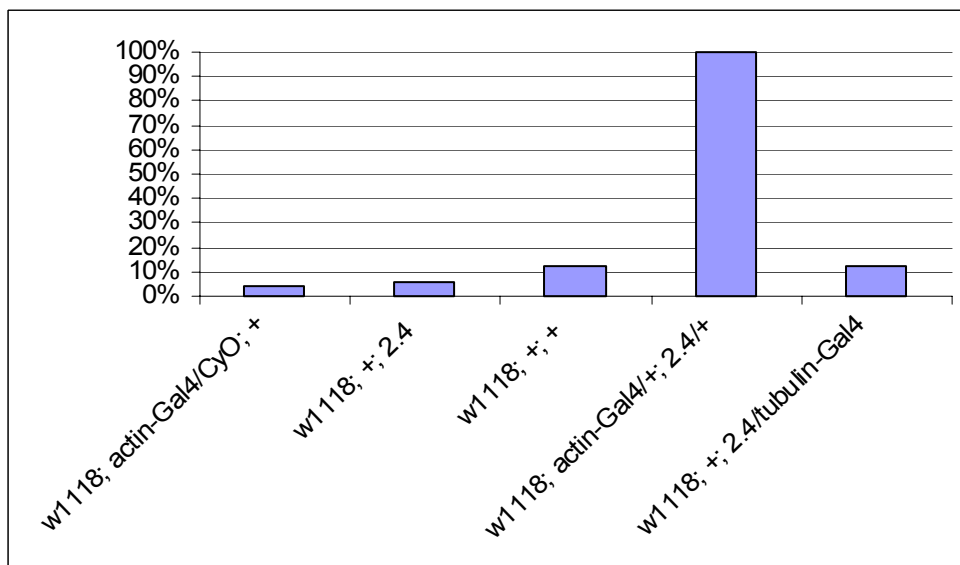


Abb. 4.20: Grafische Darstellung der Ergebnisse des „Sterilitäts“-Testes. Die Daten sind in Prozent der sterilen Individuen zu sehen (Y-Achse). Entlang der X-Achse sind die Genotypen der getesteten Tiere angegeben.

Die Abbildung zeigt, dass unter den Bedingungen des Experiments 100% der weiblichen Individuen mit dem Genotyp $w^-; \frac{P[\text{actin-Gal4}, w^+]}{+}, \frac{P[\text{sap47gen-sap47cDNA}, w^+]}{+}$ steril sind. Allerdings wurde dieser Phänotyp nicht bei anderen RNAi-Linien oder den $w^-; +; \frac{P[\text{sap47gen-sap47cDNA}, w^+]}{\text{tubulin-Gal4}} 2.4$ Tieren beobachtet. Da der tubulin-Gal4 Treiber eine ähnlich starke Inhibition der SAP47 Expression bewirkt wie der actin-Gal4 Treiber (ohne Abbildung) lässt sich schließen, dass die Sterilität der actin-Gal4/Sap47 RNAi Kombination eher durch den genetischen Hintergrund der Tiere und nicht durch die schwache SAP47 Expression zu erklären ist.

4. 4. Jump-out Mutagenese des *Sap47*-Gens

Die Suche nach P-Element Insertionen im *Sap47*-Gen und umgebenden Sequenzen führte zur Identifizierung einer P-Element Linie EY07944 aus dem Screen des Labors von Hugo Bellen (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/>). Die Insertion befindet sich im 5'-nichttranslatierten Bereich des *Sap47*-Gens (s. Abb. 4.21 und Anhang) und ist homozygot vital.

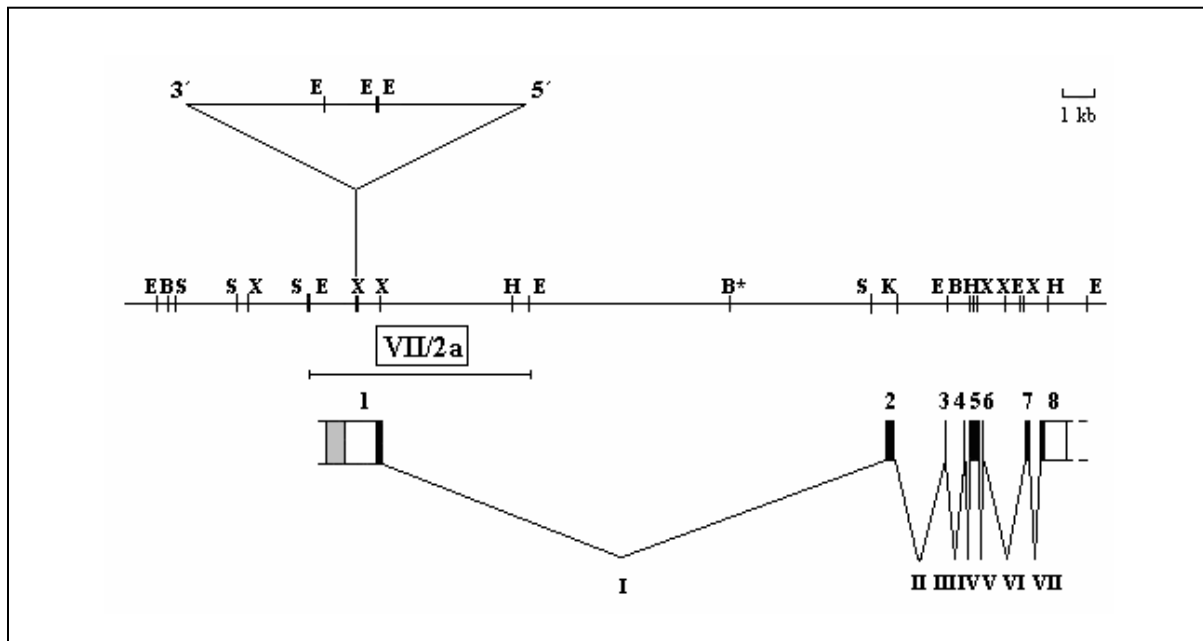


Abb. 4. 21: Schematische Darstellung der Position des P-Elementes im *Sap47* Lokus. Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind mit dem jeweiligen Kürzel gekennzeichnet: E = *EcoRI*, B = *BamHI*, H = *HindIII*, S = *SstI*, X = *XhoI*. In dem P-Element sind (aus Übersichtlichkeitsgründen) nur die *EcoRI* Schnittstellen (relevant für die Southern Blot Analyse) gezeigt. Auch das abgebildete VII/2a genomische Subfragment (Becker, 1997) ist für den Southern Blot von Bedeutung.

Die Western Blot Analyse der Tiere hat gezeigt, dass die Insertion keinen sichtbaren Einfluss auf die Expression des Gens hat (ohne Abbildung). Mit Hilfe einer Jump-out Mutagenese wurde versucht das EY-Element zu mobilisieren, in der Hoffnung, auf diese Weise Deletionen im kodierenden Bereich des *Sap47*-Gens zu erzeugen und dadurch die Gen-Expression still zu legen. Die Mutagenese wurde nach dem folgenden Kreuzungsschema durchgeführt (Abb. 4.22):

P	$w^-; +; \frac{EY07944 w^+}{EY07944 w^+}$ rotäugig	×	$w^-; \frac{Sp}{CyO}; \frac{P[\Delta 2 - 3, ry^+] Sb}{P[\Delta 2 - 3] TM2 Ubx}$ weißäugig
F1	$w^-; \frac{+}{Sp/CyO}; \frac{EY07944 w^+}{P[\Delta 2 - 3, ry^+] Sb}$ rotäugig bzw. Mosaik	×	$w^-; +; \frac{TM3 Sb, e}{TM6 Tb, e}$ weißäugig
F2	Selektion nach white ⁻ TM6 Tb Phänotyp und Kreuzung mit der blp/Sap47 Doppelmutante (Becker, 1997)		
	$w^-; \frac{+}{+ /Sp/CyO}; \frac{???, ohne P - Element}{TM6 Tb, e}$ weißäugig	×	$w^-; +; \frac{\Delta blp/\Delta sap47 Jo 253}{TM3 Sb, e}$ weißäugig
F3	Nachkommen mit den folgenden Genotypen zu erwarten:		
	$w^-; \frac{+}{+ /Sp/CyO}; \frac{???, ohne P - Element}{\Delta blp/\Delta sap47 Jo253}$		Testen auf dem Western Blot
	$w^-; \frac{+}{+ /Sp/CyO}; \frac{???, ohne P - Element}{TM3 Sb, e}$		Tiere untereinander Kreuzen um die homozygote Linie zu erzeugen.
	$w^-; \frac{+}{+ /Sp/CyO}; \frac{TM3 Sb, e}{TM6 Tb, e}$		ebony, uninteressant
	$w^-; \frac{+}{+ /Sp/CyO}; \frac{\Delta blp/\Delta sap47 Jo 253}{TM6 Tb, e}$		tubby, uninteressant

Abb. 4. 22: Jump-out Mutagenese des *Sap47*-Gens von *D. melanogaster* (naheres s. Text).

Die Linie EY07944 ist mit einem mini-w⁺ Gen markiert und durch ihre rote Augenfarbe ausgezeichnet. Durch Einkreuzen der stabilen Transposase Quelle P[Δ2-3, ry⁺] (Massenkreuzungen) entstehen Nachkommen (F1 Generation), die sowohl das P-Element als

auch das P[$\Delta 2-3$, ry⁺] Konstrukt tragen. In der Keimbahn dieser Tiere erfolgt die Mobilisierung des EY07944-Elementes. Sie wurden mit dem w-;+; $\frac{\text{TM3 Sb,e}}{\text{TM6 Tb,e}}$ Doppelbalancerstamm verpaart (Massenkreuzungen) und die weißäugigen TM6 Tb Tiere der F2 Generation anschließend über die Defizienz w-;+; $\frac{\Delta\text{blp}/\Delta\text{sap47 Jo 253}}{\text{TM3 Sb,e}}$ (Becker, 1997) gekreuzt (Einzelkreuzungen). Tiere der F3 Generation, die kein Balancer Chromosom tragen wurden mit Hilfe von Western Blot auf das Vorhandensein des SAP47 Proteins analysiert. Es wurden insgesamt ca. 230 weißäugige TM6 Tb Tiere (F2 Generation) isoliert und mit der $\Delta\text{blp}/\Delta\text{Sap47Jo253}$ Defizienz verpaart. Darunter befanden sich drei Linien mit letalem Phänotyp, drei Linien mit Reduktion in der SAP47 Expression und drei Linien ($\Delta\text{Sap47Jo}^{156}$, $\Delta\text{Sap47Jo}^{201}$ und $\Delta\text{Sap47Jo}^{208}$) mit einer Deletion im kodierenden Bereich von *Sap47* (Tabelle 5). Für diese letzten drei Linien konnte weder auf dem Western Blot noch in der Immunhistochemie eine SAP47 Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.23 und 4.24).

Linie	Western Blot Analyse	Betroffen	Große der Deletion
1	2	3	4
4	reduziertes Signal bei 47 kDa	5'-nichtranslatierter Bereich und regulatorische Elemente	nur durch Sequenzieren zu ermitteln
26	reduziertes Signal bei 47 kDa	5'-nichttranslatierter Bereich und Regulatorische Elemente	nicht untersucht
70	reduziertes Signal bei 47 kDa	5'-nichtranslatierter Bereich und regulatorische Elemente	nur durch Sequenzieren zu ermitteln
156	kein Signal bei 47 kDa	kodierender Bereich	ca. 2,1 kb
201	kein Signal bei 47 kDa	kodierender Bereich	ca. 5,8 kb
208	kein Signal bei 47 kDa	kodierender Bereich	ca. 1,3 kb

Tabelle 5: Ergebnisse der *Sap47* Jump-out Mutagenese. In der ersten Spalte ist der Nummer der Jump-out Linie zu sehen. In der zweiten Spalte der Tabelle sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse zusammengefasst. Aus der Spalte 3 sind die bei den Mutanten deletierte Bereiche zu entnehmen. In der Spalte Nr. 4 sind die Ergebnisse der Southern Blot Analyse der Tiere zu sehen.

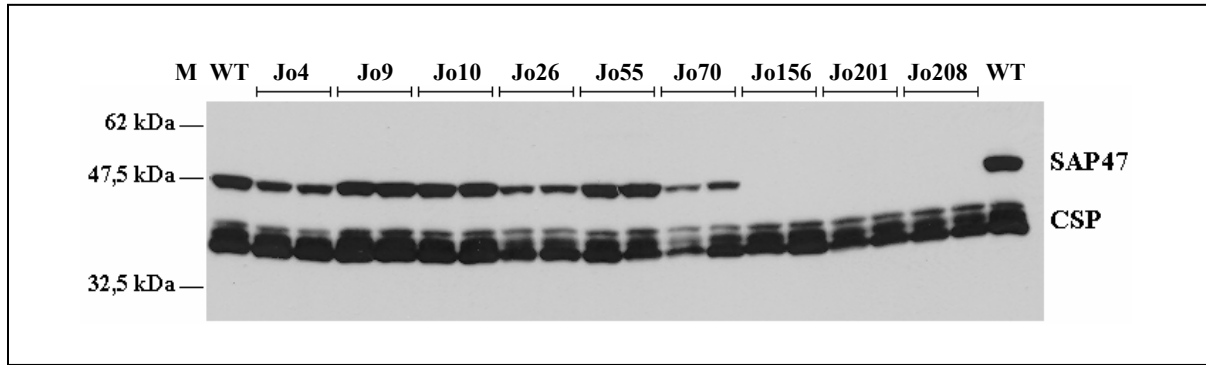


Abb. 4. 23: Western Blot Analyse der *Sap47* Jump-out-Ereignisse. Färbung mit MAK nc46 (1:150) und MAK ab49 (1:150).

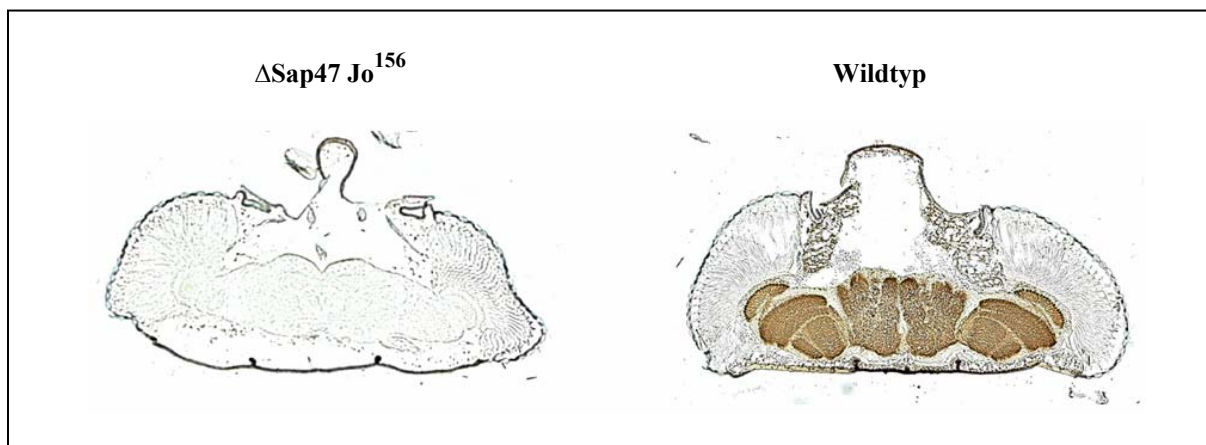


Abb. 4. 24: Immunhistochemie an *Drosophila* Kopfschnitten. Färbung mit dem MAK nc46 (1:100). Zu sehen sind ein Schnitt durch den Kopf der *Sap47* null-Mutante (Δ Sap47 Jo¹⁵⁶) und Wildtyp Kontrolle (10x).

Die Größe der Deletionen im *Sap47*-Gen wurde mit Hilfe einer Southern Blot Analyse grob definiert. Dafür wurde die genomische DNA der Tiere mit Hilfe eines *EcoRI*-Restriktionsverdaus in Fragmente zerlegt und diese elektrophoretisch aufgetrennt. Als Sonde wurde das genomische *EcoRI-EcoRI* Subfragment VII/2a (Becker, 1997) verwendet (s. auch Abb. 4.21). Die Ergebnisse der Southern Blot Analyse sind in der Abbildung 4. 25 und zu sehen.

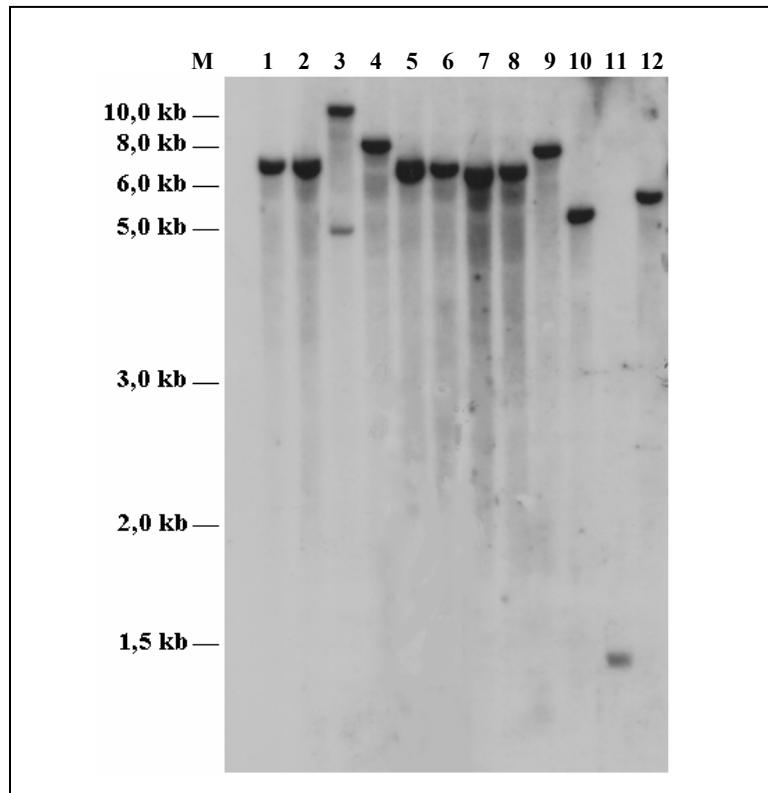


Abb. 4. 25: Southern Blot Analyse der Jump-out Tieren, geprobt mit dem genomischen Subfragment VII/2a. Spuren 1 und 2 enthalten DNA wildtypischer Tiere (1: CantonS; 2: W^{1118}). Spur 3: EY07944 Linie; Spur 4: Jo # 4; Spur 5: Jo # 5; Spur 6: Jo # 9; Spur 7: Jo # 10; Spur 8 Jo # 55; Spur 9: Jo # 70; Spur 10: Jo # 156; Spur 11: Jo # 201 und Spur 12: Jo # 208. M: Marker.

In CantonS und w^{1118} Tieren (Spuren 1 und 2 des Blots) wurde ein ca. 7,2 kb großes wildtypisches *EcoRI/EcoRI* Fragment markiert. Spur 3 enthält genomische DNA der Insertionslinie EY07944. Hier sind zwei Signale (ca. 12 und 5 kb groß) zu erkennen, die durch die Insertion und *EcoRI* Erkennungssequenzen im EY-Element hervorgerufen werden. In den Spuren 5-8 sind vier verschiedene Jump-out Linien zu sehen, welche eine wildtypische SAP47 Expression auf dem Western Blot zeigen. Sie liefern auch auf dem Southern Blot ein wildtypähnliches Signal bei ca. 7,2 kb und sind also durch eine mehr oder weniger exakte Entfernung des P-Elementes ausgezeichnet. Spuren 4 und 9 enthalten genomische DNA der Tiere mit Reduktion in der SAP47-Proteinexpression. Die Southern Blot Signale bei ca. 8 kb deuten darauf hin, dass die beiden Linien gleichzeitig mit dem Verlust von 5'-nichttranslatierten und regulatorischen Bereichen des *Sap47*-Gens, Fragmente des EY-Elementes beibehalten haben. Aus der Southern Blot Analyse der Jump-out Linien $\Delta Sap47Jo^{156}$, $\Delta Sap47Jo^{201}$ und $\Delta Sap47Jo^{208}$ geht hervor, dass im genomischen Bereich um die ehemalige Insertionsstelle jeweils vermutlich 2,1 kb, 5,8 kb bzw. 1,3 kb deletiert wurden. Die genaue Größe der Deletionen kann aber erst durch Sequenzierung und direkten Vergleich der wildtypischen und der Jump-out Sequenzen ermittelt werden.

4. 5. Suche nach Interaktionspartnern für das SAP47-Protein aus *Drosophila melanogaster*

4. 5. 1. Yeast-Two-Hybrid Screen

Einen wichtigen Hinweis auf die mögliche Funktion eines neuen Proteins können Informationen über Interaktionspartner des Proteins liefern.

Da die in unsere Arbeitsgruppe bisher durchgeführten Versuche, Interaktionspartner für SAP47 mittels Immun-Copräzipitation zu ermitteln (Huber, 2003; Schaupp, 1998). ohne Erfolg blieben, wurde mit demselben Ziel eine andere Strategie eingesetzt: Yeast-Two-Hybrid. Dieses Verfahren ermöglicht es, relativ schnell eine sehr große Anzahl an verschiedenen Proteinen (sog. „Beute“) auf ihre Fähigkeit zu testen, mit dem Protein der Wahl (dem sog. molekularen „Köder“) zu interagieren.

Um einen Interaktionspartner für SAP47 zu finden wurde zunächst das GAL4 Yeast-Two-Hybrid System der Firma Clontech angesetzt. Dieses System macht sich die Eigenschaften des GAL4 Transkriptionsfaktors aus der Hefe zu Nutze und ist im Methoden-Teil ausführlich beschrieben.

Da es sich bereits in Laufe meiner Diplomarbeit (Funk, 2000) herausgestellt hat, dass das 347 Aminosäuren lange SAP47 als molekularer „Köder“ von allein (d. h. in Abwesenheit eines Interaktionspartners) die Reportergene *lacZ* und *HIS3* aktivieren kann, das 199 Aminosäuren lange C-terminale SAP47-Fragment (AS 149-347) dagegen keine Transkription dieser Gene hervorruft, wurde versucht, ein möglichst großes SAP47 Fragment, welches allein keine Transkription der Reportergene auslösen kann, als „Köder“ zu klonieren. Dafür wurden drei unterschiedlich große Fragmente (s. Anhang) der Sap47-1 cDNA (Becker, 1997) mit Hilfe von Linker-PCR amplifiziert und mit den passenden Restriktionserkennungssequenzen (s. Anhang) ausgestattet. Nach dem Schneiden der PCR-Produkte mit den entsprechenden Enzymen und Ligation in den pAS2-1 Expressionsvektor wurden alle drei „Köder“ Konstrukte darauf getestet, ob sie die Transkription der Reportergene in der Hefe auslösen. Der β -Galaktosidase Test zeigte, dass alle drei von sich aus keine Transkription hervorrufen können. Mit Hilfe eines Western Blots wurde zusätzlich nachgewiesen, dass die „Köder“ Fusionsproteine in den Hefe-Zellen exprimiert werden (Abb. 4. 26).

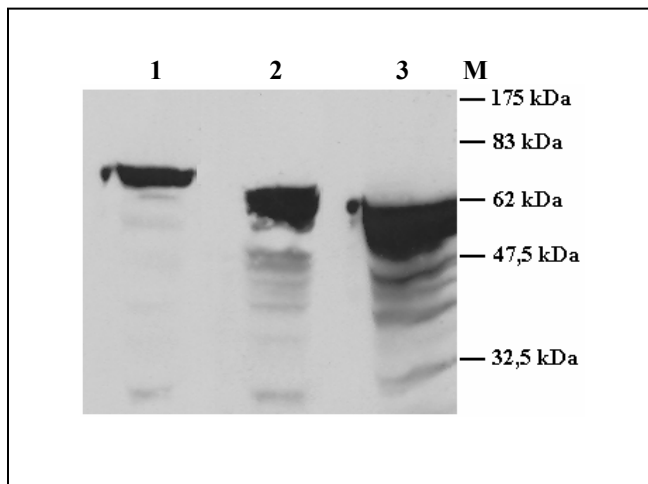


Abb. 4.26: Western Blot mit den Hefe-Proteinextrakten geprobt mit MAK 200/7 1:50. Zu sehen sind drei verschiedene „Köder“ Fusionsproteine. Spur 1: Proteinextrakt aus Zellen, die den pAS2-1 Vektor mit dem vollständigen ORF von SAP47 (347 Aminosäuren Variante) enthalten; Spur 2: Zellextrakt mit dem 307 Aminosäurelangem SAP47 „Köder“ Anteil; Spur 3: der molekulare „Köder“ enthält 281 C-terminale Aminosäuren des SAP47 Proteins; M: Marker.

Die Größe der Fusionsproteine setzt sich aus der GAL4-DNA-Bindedomäne (ca. 20 kDa) und dem SAP47 Anteil in dem jeweiligen Protein zusammen.

Da auch das längste (307 Aminosäuren große) klonierte SAP47 „Köder“ Konstrukt alle Tests mit Erfolg bestanden hat, wurde es für das Screenen einer *D. melanogaster* MATCHMAKER cDNA- Bibliothek ausgewählt.

Die Hefe-Transformation im Bibliothekenmaßstab erfolgte mit ca. 1 mg cDNA-Bibliothek (zwei parallele Ansätze mit je ca. 500 µg DNA) nach dem 2 Hybrid System TRAF0 Protokoll (s. Methoden). Die Zellen wurden auf $-\text{Trp}/-\text{Leu}/-\text{His} + 5 \text{ mM } 3\text{AT}$ Platten selektioniert und dem „blau-weiß“ Test unterzogen. Das Screenen von ca. $6 \cdot 10^6$ Kolonien (Anzahl der unabhängigen cDNA-Klonen in der cDNA-Bibliothek beträgt $3,5 \cdot 10^6$) führte zur Isolierung von ca. 1000 „positiven“ Klone, die sich nach ca. 1-2 h ab Selektionsbeginn intensiv blau färbten. Der Großteil der Klone (ca. 80%) ist beim Screenen verloren gegangen. Sie sind nach dem abziehen auf die Nitrozellulosefilter nicht mehr nachgewachsen oder ihre Position konnte nicht mehr genau identifiziert werden. 215 positive Klone wurden „gerettet“, hochgezogen und die „Beute“ Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert. Die Inserts (= *Drosophila* cDNAs) von ca. 20% der isolierten Plasmide wurden mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte ansequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Bei dem Screen gefundene Proteine („Beute“)	Anzahl
RpL14 (CG6253), strukturelle Komponente der großen Untereinheit von Ribosomen	15x
SdHB (Succinate dehydrogenase iron-subunit)	3x
Doa Protein Kinase (im falschen Leseraster)	1x
CG7945, Chaperone	1x
U2A (im falschen Leseraster), RNA-Binding	3x
pK17E, Protein Serine-Threonine Kinase	3x
Prosalph7 (im falschen Leseraster), Multicatalytic Endopeptidase	1x
CG2551 Gen Produkt (im falschen Leseraster)	1x
CG1406 Gen Produkt (im falschen Leseraster)	2x
Keine kodierende AS-Sequenz	10x

Tabelle 6: Dargestellt sind die Ergebnisse des Yeast-Two-Hybrid Screens mit dem 307 Aminosäuren langen SAP47 Fragment.

Die Spezifität der Interaktion zwischen SAP47 Protein und RpL14 und CG7945 Proteinen wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (Wittmann, 2002) untersucht. Die Experimente haben gezeigt, dass es sich dabei vermutlich um keine „echten“ Interaktionen handelt, da die beiden „Kandidaten“ allgemein „klebrig“ sind und unspezifisch auch an die GAL4 DNA-Bindungsdomäne binden.

Die SdHB und pK17E Proteine wurden ebenso auf die Spezifität der Interaktion mit SAP47 getestet. Auch für diese Proteine konnte keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden. Die cDNAs für die Doa Protein Kinase, das U2A Protein, Prosalph7 sowie die Gene CG2551 und CG1406 befanden sich im falschen Leseraster und wurden nicht weiter bearbeitet.

Eine weitere Sequenzierung der Isolierten cDNAs wurde als sinnlos angesehen und nicht durchgeführt.

4. 5. 2. CytoTrap Screen

Eine weitere alternative Methode zur Identifizierung von Interaktionspartnern stellt ein CytoTrap-System der Firma Stratagene dar. Das Verfahren ähnelt dem beim Yeast-Two-Hybrid, die Interaktion des „Ködners“ mit der „Beute“ findet aber im Cytoplasma der Hefe-Zellen statt (s. auch Methoden-Teil), was in vielen Fällen von Vorteil sein kann.

Um einen CytoTrap Screen durchführen zu können wurde zunächst ein „Köder“-Konstrukt hergestellt. Dafür wurde die vollständige aminosäurenkodierende Sequenz der Sap47-1 cDNA

(Becker, 1997) in den pSos-Expressionsvektor eingebracht. Das cDNA Fragment wurde mit Hilfe einer Linker PCR amplifiziert und mit *NcoI/SalI* Schnittstellen flankiert. Nach dem Schneiden mit entsprechenden Restriktionsenzymen wurde das PCR-Produkt im richtigen Leseraster in den pSos-Vektor am 3'-Ende des vom Vektor kodierten SOS-Proteins kloniert. Das auf diese Weise fertig gestellte Konstrukt dient als Matrize zur Herstellung des molekularen „Köders“ in den Hefezellen. Dies wurde auch mit Hilfe eines Western Blots überprüft (Abb. 4.27).

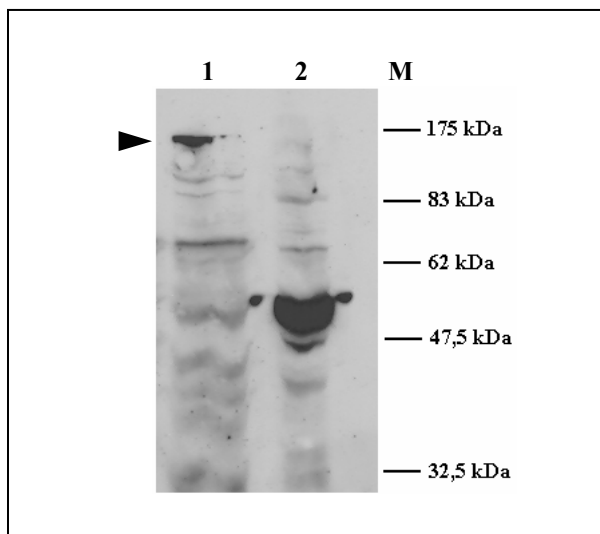


Abb. 4.27: Western Blot mit den Hefe-Proteinextrakten, geprobt mit dem MAK nb200/7 1:50. Spur 1: Proteinextrakt aus den Zellen mit dem „Köder“ Konstrukt. Zu erwarten ist ein Signal bei ca.150 kDa, das dem SOS-SAP47 Fusionsprotein entspricht (Pfeilspitze). Die Größe des Proteins setzt sich aus dem vektoreigenen SOS Proteinfragment (1067 Aminosäuren) und dem SAP47 Anteil (347 AS, entsprechend ca. 47 kDa) zusammen. Spur 2: Proteinextrakt aus *Drosophila* Wildtyp Köpfen (8x) als positiv Kontrolle. Zu sehen ist ein starkes Signal bei ca. 47 kDa (SAP47-Protein). M: Marker.

Die Analyse der Hefe-Proteinextrakte hat gezeigt, dass der gewünschte molekulare „Köder“ in der Hefe hergestellt wird.

Da die Selektion der „Beute“-Proteine bei dem CytoTrap Verfahren auf der Temperatursensitivität der Hefe-Zellen beruht, wurde als nächstes getestet, ob der klonierte „Köder“ in dieser Form die Sensitivität der Zellen aufheben kann. Die Methode ist in dem Stratagene CytoTrap Handbook ausführlich beschrieben und ist dort nachzulesen. Der Test zeigte, dass das „Köder“ Protein an sich keine Auswirkungen auf die Temperatursensitivität der Zellen hat. Somit sind die Voraussetzungen für einen Screen erfüllt. Die Transformation der cDNA-Bibliothek sowie die Selektion der Hefe-Klone erfolgte nach der Stratagene CytoTrap Anleitung. Das Screenen von ca. $5,77 \cdot 10^4$ Kolonien führte zur Identifizierung von 45 Hefe-Klonen. Die weiteren Tests haben gezeigt, dass 44 der 45 identifizierten Klone temperaturinsensitive Revertanten sind. Nur ein einziger Klon (# 39) hat alle Tests mit Erfolg

bestanden. Der Klon wurde hochgezogen, die „Beute“ Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Bei dem Vergleich der Sequenz mit *Drosophila*-Sequenzdatenbank hat sich herausgestellt, dass es sich um ein bisher unbekanntes Protein (CG12214 Genprodukt) handelt. Das dazugehörige Gen liegt auf dem Chromosom II (46F3-46F3) und wird (laut EST Datenbank) in *Drosophila* Köpfen, Ovarien und Hoden exprimiert.

4. 6. SAP47 Protein aus *Drosophila melanogaster* : Zusätzliche Spleißvarianten

Aus der Datenbank des Berkeley *Drosophila* Genom Projects (BDGP) gab es Hinweise dafür, dass die *Sap47* Genomorganisation, sowie die RNA-Spleißvorgänge wesentlich komplizierter und vielseitiger sind als ursprünglich angenommen (Reichmuth et al., 1995).

Ein überzeugender Beweis für die Anwesenheit von zusätzlichen, bis heute noch unbekanntem SAP47 Isoformen in der Fliege wäre die Visualisierung der entsprechenden Signale auf einem Immunoblot. Schon allein die Tatsache, dass diese zusätzlichen Isoformen bis jetzt unentdeckt geblieben sind, spricht dafür, dass sie nur in geringeren Mengen als die bekannten SAP47 Proteine (Becker, 1997) bei *Drosophila* vorkommen. Folgender Versuch führte zum gewünschten Ergebnis: Es wurden jeweils Homogenate aus vier (statt normalerweise einem) *Drosophila*-Köpfen in jede Spur eines 10%-en Acrylamid-Bisacrylamid Gels (statt 12,5%-ig) aufgetragen. Das Blotting der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte für zwei Stunden (anstatt normalerweise 1 Stunde) und die Inkubation mit dem ersten Antikörper (MAK nc46) verlief ÜN bei 4°C (statt nur 1 Stunde bei RT). Für den Versuch wurde ein frisch aufgetautes Antikörper-Aliquot verwendet. Die Ergebnisse des Experimentes sind in der folgenden Abbildung (4. 28) zu sehen.

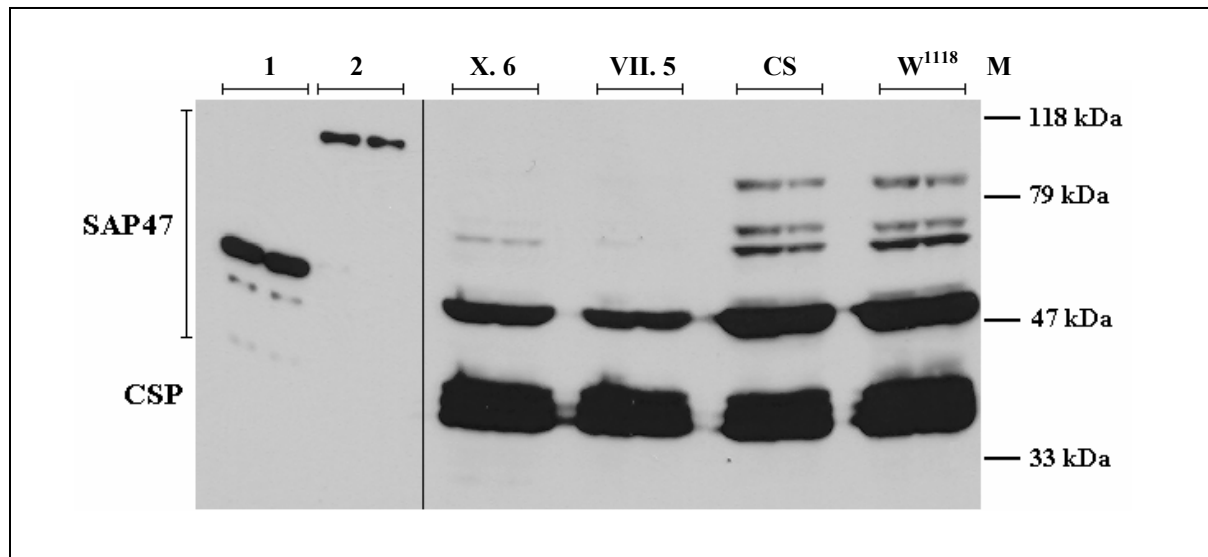


Abb. 4. 28: Western Blot mit Fliegen-Kopfhomogenaten. Die rechte Seite des Blots wurde mit dem MAK nc46 1:1000 ÜN bei 4°C inkubiert. Als Beladungskontrolle wurde MAK ab49 (gegen CSP) in der Verdünnung 1:150 verwendet. In jede Spur wurde Homogenat aus 4 Köpfen aufgetragen. Untersucht wurden für SAP47 wildtypische Stämme w^{1118} und Canton S (CS). Zum Vergleich sind Kopfhomogenate aus zwei verschiedenen RNAi cDNA Linien VII.5 und X.6 zu sehen. Die linke Seite des Blots wurde 1h Bei RT mit dem MAK nb200/7 in der Verdünnung 1:50 inkubiert. Spur 1 enthält gereinigtes His-Tag-SAP47 (347 AS groß, Transkript I) Fusionsprotein; Spur 2: gereinigtes His-Tag-SAP47 (551 AS groß, Transkript V) Fusionsprotein. M: Marker.

Auf dem Western Blot sind mindestens drei Zusätzliche SAP47-Signale zu sehen (bei näherer Betrachtung kann man erkennen, dass das größte Signal eine Doppelbande darstellt).

Diese Signale sind wesentlich schwächer als die Doppelbande bei 47 kDa und (von oben nach unten) ca. 90, 70 und 62 kDa groß. Dass es sich um die echte SAP47 Isoformen handelt, kann man dadurch erkennen, dass die entsprechenden Signale bei den Sap47 RNAi Linien nur noch ganz schwach bis gar nicht mehr zu erkennen sind. Die Beladungskontrolle zeigt, dass in jede Spur ungefähr die gleiche Menge an Homogenat aufgetragen wurde.

Ein Vergleich der Sequenzen aus der *Drosophila* Datenbank und in unserer Arbeitsgruppe sequenzierten Sap47 cDNAs (Becker, 1997) wurde als Ausgangspunkt zur Erstellung einer aktuellen *Sap47* Genstruktur verwendet. Der genomische Locus erstreckt sich über eine Länge von 24 622 bp und umfasst elf Exons und zehn Introns:

Exon neu (alt)	Position im Genlokus (bp)	Länge (bp)	Bemerkungen
1 (1)	1-1 222	1 222 (kodierend: 215)	Translationsstart: 1008
2	9 831-9 878	48	
3 (2)	16 484-16 732	249	

4 (3)	19 040-19 116 19 040-19 137	77 98	wird an den Positionen 19 166 und 19 137 alternativ gespleißt
5 (4)	19 465- 19 565	101	
6 (5)	19 629-19 903	275	
7 (6)	19 969-20 087	119	
8	20 872-21 189	318	
9 (8)	21 747-22 292	546 (kodierend: 17)	Translationsstop:21 763
10 (7)	22 474-22640	167 (kodierend: 5)	Translationsstop: 22 479
11	24 202-24 622	421 (kodierend: 230)	Translationsstop: 24 431

Anhand dieser Daten wurde folgende vorläufige Exon-Intron Struktur des *Sap47*-Gens erstellt (Abb. 4. 29).

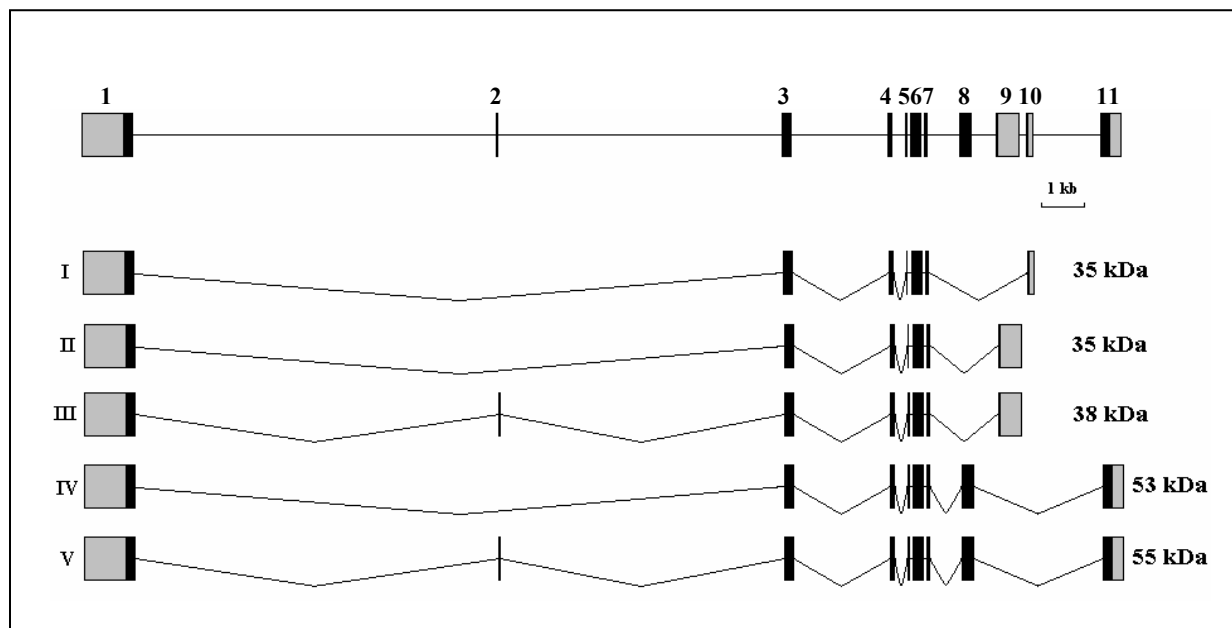


Abb. 4. 29: Genomische Organisation des *Sap47* Gens. Dargestellt ist die vorläufige Exon-Intron Struktur des Gens (oben). Die Exons sind als horizontale Balken dargestellt und von 1 bis 11 durchnummeriert, wobei die grau-gefüllte Balken nicht translatierte Anteile symbolisieren. Unten sind fünf bis jetzt beschriebene Transkripte des Gens zu sehen. Rechts neben Transkripten sind die berechneten Molekulargewichte für die kodierten Proteine angegeben.

Ein Vergleich mit der früher vorgeschlagenen *Sap47* Exon-Intron Struktur (Becker, 1997) zeigt, dass es drei neue Exons (2, 8 und 11) dazugekommen sind. Die Exons 9 (früher 8) und 10 (früher 7) liegen in umgekehrter Reihenfolge zueinander als bisher angenommen: Exon 9 befindet sich 5' von Exon 10. Die Exons 9, 10 und 11 enthalten jeweils Stop-Kodons, die das offene Leseraster beenden und werden bei den verschiedenen Spleißvarianten alternativ

benutzt. Die Exons 1 (hier befindet sich auch vermutlich für alle Transkripte der Translationsstart), 3, 4, 6 und 7 kommen in allen bisher bekannten Transkripten vor, die Exons 2 und 8, sowie der 3'-Bereich des Exons 5 werden alternativ benutzt und verursachen damit die Vielfalt an *Sap47* Transkripten.

5. Diskussion

5.1. Gezielte Mutagenese des *Sap47* Gens durch homologe Rekombination

Transposable P-Elemente spielen eine zentrale Rolle bei der gezielten Mutagenesierung der Gene bei *Drosophila*. Diese Methode wird oft allen anderen Möglichkeiten bevorzugt.

Die gezielte P-Element Mutagenese sowie auch die andere „klassische“ Verfahren zur Erzeugung von Mutationen (γ -Strahlenmutagenese, EMS-Mutagenesen) wurden mehrmals zur Ausschaltung des *Sap47*-Gens eingesetzt. Sonja Becker (1997) konnte in Laufe ihrer Dissertation eine Doppelmutante für die Gene *blp* und *Sap47* erzeugen. Allerdings scheiterten alle Versuche, das im ersten Larvenstadium lebenswichtige *blp*-Gen bei der Doppelmutante zu retten (Becker, 1997; Huber, 2003).

Da alle bisher verwendeten „klassischen“ Verfahren, eine *Sap47*-Mutante herzustellen, ohne Erfolg blieben, wurde versucht das Ziel durch den Einsatz von zwei „neueren“ Methoden zu erreichen. Eine der beiden im Laufe dieser Arbeit angewendeten Mutagenese-Methoden ist die gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination („gene targeting“ Mutagenese). Diese Methode hat sich in der Hefe- und Maus-Forschung als sehr effektiv durchgesetzt und ist daher sehr beliebt, was aus der Jahr für Jahr rapide steigenden Anzahl an Publikationen hervorgeht (Müller, 1999). Die Grundprinzipien dieses Verfahrens wurden bereits in den siebzigen Jahren für die Hefe entwickelt und später, nach der Kultivierung von embryonalen Stammzellen aus Blastocysten der Maus (Evans & Kaufmann, 1981; Martin, 1981), für die Säugertiere etabliert. Im Jahr 2000 gelang es einer Arbeitsgruppe in Utah (Rong & Golic, 2000), gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination auch bei *Drosophila* erfolgreich durchzuführen, und etwas später konnten sie diesen Erfolg wiederholen (Rong & Golic, 2001). Diese Arbeiten waren der Anlass zu dem Versuch, die Methode zur Mutagenesierung des *Sap47*-Gens einzusetzen.

Der entscheidende Faktor bei der homologen Rekombination ist die Länge der „donor:target“ Homologie. Die Wahrscheinlichkeit der Rekombination steigt sich mit zunehmender Länge der Homologie (bis 10 kb) zwischen dem Donor und „Ziel-Locus“. Das gilt sowohl für die Maus (Hasty, 1991) als auch für das *Drosophila*-System (Rong et al., 2002). Bei *Drosophila* kann die Effizienz der Rekombination je nach Länge des Donor-Konstruktes und Lage des „target“s im Genom zwischen 1 in 500 bis 1 in 30 000 Gameten variieren (Rong, 2002). Aus diesem Grund wurden zwei unterschiedlich große „ends-in“ Donor-Konstrukte für *Sap47* fertig gestellt. Die „donor:target“ Homologie des ersten Konstruktes erstreckt sich über eine Länge von ca. 5 kb, bei dem zweiten beträgt sie ca. 7,6 kb. Die beiden Konstrukte wurden in

den w^{1118} Stamm injiziert und mehrere transgene Linien etabliert. Die relativ niedrige Rate der Transformationsereignisse (vier transgene Linien aus ca. 1200 injizierten Embryonen für das erste Konstrukt und nur eine Linie aus ca. 2000 injizierten Tieren für das zweite) kann zum Ersten durch die Größe der Konstrukte (sie beträgt im ersten Fall ca. 15 800 Basen und für das zweite Konstrukt ca. 18 400 bp) und zum Zweiten durch die Eigenschaften des Transformationsvektors erklärt werden. Ein Versuch den w^{1118} Stamm erneut zu transformieren wurde aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

Bei der Kreuzung der transgenen Fliegen mit den FLP/I-SceI Stämmen von Kent G. Golic hat sich herausgestellt, dass nur drei der insgesamt fünf Linien für die „gene targeting“ Mutagenese eingesetzt werden können. Das Donor-Konstrukt einer der fünf Linien (5 kb Homologie, Insertion auf dem X Chromosom) konnte durch die Flipase nicht in den extrachromosomalen Zustand gebracht werden (s. auch Tabelle 1). Dies könnte durch die Beschädigung des Konstruktes bei der Insertion ins Genom zu erklären sein, das Problem wurde aber nicht weiter untersucht. Eine andere der fünf Linien (5 kb Homologie, Insertion auf dem II. Chromosom) ist homozygot letal, und auch die für die Mutagenese essentielle genetische Kombination $P[Sap47, w^+]/FLP-SceI$ hat sich als nicht lebensfähig erwiesen (s. auch Tabelle 1).

Drei der fünf transgenen Donor-Linien (zweimal mit der 5 kb Homologie und einmal mit dem 7,6 kb großen „donor:target“ Homologie-Bereich) haben sich für die Mutagenese qualifiziert und wurden mit FLP/I-SceI Linien gekreuzt. Insgesamt wurden drei verschiedene FLP/I-SceI Fliegenstämme (alle von Kent G. Golic) verwendet.

Um die unter Hitzeschock-Kontrolle stehenden Transgene für die FLP Rekombinase und die I-SceI Meganuklease zu aktivieren, wurde die F1 Generation früh in ihrer Entwicklung hitzegeschockt (s. auch Abb. 4.4 und 4.6). Der Hitzeschock wurde für 1 Stunde im 37°C-Raum durchgeführt. Die Versuche, die beiden Transgene durch 1 Stunde Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad (Golic & Lindquist, 1989) zu aktivieren, führten dazu, dass sich aus den Kreuzungen nur balancierte und so gut wie keine (sprich 1-3 Fliegen/Glas) Tiere der $P[Sap47, w^+]/FLP-SceI$ Kombination entwickelten. Es ist beschrieben (Golic & Linquist, 1989), dass 1 Stunde Hitzeschock bei 37°C Lufttemperatur ca. 30 min im 37°C Wasserbad entspricht und weniger effizient ist. Wegen der Letalität der Nachkommen wurde aber die F1 Generation im 37°C-Raum hitzegeschockt. Diese Maßnahme war jedoch ausreichend dafür, dass 100% der Tiere mit dem $P[Sap47, w^+]/FLP-SceI$ Genotyp Mosaik-Augen bis weiße Augen entwickelten. Eine Verlängerung der Hitzeschockzeit auf 1h 20 min zeigte keinen

gravierenden Unterschied, noch längere Inkubation bei 37°C führte in qualitativen Vorversuchen zur zunehmenden Letalität der Nachkommen.

Zur weiteren Kreuzung wurden F1 Tiere mit Mosaik-Augen bzw. weißen Augen, überwiegend Weibchen, verwendet. Rong und Golic (2002) konnten zeigen, dass die Rekombination in der weiblichen Keimbahn wesentlich effizienter als in der männlichen abläuft. Aus diesem Grund wurde auch bei der Mutagenese mit dem 7,6 kb homologen Bereich auf die Männchen verzichtet und nur die F1 Weibchen zur weiteren Kreuzung eingesetzt.

Die homologe Rekombination findet in der Keimbahn der F1 Tiere während der mitotischen Teilung der Keimzellen statt (Rong et al., 2002). Aus diesem Grund wurden alle Nachkommen (= F2 Generation, s. auch Abb. 4.4 und 4.6) nach der Augenfarbe sortiert. Wird das Donor-Konstrukt durch die Flipase-Aktivität aus dem Genom der Keimzelle entfernt, entsteht ein extrachromosomales DNA-Fragment, welches durch die homologe bzw. nichthomologe Rekombination eine neue Position im Genom annehmen kann. Solche potentielle „Kandidaten“ zeichnen sich durch die rote Augenfarbe aus. Ebenfalls rote Augenfarbe bekommen die Tiere, die sich aus den Keimzellen mit dem nichtmobilisierten Donor entwickeln (sog. Hintergrund Tiere). Der überwiegende Anteil der F2 Generation entwickelt sich aus den Keimzellen, die das Donor-Konstrukt durch Rekombination aus dem Genom entfernt und in Laufe der weiteren Zellteilungen verloren haben. Diese Tiere besitzen daher weiße Augen.

Die rotäugigen Tiere der F2 Generation wurden weiter verpaart und der Insertionsort des Donors näher charakterisiert. Diese Kreuzungen haben gezeigt, dass die rote Augenfarbe der Tiere in allen Fällen durch das nichtmobilisierte Donor-Konstrukt verursacht wurde. Nur in einem Fall handelte es sich um ein nichthomologes Rekombinationsereignis (Transposition des Donors vom Chromosom II auf das X. Chromosom).

Es wurde bereits vermutet, dass die räumliche (dreidimensionale) Position von „donor“ und „target“ im Zellkern einen Einfluss auf die Effizienz des Verfahrens haben kann (Rong et al., 2002). So wurden z. B. für das Gen GC (γ -glutamyl carboxylase) vier unterschiedliche Insertionen des 6,9 kb großen Donors getestet (Rong et al., 2002). Drei der vier Insertionen (vermutlich wegen ihrer ungünstigen Lage im Zellkern?) haben zu keinem Positiven Ergebnis geführt.

Im Fall des *Sap47*-Gens wurden drei unterschiedliche Linien mit den Insertionen je einmal auf dem I, II und III. Chromosom getestet. Der Ansatz von keiner der drei Linien führte

allerdings zum gewünschten Ergebnis, obwohl die Anzahl der für die Mutagenese eingesetzten F1 Tiere ausreichen sollte.

Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Länge des homologen Bereiches von Donor und Target zu gering war, um zu einem positiven Ergebnis zu führen. Allerdings beschreiben Rong und Golic (2001) eine erfolgreiche Mutagenese mit einem 2,5 kb großen Homologie Bereich, der somit wesentlich kleiner war als der für *Sap47* verwendete.

Die absolute Frequenz der homologen Rekombination ist außerdem Locus-abhängig und kann durch Unterschiede in der Chromatinstruktur beeinflusst werden (Müller, 1999; Rong et al., 2002).

5. 2. Versuche zur Unterdrückung der SAP47 Expression mittels RNA interference

Da die Versuche, das *Sap47* Gen durch „gene targeting“ auszuschalten, erfolglos blieben, wurde versucht, die Expression mit Hilfe von RNA interference zu unterdrücken. Die beiden Möglichkeiten Genexpression zu beeinflussen, unterscheiden sich im wesentlichen dadurch, dass die „gene targeting“ Mutagenese die Expression auf der DNA-Ebene reguliert, die RNAi greift dagegen auf der Ebene des Transkriptionsproduktes an. Das erklärt auch die Unterschiede in der Effektivität der Methoden, die Proteinexpression zu unterdrücken.

Obwohl mit Hilfe von RNAi keine vollständige Ausschaltung der Gen-Aktivität erreicht werden kann, wird diese Methode von vielen Arbeitsgruppen dem „gene targeting“ vorgezogen (Giordano et al., 2002; Kennerdell & Carthew, 2000; Kalidas & Smith, 2002), da sie ohne großen Aufwand und relativ „sicher“ ans gewünschte Ziel (= spezifische Reduktion der Expression) führt.

Um die Expression von SAP47 in *Drosophila* mittels RNAi zu reduzieren, wurden zwei unterschiedliche Konstrukte angefertigt und zur Herstellung transgener Tiere verwendet. Bei dem ersten Konstrukt handelt es sich um einen „klassischen“ RNAi Ansatz, bei dem das Konstruktaus zwei cDNA-Fragmenten, kloniert in Form von „inverted repeats“, besteht. Diese Form der RNAi Konstrukte stellt eine optimale Matrize für den Auslöser des RNAi Mechanismus dar. Allerdings können „inverted repeats“ Fragmente bereits bei der Klonierung der Konstrukte Komplikationen hervorrufen, da sie meistens ungewöhnlich stabile (energetisch günstige) Sekundärstrukturen ausbilden, welche durch das Reparatursystem der bakteriellen Zelle erkannt und beseitigt werden. Auch nach dem Einbringen des Konstruktes in die gewünschte Spezies (z. B. *Drosophila*, Maus usw.) behalten palindromische Transgene

die Fähigkeit zur Bildung von stabilen Sekundärstrukturen. Diese Strukturen können in den transgenen Tieren ebenfalls als Fehlbildungen auf DNA-Ebene erkannt und „repariert“ werden. Meistens entstehen dabei kleine asymmetrische Deletionen in der Mitte des Palindroms, manchmal kann es zum nahezu vollständigen Verlust des Transgens führen. In jedem Fall wird durch diese Veränderungen die Struktur des Transgens stabilisiert (Giordano et al., 2002; Collick et al., 1996). Dieses Phänomen betrifft sowohl die somatischen- als auch die Keimzellen der transgenen Tiere. In manchen Fällen werden solche Änderungen in der ursprünglichen Struktur der „inverted repeats“ in 15-56% der transgenen Tiere beobachtet (Akgun et al., 1997).

Um die palindromischen Sequenzen zu stabilisieren können heterologe Sequenzen zwischen den beiden Hälften des Konstruktes eingefügt werden (Piccin et al., 2001). Das erleichtert die Klonierung der Konstrukte in Bakterien und verhindert den Verlust von Konstrukt-Teilen nach der Insertion ins Genom. Bereits 200 bp große heterologe DNA Sequenzen reichen aus, um die Struktur solcher instabiler Konstrukte zu schützen (Giordano et al., 2002; Lobachev et al., 2000).

Eine Alternative zu den stabilisierenden heterologen Sequenzen hat eine Gruppe aus Dallas entwickelt (Kalidas & Smith, 2002). Getestet wurden RNAi Konstrukte, welche in „sense“ Richtung genomische Bereiche (Exons und Introns) des gewünschten „Ziel-Gens“ tragen, fusioniert an das dazugehörige cDNA-Fragment in invertierter Orientierung. Durch das Vorhandensein von Introns im „sense“-Bereich kann keine perfekte palindromische Sequenz entstehen. Solche Konstrukte lassen sich leichter klonieren und sind auch stabil im Genom der transgenen Tiere. Nach der Transkription des Transgens werden die Introns durch Spleißen entfernt und „inverted repeats“ entstehen erst auf RNA Ebene.

Die Herstellung des Sap47 RNAi cDNA Konstrukts, welches bereits selbst eine perfekte palindromische Sequenz darstellt, wurde erst durch den Einsatz von SURE2 Zellen der Firma Stratagene und durch Hochziehen der Bakterien bei 30°C möglich. Das genomische Sap47 RNAi Konstrukt enthält in „sense“ Richtung einen ca. 7 kb großen genomischen Bereich des *Sap47* (von Exon II bis Exon VII) und in „antisense“ Orientierung ein entsprechendes ca. 0,85 kb großes cDNA-Fragment (ExonII-ExonVII). Die Injektion der beiden Konstrukte in Embryonen des w¹¹⁸ Stamms führte zur Isolierung von mehreren unabhängigen transgenen Linien (s. auch Tabellen 3 und 4).

Da die eigentliche Ziel des Experimentes die ubiquitäre Unterdrückung der *Sap47* Expression ähnlich einer Null-Mutante war, wurden transgene Tiere mit einer actin-Gal4 Treiber Linie gekreuzt und die SAP47 Expression bei den Nachkommen mittels Western Blots getestet. Die

Auswahl der Treiberlinie hing mit folgenden Überlegungen zusammen: der *actin* Promoter ist in allen Zellen aktiv, was zu einer ubiquitieren Herstellung des GAL4 Führt. Da das Expressionsmuster des *Sap47*-Gens abgesehen von der starken Aktivität im Nervensystem noch nicht bekannt ist, gewährleistet die ubiquitäre Expression des GAL4 Proteins den Abbau der *Sap47* mRNA in jeder einzelnen Zelle.

Die Western Blot Analyse von Kopfhomogenaten zeigt sehr große Schwankungen in der Menge an SAP47 bei den verschiedenen RNAi Linien. Die Restexpression bei den Sap47 RNAi cDNA Tieren schwankt je nach Linie zwischen ca. 6% und 100%, d.h. gar keine Reduktion in der Expression. Diese Schwankungen wurden auch zwischen den Linien, welche ursprünglich von einem injizierten Tier stammen (=Geschwister) beobachtet (z. B. RNAi Linien, deren Bezeichnung mit römischen I oder VII anfängt).

Die genomische DNA der 12 transgenen Linien wurde mit Hilfe einer Southern Blot Analyse auf das Vorhandensein des Transgens überprüft. Durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *NotI* sollte sich das vollständige Transgen-Inserts nachweisen lassen. Die Größe der Insert-Fragmente wurde mit der Größe des ursprünglichen Inserts verglichen. Diese Analyse zeigte, dass drei der zwölf untersuchten RNAi Linien (=25%) gar kein nachweisbares Insert mehr tragen, obwohl sie durch ihre rote Augenfarbe als transgene Linien gekennzeichnet sind. Dies steht im Einklang mit bisherigen Befunden anderer Arbeitsgruppen (Giardano et al., 2002, Collick et al., 1996), dass perfekte palindromische Sequenzen instabil sind und zu Deletionen oder Rekombination neigen.

Ein Vergleich der Southern Blot Analyse mit dem Western Blot zeigt erwartungsgemäß eine Übereinstimmung der Ergebnisse: nur vollständige Inserts führen zu signifikanter Reduktion der Expression. Das gilt für die Sap47 RNAi cDNA Linien I.2, I.15, IV.1, V, V.7 und X.8. Zwei der zwölf untersuchten Linien (I.4 und IV.2) zeigen zwar im Southern Blot ein intensives Insert-Signal bei ca. 2,2 kb, aber keine überzeugende Reduktion in der SAP47 Expressionsstärke. Das deutet darauf hin, dass neben der Anwesenheit eines intakten RNAi Konstruktes im Genom der transgene Tiere der Insertionsort für die Reduktion in der Proteinexpression von Bedeutung ist. Allerdings ist eine schwache Reduktion (bis ca. 30%) der Expression mittels eines einfachen Western Blots aufgrund möglicher Sättigungseffekte schwer nachzuweisen.

Besonders komplex scheint die Sap47 RNAi cDNA Linie II.2 (Spur 7 des Southern Blots) zu sein. Diese Linie weist nur ein ganz schwaches Signal bei 2,2 kb auf, welches auf ein intaktes Insert nur in einigen der gleichzeitig analysierten 100 Tiere hinweist. Dies entspricht auch den Ergebnissen der Western Blot Analyse: zwei der sechs analysierten Tiere zeigen eine

deutliche Reduktion in der SAP47 Expression (die Restexpression beträgt nur noch ca. 15 % der ursprünglichen Proteinmenge), vier der sechs Tiere zeigen ein wildtypisches SAP47 Signal. Aufgrund dieser Befunde kann gefolgert werden, dass die II.2 RNAi Linie ursprünglich ein funktionelles Konstrukt besitzt hat, das bei einem Teil der Tiere im Laufe der Zeit (=2-3 Generationen) verloren ging.

Kreuzungen der Sap47 „RNAi genomisch“ Linien mit der actin-Gal4 Treiber Linie führten ebenfalls zur Reduktion in der SAP47 Expression, was mittels Western Blot Analyse sowie immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen wurde. Auch in diesem Fall schwankt die Intensität der SAP47 Restexpression enorm: bei den Linien 2.1-2.7, die ursprünglich von einem injizierten Tier abstammen, beträgt sie ca. 12% der wildtypischen Expression, für die Linien 3.1, 3.2 und 7.3-7.10 konnte keine sichtbare Reduktion nachgewiesen werden. Auffällig ist aber, dass hier zwischen den einzelnen „Geschwister“-Linien keine großen Schwankungen in der Proteinexpression nachzuweisen sind. Das könnte einerseits durch die stabile Struktur des RNAi Konstruktes zu erklären sein, und andererseits aber auch an der Größe des Konstruktes liegen. Die Größe des Konstruktes ist unter anderem für die Transpositions-Effizienz beim Transformieren der Tiere verantwortlich. Je kleiner das Konstrukt, desto leichter inseriert es ins Genom. Da es sich bei dem Sap47 „RNAi genomisch“ Transgen um ein ca. 16 kb großes Konstrukt handelt (ca. 9 kb Vektor-Anteil plus ca. 7 kb Insert) ist die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Keimbahnzellen von der Insertion betroffen werden, vergleichbar klein. Die Geschwister-Linien leiten sich daher vermutlich von einer einzigen transgenen Keimbahnzelle ab, die nach dem Insertionsereignis noch mitotische Teilungen durchlaufen hat.

Die Arbeitsgruppe von Dean P. Smith berichtet, dass „RNAi genomisch“ Konstrukte nachweisbar effektiver im Vergleich zu den RNAi cDNA Konstrukten sind (Kalidas & Smith, 2002). Ähnliche Beobachtungen beschreiben auch Neil A. Smith mit Kollegen (Smith et al., 2000) sowie Young Sis Lee und Richard W. Carthew (2003), dabei soll die Quelle der Introns keine wesentliche Rolle spielen, es sind auch Kombinationen zwischen den Exons eines Gens und Introns eines anderen möglich. Die Autoren vermuten, dass der Spleißvorgang möglicherweise den Transport der dsRNA ins Cytoplasma begünstigt. Aus diesem Grund wurde versucht die beiden Sap47 RNAi Konstrukte mittels Western Blot Analyse direkt zu vergleichen. Für den Versuch wurden mehrere unabhängige Sap47 RNAi cDNA Linien mit der SAP47 Restexpression im Bereich 6-25% und die „beste“ RNAi genomisch Linie (Linie 2) ausgewählt. Ein Vergleich der Restexpression bei diesen Tieren unter identischen Bedingungen zeigt, dass das RNAi cDNA Konstrukte eine stärkere Reduktion der Expression

mit sich bringen. Allerdings zeichnen sich diese Tiere auch durch mehrere unabhängige Insertionen des Konstruktes aus, deren Funktionalität einzeln nicht untersucht wurde. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse der Southern Blot Analyse zeigen, sind die RNAi cDNA Konstrukte äußerst instabil und können durch die Reparatursysteme der Zelle beschädigt werden, was einen Funktionalitätsverlust des Transgens mit sich bringt. Deswegen darf man nicht ohne weiteres davon ausgehen, dass das Vorhandensein zweier Insertionen automatisch mit der Anwesenheit zweier funktionstüchtiger Konstrukte gleich gesetzt werden kann. Auch die Anzahl der für das RNAi cDNA Konstrukt getesteten Linien übersteigt die für das RNAi genomisch. Aus diesen Gründen können keine endgültigen Aussagen über die Effektivität der beiden Konstrukten gemacht werden.

5. 3. Versuche zur Phänotypisierung der RNAi Tiere

An die Herstellung eines neuen (mutanten bzw. transgenen) Organismus muss sich die Suche nach dem Phänotyp anschließen, der durch die genetische Veränderungen bedingt ist. Diese Arbeiten sind oft wesentlich zeit- und arbeitsaufwendiger als die Herstellung des Organismus selbst. In Laufe dieser Arbeit konnten aus Zeitgründen nur wenige einfache Experimente zur Ermittlung eines Phänotyps bei Sap47 RNAi Tieren durchgeführt werden.

Das SAP47 Protein aus *Drosophila melanogaster* wird prominent im Nervensystem der Tiere exprimiert. Das wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen und Western Blot Analyse untersucht (Reichmuth et al., 1995) und hier bestätigt. Aufgrund der Lokalisation des Proteins im Cytoplasma der synaptischen Boutons stellt sich die Frage, ob seine Abwesenheit zu den Veränderungen in der Morphologie der Endigungen führt. Diese Frage kann durch die Färbung von larvalen Nerv-Muskel Präparaten mit Antikörpern gegen ein an der Synapse lokalisiertes Protein und den Vergleich der Morphologie mit dem Wildtyp beantwortet werden.

Bei der Färbung des larvalen Nerv-Muskel Präparates von Sap47 RNAi Tieren (RNAi cDNA Linie VII.5) mit dem MAK ab49 (anti CSP) und dem qualitativen Vergleich der Ergebnisse mit dem Wildtyp waren keine auffälligen morphologischen Unterschiede zu sehen. Der Nerv-Muskel Präparat der RNAi Larven sieht Wildtyp-ähnlich aus. Der Nachweis von kleineren Unterschieden in der Zahl der Boutons, ihrer genauer Verteilung auf den Muskeln oder den Verzweigungsmustern der Motoneuronen wurde jedoch umfangreiche quantitative Analysen erfordern, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren.

Bei den Kreuzungen der RNAi Linien fiel auf, dass die Weibchen der RNAi genomisch 2. ... Linien in Kombination mit den actin-Gal4 Treiber steril sind. Da es sich hier um einen

möglichen SAP47 Phänotyp handeln könnte, wurden diese Tiere durch Einzelkreuzungen mit w^{1118} Männchen genauer untersucht. Diese Kreuzungen haben gezeigt, dass 100% der Tiere mit dem w^- ; $\frac{P[\text{actin-Gal4}, w^+]}{+}$; $\frac{P[\text{sap47gen-sap47cDNA}, w^+]}{+}$ 2. ... Genotyp steril sind und keine Nachkommen produzieren. Allerdings zeigen andere RNAi Linien diesen Phänotyp nicht, auch nicht die Linien VII.5 und VII.10, die eine noch stärkere Reduktion der SAP47 Expression als die Linien 2. ... bewirken. Auch die Kombination der Linie 2. ... mit einem anderen ubiquitären Gal4 Treiber (tubulin-Gal4) zeigt keinerlei Reduktion der Fertilität. Aufgrund dieser Befunde kann mit großer Wahrscheinlichkeit gefolgert werden, dass die Sterilität auf den Insertionsort der Linie 2. ... in Kombination mit der actin-Gal4 Linie zurückzuführen ist und es sich um keinen echten SAP47 Phänotyp handelt

5. 4. Jump-out Mutagenese des *Sap47*-Gens

Für die Jump-out Mutagenese des *Sap47*-Gens wurde die vor kurzem isolierte P-Element Linie EY07944 mit der Insertion in dem 5'-nichttranslatiertem Bereich des Gens verwendet. Durch Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass die Insertion an sich keinen Einfluss auf die Expression des Gens hat. Dies ist nicht verwunderlich, da die kodierenden Bereiche des Gens durch die Insertion des EY-Elementes nicht betroffen sind. Es wurden insgesamt ca. 230 Tiere, die ihr EY-Element komplett bzw. seine Fragmente inklusive $\text{mini-}w^+$ Gen verloren haben, auf Expression von *Sap47* mittels Western Blot getestet. Da die für die Jump-out Mutagenese eingesetzte autonome Transposasequelle $P[\Delta 2-3, ry^+]$ mit dem dominanten *Stubble*⁻ (Sb) Marker gekoppelt ist, wurde die F2-Generation nach weißäugigen Tb Tieren selektioniert und diese zur weiteren Kreuzung verwendet. Auf alle mit Sb markierten „Jump-out-Kandidaten“ (ca. 50% der in Frage kommenden Tiere) wurde verzichtet, da sie von dem mit Sb gekoppelten Transposase Konstrukt nicht ohne weiteres zu unterscheiden waren. Diese Tatsache senkte die Erfolgsrate der Mutagenese um ca. 50%. Außerdem verminderte auch die mögliche Rekombination zwischen dem EY07944 tragenden Chromosom und dem Chromosom mit der Transposase Quelle in den Keimzellen der F1-Generation die Erfolgchancen der Mutagenese, da durch die Rekombination das EY07944 Chromosom möglicherweise mit Sb-Marker markiert und dabei nicht weiter untersucht wurde.

Das Screenen von ca. 230 Tieren führte zur Isolierung von drei Linien mit letalem Phänotyp, drei Linien mit einer Reduktion in der Expression von *Sap47* und drei weiteren Linien, für die auf dem Western Blot keine SAP47 Expression mehr nachgewiesen werden konnte.

Der letale Phänotyp der drei Linien (Jo # 27, Jo # 50 und Jo # 123) ist mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf eine durch unpräzises Entfernen des EY-Elementes entstandene Deletionen im Bereich des *blp*-Gens zurückzuführen. Das *blp*-Gen liegt ca. 200 bp stromaufwärts vom 5'-Ende des *Sap47*-Gens und ist für die Entwicklung essentiell (Becker, 1997). Deletionen im *blp*-Gen führen zur Letalität der Tiere im 1. Larvenstadium (Becker, 1997; Becker et al., 2001). Diese Linien wurden nicht weiter charakterisiert.

Die Western Blot Analyse der drei Jump-out Linien Jo # 4, Jo # 26 und Jo # 70 zeigte eine Reduktion in der SAP47 Proteinexpression. Diese kann durch Deletionen in den 5'-nichttranslatierten Bereichen des Gens sowie stromaufwärts oder stromabwärts liegenden regulatorischen Elementen hervorgerufen werden. Da diese „regulatorischen“ Jump-out Linien homozygot vital sind, können sich die Deletionen in die 5'-Richtung relativ zur ursprünglichen EY07944-Position bis auf eine Größe von max. 0,47 kb erstrecken, da größere Deletionen unvermeidlich zur Beschädigung des weiter stromaufwärts liegenden *blp*-Gens und somit zur Letalität der Tiere führen würde. Die *Sap47*-Genlokus Analyse für die Linien Jo # 4 und Jo # 70 mittels eines Southern Blots hat gezeigt, dass trotz der durch Mobilisierung des EY-Elementes entstandenen Deletionen Fragmente des EY-Elementes im Genom noch vorhanden sein müssen. Eine genauere Aussage über die Größe der Deletionen sowie der noch vorhandenen Reste des EY-Elementes kann erst nach einer Sequenzierung der betroffenen Bereiche gemacht werden, was aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

Die Jump-out Mutagenese führte auch zur Isolierung von drei unabhängigen Fliegenlinien (Δ Sap47Jo¹⁵⁶, Δ Sap47Jo²⁰¹ und Δ Sap47Jo²⁰⁸), welche keine Expression des SAP47-Proteins auf dem Western Blot und in der Immunhistochemie zeigen und somit Null-Mutanten für das *Sap47*-Gen sind. Die Southern Blot Analyse der genomischen DNA der Tiere hat gezeigt, dass es sich dabei um große und sogar sehr große Deletionen im *Sap47*-Lokus handelt. So zeigt die Jump-out Linie Δ Sap47Jo¹⁵⁶ im Southern Blot ein Signal bei ca. 5,1 kb (statt eines wildtypischen Signals von ca. 7,2 kb), was auf eine mindestens 2,1 kb große Deletion hinweist. Bei der Linie Δ Sap47Jo²⁰⁸ fehlen mindestens 1,3 kb aus dem *Sap47*-Lokus. Die Deletion bei der Jump-out Linie Δ Sap47Jo²⁰¹ erstreckt sich über eine Länge von mindestens 5,8 kb und ist somit die größte aus dieser Mutagenese.

Da alle drei Linien homozygot lebensfähig sind und auch keine offensichtlichen Störungen bei der Entwicklung zeigen, kann ausgeschlossen werden, dass durch die entstandene Deletionen im *Sap47*-Gen das Nachbarn *blp* beschädigt wurde. Bei genauer Betrachtung des *Sap47*-Genlokuses und der umgebenden Sequenzen finden sich noch zwei kleine putative Gene CG5478 und CG31088, die auf dem Gegenstrang in der Nachbarschaft von *Sap47* bzw. im größten Intron des *Sap47*-Gens selbst liegen (Abb. 5. 1).

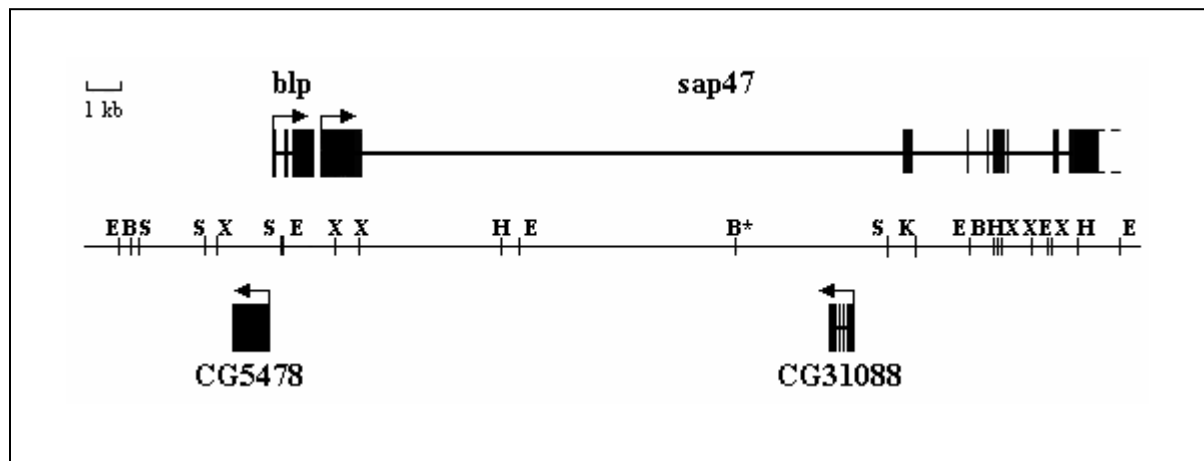


Abb. 5. 1: *Sap47*-Genlokus. In der oberen Teil der Abbildung sind die Gene des „sense“-Stranges dargestellt, der unteren Teil der Abbildung sind die auf dem „antisense“-Strang liegende Gene zu entnehmen. Restriktionsschnittstellen wie in der Abb. 4.21.

Der Transkriptionsstart des CG5478-Gens liegt 1,385 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des *Sap47*-Gens und somit 1,077 kb entfernt von der EY07944 Insertion. Obwohl es sich dabei um eine relativ große Entfernung handelt, kann nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden, dass durch die Mobilisierung des EY-Elementes möglicherweise regulatorische Elemente des CG5478-Gens wie z.B. Enhancer deletiert wurden. Die Beschädigung regulatorischer Elemente ist meistens von Veränderungen des Gen-Expressionsmusters begleitet, führt also zu räumlichen und/oder zeitlichen Modifikationen bzw. Ausfällen in der Genaktivität. Die Größe der Deletionen im *Sap47* lässt vermuten, dass der transkribierte Bereich des CG31088-Gens nicht betroffen sein sollte, zumindest nicht bei den Linien Δ Sap47Jo¹⁵⁶ und Δ Sap47Jo²⁰⁸, die durch kleinere Deletionen ausgezeichnet sind. Da regulatorische Elemente eines Gens eine beliebige Position relativ zum transkribierten Bereich des Gens (stromaufwärts, stromabwärts, in Introns) haben können, könnte es aber durch Deletionen im *Sap47*-Bereich auch zur Entfernung regulatorischer Elemente des CG31088-Gens kommen. Ob die beiden Gegenstrang-Gene (CG5478 und CG31088) in der *Sap47*-Nachbarschaft tatsächlich durch die Deletionen im *Sap47* beeinträchtigt wurden, kann durch eine Northern Blot Analyse bzw. quantitative RT-PCR festgestellt werden. Dies war aber aus zeitlichen Gründen in Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

5. 4. Suche nach den Interaktionspartnern für SAP47

Das SAP47 Protein gehört zu einer neuen Proteinfamilie mit unbekannter Funktion. Die Suche nach möglichen Funktionsaspekten wird durch die Abwesenheit von bekannten Proteindomänen sowie – bis kurz vor dem Abschluss dieser Arbeit – das Fehlen einer Nullmutante erschwert, zwei wichtigen Elementen, die einen Hinweis auf die Funktion des Proteins geben könnten. Eine weitere Möglichkeit, die Funktion eines Proteins zu ermitteln, ist die Suche nach seinen Interaktionspartnern. Diese können möglicherweise direkt oder indirekt einen wichtigen Hinweis geben und damit helfen, die Funktionssuche auf einen bestimmten Bereich einzuschränken. Diese Möglichkeit wurde auch für das SAP47 Protein in Betracht gezogen. Bereits mehrfach wurde in unseren Arbeitsgruppe versucht einen Interaktionspartner für SAP47 mittels Co-Immunpräzipitation zu finden (Schaupp, 1998; Huber, 2003), diese Anstrengungen waren aber nicht erfolgreich.

Eine zur Co-Immunpräzipitation alternative Möglichkeit stellt ein Yeast-Two-Hybrid Screen dar, ein Verfahren, das bereits im vielen Arbeitsgruppen zu wichtigen Befunden führte (Tobaben et al., 2001; Lao et al., 2000). Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine sehr große Anzahl von beliebigen Proteinen in kürzester Zeit und mit relativ kleinem Aufwand getestet werden kann. Aus diesem Grund wurde dieses Verfahren für das SAP47 Protein angewendet.

Um die Methode überhaupt einsetzen zu können, müssen drei Bedingungen erfüllt sein. Zum Ersten muss sichergestellt sein, dass der molekulare „Köder“ in den Hefe-Zellen exprimiert wird. Das geschieht, indem man Proteinextrakte aus den Zellen mit dem entsprechenden Expressionsvektor mit Hilfe eines Immunoblots analysiert. Es stehen mehrere unterschiedliche Hefe-Stämme zur Verfügung (z.B. HF7c, Y190, CG1945 usw.), die unterschiedlich starke Expression des „Köders“ gewährleisten. So ist z.B. für den HF7c Hefe-Stamm (Bartel et al., 1993) eine schwache, für den Y190 Stamm (Harper et al., 1993) dagegen eine starke Expression beschrieben.

Zum Zweiten muss nachgewiesen werden, ob der in Cytoplasma der Hefe-Zellen entstehende „Köder“ in den Kern der Zelle transportiert wird und an die DNA bindet. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten „klassischen“ Gal4 System der Firma Clontech kann diese Frage nicht ohne weiteres überprüft werden.

Zum Dritten muss getestet werden, ob der molekulare „Köder“ von sich aus bereits die unter UAS-Kontrolle stehenden Reportergene aktivieren kann und somit für das System (zumindest

in dieser Form) nicht geeignet ist. Bei dem hier verwendeten Gal4 Verfahren wird dieser Parameter durch einen β -Galactosidase Test untersucht.

Die Expression des GAL4-BD-SAP47 Fusionsproteins in der Hefe konnte mit Hilfe des MAK nb200/7 auf einem Western Blot detektiert werden. Sowohl der Y190 Hefe-Stamm als auch HF7c stellten eine für den Nachweis ausreichende Menge an Fusionsprotein her.

Die Ergebnisse des β -Galactosidase Tests haben dagegen gezeigt, dass die vollständige 347 Aminosäuren kodierende SAP47 Sequenz von sich aus die Reportergene *lacZ* und *HIS3* aktivieren kann und somit als „Köder“ ungeeignet ist. Allerdings war der 199 Aminosäuren große Carboxyterminus von SAP47 in dieser Hinsicht vollkommen inert (Funk, 2000).

Die Verwendung von Proteinfragmenten als molekularer „Köder“ für den Screen von cDNA-Bibliotheken ist in vielen Publikationen beschrieben (z. B. Lao et al., 2000) und ist sogar ratsam, vor allem bei besonders großen Proteinen, da diese von Peptidasen der Hefe in kleinere Fragmente, welche eine unspezifische DNA-Bindeaffinität haben können, zerlegt werden und damit zu einem hohen Anteil an falschpositiven Signalen führen (MacDonald, 2001). Allerdings werden in solchen Fällen meist bestimmte Proteindomänen als „Köder“ eingesetzt. In unserem Fall bleibt die Domänenzusammensetzung des Proteins noch weitgehend ungeklärt, deswegen ist eine willkürliche Fragmentierung des SAP47 Proteins mit der Gefahr verbunden, für die Interaktionen funktionell wichtigen Domänen zu zerstören. Deswegen wurde versucht ein möglichst großes Fragment des SAP47 Proteins, das von sich aus keine Aktivität der Reportergene hervorruft, zu klonieren und für einen Bibliothek-Screen einzusetzen. Durchgesucht wurde die adulte *D. melanogaster* MATCHMAKER cDNA-Bibliothek. Die Transformation erfolgte in HF7c Zellen, welche durch eine stringente Kontrolle des *HIS3* Reportergens ausgezeichnet sind. Das Screenen von ca. $6 \cdot 10^6$ Kolonien (was einer relativ guten Transformationsrate entspricht) führte zur Isolierung von ca. 1000 „positiven“ Klone. Ca. 80% der Klone gingen in den nachfolgenden Schritten verloren. Die cDNA-Inserts von 40 „Beute“-Plasmiden wurde sequenziert und durch Vergleich mit Sequenzen aus der *Drosophila*-Datenbank identifiziert. Anschließend wurden die „Kandidaten“ auf Spezifität der Interaktion mit SAP47 getestet, indem die dazugehörigen „Beute“ Plasmide zusammen mit dem „nackten“ pAS2-1 Expressionsvektor in HF7c und Y190 Zellen gebracht und diese dann der „blau-weiß“ Selektion unterzogen wurden. Die Selektion hat gezeigt, dass alle isolierte „Kandidaten“ allgemein „klebrig“ sind und keine spezifische Interaktion mit dem SAP47 eingehen. Solche „klebrigen“ Proteine kommen als „falsch positive“ Signale bei jedem Screen vor, inzwischen wurden sogar ganze Gruppen von unterschiedlichen „klebrigen“ Proteinen (z.B. ribosomale Untereinheiten, heat-shock Proteine,

Untereinheiten von Proteasomen und Komponenten des Cytoskeletts) beschrieben (Serebriiski & Golemis, <<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>>).

Ergänzend zum Yeast-Two-Hybrid System wurde das CytoTrap Verfahren der Firma Stratagene für die Suche nach Interaktionspartnern für SAP47 eingesetzt. Der größte Vorteil des Verfahrens gegenüber dem „klassischen“ Yeast-Two-Hybrid System besteht darin, dass die Interaktion zwischen dem „Köder“ und „Beute“ im Cytoplasma der Zellen stattfindet. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, den Transport von „Köder“ (und „Beute“) in den Zellkern zu kontrollieren. Außerdem besteht bei dieser System die Möglichkeit, Proteine, welche im „klassischen“ Verfahren von sich aus die Expression der Reportergene stimulieren können (wie z.B. der vollständige ORF von SAP47), als „Köder“ einzusetzen.

Auch für dieses Verfahren ist der molekulare „Köder“ erst dann einsatzbereit, wenn er mehrere Bedingungen erfüllt. Zum Ersten muss ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Protein in den Hefe-Zellen exprimiert wird. Da wir die Domänenzusammensetzung von SAP47 nicht kennen, wurde als erstes versucht, den vollständigen ORF der 347 Aminosäuren großen SAP47 Isoform als „Köder“ einzusetzen. Die Western Blot Analyse der Hefe-Proteinextrakte hat gezeigt, dass das Fusionsprotein in den Zellen vorhanden ist und damit die erste Bedingung erfüllt.

Zum Zweiten muss sichergestellt werden, dass der „Köder“ von sich aus die Selektionsbedingungen nicht aufheben kann. Bei den im CytoTrap Verfahren verwendeten Hefe-Stämmen handelt es sich um temperatursensitive cdc25 Mutanten. Die Zellen können ohne weiteres bei niedrigeren Temperaturen (22-25°C) wachsen, sterben aber bei 37°C ab. Wird diese Besonderheit durch die alleinige Anwesenheit des „Köders“ in den Zellen aufgehoben, ist er für den Screen nicht zu gebrauchen. Der Test hat gezeigt, dass der klonierte ORF von SAP47 von sich aus nicht in der Lage ist, die Temperatursensitivität der Zellen aufzuheben und deswegen für den Screen gebraucht werden kann.

Das Screenen von ca. $5,77 \cdot 10^4$ Klonen führte zur Isolierung von 45 Klonen, die die Fähigkeit besaßen, auch bei höheren Temperaturen zu wachsen. Allerdings sind die cdc25 Hefe Stämme durch eine hohe Mutationsrate ausgezeichnet, was zu einer hohen Anzahl an temperaturinsensitiven Revertanten führen kann. Solche Hefezellen können dann auch in Abwesenheit einer „Köder-Beute“ Interaktion bei 37°C wachsen. Um solche temperaturinsensitiven Revertanten von den „putativ positiven“ Klonen unterscheiden zu können wurden alle Klone auf Galactoseabhängigkeit des Wachstums getestet. Die

temperaturinsensitive Revertanten können auch in der Abwesenheit von Galactose bei 37°C wachsen und unterscheiden sich damit von „putativ positiven“ Klonen, für deren Wachstum Galactose essentiell ist. Der Test führte zur Isolierung von einem Klon, dessen Wachstum galactoseabhängig war. Die Sequenzierung der „Beute“ cDNA aus dem Klon und die anschließende Sequenzanalyse zeigten, dass es sich dabei um ein Transkript des Gens CG12214 handelt. Da das von CG12214 kodierte Genprodukt ein neues Protein mit unbekannter Funktion darstellt, dessen Expressionsmuster abgesehen davon, dass EST Klone aus *Drosophila* Köpfen, Ovarien und Hoden isoliert wurden, ebenfalls unbekannt ist, ist gegenwärtig keine Aussage darüber möglich, ob es sich tatsächlich um einen „echten“ Interaktionspartner für SAP47 handelt. Um die Spezifität der Interaktion nachweisen zu können, müssen zusätzliche Tests durchgeführt werden.

5. 5. *Sap47*: Genorganisation und neue Spleißvarianten

In einer früheren Arbeit (Becker, 1997) wird die *Sap47* Genorganisation bereits als unvollständig bezeichnet, vor allen am 3'-Ende des Gens, sowie im nichttranslatierten Bereich des 5'-Endes. Die neuen Befunde aus der Sequenzdatenbank bestätigten diese Annahme und führten zur Erstellung einer aktuelleren Exon-Intron Struktur des Gens (Abb. 4.25). Das Gen enthält mindestens elf Exons (anstatt acht in dem älteren Modell) und zehn (statt sieben) Introns. Das Gen dient als Matrize für die Herstellung von vermutlich 5 verschiedenen Transkripten, die Existenz dreier (kodierend für 347, 351 und 551 Aminosäuren lange Polypeptide) ist definitiv durch das Vorhandensein der dazugehörigen cDNAs bzw. EST-Klone abgesichert. Die Western Blot Analyse lässt vermuten, dass mindestens 6 unterschiedliche Isoformen des SAP47 Proteins in der Fliege vorkommen. Dabei entspricht das stärkste SAP47 Signal bei ca. 47 kDa vermutlich den 347 und 351 Aminosäuren großen Proteinen. In hoch auflösenden Blots ist das 47 kDa-Signal als eine Doppelbande zu erkennen (s. Abb. 5.2), allerdings dürfte der 4 Aminosäuren Längenunterschied bei den 347 und 351 Proteinen zu klein sein, um eine solche Doppelbande verursachen zu können. Eine Interpretationsmöglichkeit wäre, dass das kleinere Signal den Isoformen mit 347 und/oder 351 Aminosäuren entspricht, während die größere Isoform vom Transkript III des Gens erzeugt wird, welches für 374 Aminosäuren kodiert. Der Unterschied von ca. 20 Aminosäuren entspricht ca. 2 kDa und könnte damit die Doppelbande auf dem Western Blot verursachen.

Posttranslationale Proteinmodifikationen könnten eine alternative Erklärung für die Entstehung der Doppelbande darstellen.

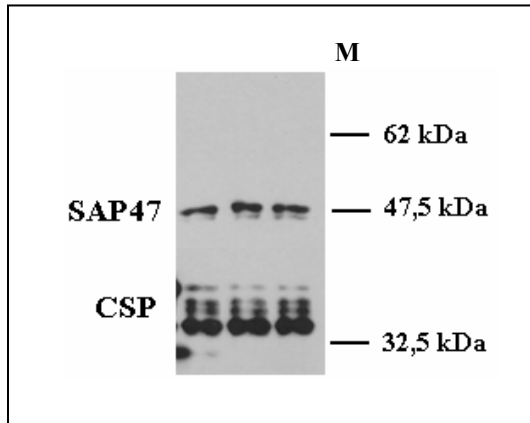


Abb. 5. 2: Western Blot mit den Fliegenkopfhomogenaten. Färbung mit MAK nc46 (1:200) und ab49 (1:250) als Beladungskontrolle. Zu erkennen ist eine Doppelbande bei ca. 47 kDa. M: Marker.

Das Vorhandensein einer 551 Aminosäuren großen SAP47 Variante ist durch die Sequenzierung eines EST Klons abgesichert. Bei der Expression dieses EST Klons in Bakterien lässt sich mit dem MAK nc200/7 ein spezifisches Signal bei ca. 90 kDa in den Zelllysaten nachweisen, das dem Transkript V der Abb. 4. 29 entsprechen sollte. Die Größen-Diskrepanz zwischen dem errechneten Molekulargewicht von ca. 55 kDa und der scheinbaren Größe aufgrund der Laufeigenschaft im Gel lässt sich einerseits durch die Anwesenheit eines His-Tags am N-Terminus des Proteins (trägt ca. 4 kDa zum Molekulargewicht bei), sowie vor allem vermutlich durch die bereits beschriebene ungewöhnlich stabile Sekundärstruktur des Proteins erklären, die sich möglicherweise nicht vollständig durch SDS-Behandlung und Hitzedenaturierung aufheben lässt (Reichmuth et al., 1995).

Auch auf dem Western Blot von Fliegenkopfhomogenaten ist ein entsprechendes Signal zu finden. Bande läuft allerdings etwas tiefer als in den Bakterien exprimiertes His-Tag-Fusionsprotein, was durch das Fehlen des His-Tags gut zu erklären ist. Bei genauer Betrachtung der ca. 90 kDa Bande aus den Fliegenhomogenaten erscheint das Signal als eine Doppelbande. In der Datenbank findet sich auch ein hypothetisches *Sap47* Transkript, das für 535 Aminosäuren kodiert. Dieser 16 Aminosäuren Größenunterschied (entspricht ca. 1,6 kDa) kann eine Doppelbande auf dem Western Blot verursachen.

Auf dem Western Blot erkennt man zusätzlich noch zwei spezifische SAP47 Signale bei ca. 70 und 62 kDa. Allerdings finden sich dazu in der Datenbank keine entsprechenden Transkripte. Das lässt vermuten, dass es bei der Fliege noch zusätzliche *Sap47* Spleißvarianten geben könnte, die allerdings noch nicht beschrieben sind. Man kann auch

nicht ausschließen, dass die ca. 70 und 62 kDa großen Signale modifizierte SAP47 Varianten oder Degradationsprodukte der 90 kDa Isoform darstellen.

Dass es sich bei allen neu dazugekommenen SAP47 Varianten um „echte“ SAP47 Isoformen handelt und nicht etwa um Kreuzreaktionen mit anderen *Drosophila* Proteinen ist dadurch nachgewiesen, dass die dazugehörigen Banden in den Sap47 RNAi Tieren nur ganz schwach bis gar nicht mehr zu erkennen sind. Bei einer Kreuzreaktion mit anderen Proteinen wäre das nicht der Fall.

6. Perspektiven

Ein wichtiger Aspekt, welcher in Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt werden konnte, ist die Charakterisierung der Sap47 RNAi Tiere und Deletionsmutanten. Die Lokalisation des Proteins an der Synapse lässt vermuten, dass z.B. elektrophysiologische Studien am larvalen Nerv-Muskel Präparat sowie Untersuchungen der Ultrastruktur der Synapse mit Hilfe von Elektronenmikroskopie Unterschiede zum Wildtyp aufdecken und damit Hinweise auf die Funktion der SAP47 Proteine liefern könnten.

Interessant dürften auch Experimente zur Untersuchung von Lernfähigkeit und Gedächtnis der Tiere sein. Bei solchen Versuchen bieten die RNAi Tiere gegenüber den Null-Mutanten den zusätzlichen Vorteil, dass die SAP47 Proteinexpression gezielt in beliebigen Gehirnstrukturen unterdrückt werden kann, ohne andere Bereiche dabei zu beeinflussen. Allerdings sollten dafür sowohl die Deletionsmutanten und die RNAi transgenen Tiere als auch die für die Experimente in Frage kommenden Gal4 Treiber Linien in einen rotäugigen Hintergrund eingekreuzt werden, da die weiße Mutation w^{1118} neben der Augenfarbe auch die Lernfähigkeit der Tiere beeinträchtigt.

Das Studium von SAP47-Proteininteraktionen ist ein wichtiger Aspekt bei der Funktionsanalyse des Proteins. Das mit Hilfe des CytoTrap Verfahrens gefundene CG12214 Genprodukt kommt als SAP47-Interaktionspartner in Frage, allerdings soll die „Echtheit“ der Interaktion mit Hilfe von Co-Immünpräzipitation bzw. GST-Pulldown genauer untersucht werden. Auch das Testen der Interaktion in einem anderen Hefe-System kann aussagekräftige Ergebnisse liefern. Es wäre auf jedem Fall wichtig die Interaktion weiter zu verfolgen und zu überprüfen. Bei einer Bestätigung der Interaktion müsste sich die molekulare und funktionelle Charakterisierung des CG12214 Gens anschließen.

Die Frage der genauen Anzahl an *Sap47* Transkripten sollte ebenfalls in Zukunft noch genauer unter die Lupe genommen werden. Interessante Ergebnisse können auch Untersuchungen zur Verteilung der verschiedenen Transkripte in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien liefern. Diese Erkenntnisse könnten eventuell zu Aufklärung der Funktion des Proteins und zur Identifizierung und Lokalisation von SAP47-Proteindomänen beitragen.

7. Zusammenfassung

SAP47 ist ein Synapsenassoziiertes Protein von 47 kDa aus *Drosophila melanogaster*, das zu einer neuen Proteinfamilie mit bis jetzt noch ungeklärter Funktion gehört. Immunhistochemische Färbungen zeigen eine prominente Expression des Proteins im Nervensystem der Fruchtfliege und seine Lokalisation im Cytoplasma der synaptischen Endigungen.

Das *Sap47*-Gen wurde in der Evolution hoch konserviert. Homologe Sequenzen findet man nicht nur bei anderen Insekten, sondern auch bei *C. elegans*, Maus und Mensch. Allerdings zeigt SAP47 mit anderen Proteinen keine ausgeprägte Homologie, die Hinweise auf eine mögliche Funktion geben könnte. Mehrere bisher unternommene Versuche, eine *Sap47* Null-Mutante zu erzeugen, sind ohne Erfolg geblieben. Dadurch entfiel die Möglichkeit, die Funktion des Proteins durch die Feststellung des Phänotyps der mutierten Tiere zu ermitteln. Auch die bisherigen Versuche, mögliche Interaktionspartner für SAP47 zu identifizieren, waren ohne Erfolg geblieben.

Da die Identifizierung und Charakterisierung neuer synaptischer Proteine einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Kommunikation der Nervenzellen sowie möglicherweise der Entstehung von neuronalen Krankheiten leisten kann, wurde in Laufe dieser Arbeit erneut versucht, eine *Sap47* Mutante herzustellen und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Um eine *Sap47* Mutante zu erzeugen, wurden zwei relativ neue Methoden und ein „klassisches“ Verfahren eingesetzt: „gene targeting“ durch homologe Rekombination, RNA interference (RNAi) und Transposon Remobilisierung.

Der erfolgreiche Einsatz der „gene targeting“ Mutagenese bei *Drosophila* wurde zum ersten Mal von Rong und Golic im Jahr 2000 beschrieben. Um dieses Verfahren für die Ausschaltung des *Sap47*-Gens einsetzen zu können, wurden zwei unterschiedlich große „donor“ Konstrukte (ca. 5 kb und ca. 7,6 kb große „donor:target“ Homologie) hergestellt und in die Keimbahn der Fliege transformiert. Es wurden insgesamt fünf unabhängige transgene Linien etabliert: vier für das 5 kb und eine für das 7,6 kb große „donor“ Konstrukt. Durch Kreuzung der transgenen Tiere mit den FLP/SceI Linien von Kent G. Golic wurde das Transgen in einen extrachromosomalen Zustand gebracht und die in Laufe der weiteren Kreuzungen entstandenen Tiere nach Augenfarbe und Position des „donor“'s selektioniert. Das Screenen von insgesamt ca. 280 000 Tieren für das 5 kb große „donor“-Konstrukt und ca. 125 000 Tieren für das 7,6 kb große Konstrukt führte lediglich zur Isolierung eines Individuums

mit einem nichthomologen Rekombinationsereignis. Das eigentliche Ziel, die Herstellung einer *Sap47* Null-Mutante, konnte mit dieser Methode nicht erreicht werden.

Um die SAP47 Expression mittels RNA interference unterdrücken zu können, wurden zwei verschiedene *Sap47* RNAi Konstrukte kloniert. Das erste besteht aus zwei *Sap47* cDNA-Fragmenten, welche in zueinander entgegen gesetzter Orientierung ohne heterologe Sequenzen dazwischen kloniert wurden. Das zweite Konstrukt wird als „RNAi genomisch“ bezeichnet. Es enthält einen ca. 6 kb großen genomischen Bereich des *Sap47*-Gens in der „sense“ Richtung, fusioniert mit dem dazugehörigen 0,85 kb großen cDNA-Fragment in der „antisense“ Orientierung. Beide RNAi Konstrukte stehen unter UAS Kontrolle und können nach der Insertion ins *Drosophila* Genom durch beliebige Gal4-Linien getrieben werden.

Die Transformation der Konstrukte in den w¹¹¹⁸ Stamm führte zur Isolierung von ca. 20 unabhängigen transgenen Linien für das RNAi cDNA-Konstrukt und 11 Linien mit unterschiedlichem Insertionsort für das „RNAi genomisch“ Transgen. Die transgenen Konstrukte wurden durch Kreuzen der Tiere mit einer actin-Gal4 Treiber Linie aktiviert und die SAP47 Expression mittels Western Blot charakterisiert. Die Analyse der Blots zeigte große Unterschiede in der Restexpression von SAP47. Einige Stämme zeigten fast vollständige Suppression mit ca. 6% Restexpression, in anderen war keine sichtbare Reduktion erkennbar. Derartige Expressionsunterschiede wurden sowohl für das RNAi cDNA Konstrukt als auch für das „RNAi genomisch“ Konstrukt beobachtet.

Erste Versuche *Sap47* RNAi Tiere zu phänotypisieren beschränkten sich (aus zeitlichen Gründen) auf eine qualitative Inspektion des Musters synaptischer Boutons auf der larvalen Körperwandmuskulatur. Die Lokalisation des SAP47 Proteins an der Synapse lässt die Spekulation zu, dass seine Abwesenheit (bzw. die starke Reduktion der Expression) zu sichtbaren strukturellen Veränderungen führen könnte. Immunfärbung eines larvalen Nerv-Muskel Präparates mit einem Antikörper gegen ein anderes synaptisches Protein (CSP) zeigte jedoch keine auffälligen Unterschiede in Vergleich zum Wildtyp.

In der Schlussphase der Arbeit führte die regelmäßige Datenbanksuche nach P-Element Insertionen im *Sap47*-Gen und den das Gen umgebenden Sequenzen zur Identifizierung einer Linie mit einer Insertion im 5'-nichttranslatierten Bereich von *Sap47*. Da die Insertion keinen sichtbaren Einfluss auf die *Sap47*-Expression zeigte, wurde eine Jump-out Mutagenese durchgeführt. Unter ca. 230 gescreenten „Kandidaten“ befanden sich drei Linien mit einer deutlichen Reduktion der *Sap47*-Expression und drei Linien mit Deletionen im kodierenden Bereich des Gens, die keine Expression des Proteins auf Western Blot mehr zeigten (*Sap47*

Null-Mutanten). Allerdings konnten diese Tiere im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr näher charakterisiert werden.

Um einen Interaktionspartner für das SAP47 Protein zu identifizieren, wurde zunächst ein Yeast-Two-Hybrid Verfahren der Firma Clontech eingesetzt. Dabei wurde ein 307 Aminosäuren großes SAP47 Fragment als „Köder“ für die Durchsuchung einer adulten *Drosophila* cDNA-Bibliothek nach möglichen Interaktionspartnern verwendet, da der vollständige ORF des SAP47 Proteins zur Aktivierung der Reportergene bereits in Abwesenheit von „Beute“-Proteinen führte und daher nicht benutzt werden konnte. Das Screenen von ca. $6 \cdot 10^6$ Hefe Klonen führte zur Isolierung von 215 „positiven“ Kolonien von denen 40 durch Sequenzierung der „Beute“ cDNA analysiert wurden. Bei der weiteren Bearbeitung und Charakterisierung der Interaktion haben sich diese jedoch alle als falsch positive Signale erwiesen.

In einem zweiten Ansatz wurde das „CytoTrap“ Verfahren der Firma Stratagene verwendet, das eine Modifikation des klassischen Yeast-Two-Hybrid Systems darstellt. Dieses Verfahren erlaubte es aufgrund der veränderten Vorgehensweise, bei der Selektion der Klone den vollständigen ORF des SAP47 Proteins als „Köder“ einzusetzen. Das Screenen von ca. $5,77 \cdot 10^4$ Kolonien führte ursprünglich zur Identifizierung von 45 „positiven“ Klonen. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei 44 Klonen um falsch positive Signale handelte. Ein Klon hat alle Tests gegen Artefakte bestanden. Der Klon enthält eine cDNA für das Gen CG12214 aus dem *Drosophila* Genomprojekt, dieses Gen ist jedoch bis jetzt noch nicht charakterisiert.

Abschließend wurde anhand der vorhandenen Sequenzinformation aus dem *Drosophila* Genomprojekt die *Sap47* Genstruktur aktualisiert. Dabei ergaben sich Hinweise auf das Vorhandensein zusätzlicher Spleißvarianten. Durch Änderung der Bedingungen der Western Blot Analyse und Vergleich des wildtypischen Kopfhomogenats mit solchen der *Sap47* RNAi Tiere konnten mindestens drei zusätzliche SAP47 Isoformen (ca. 90, 70 und 62 kDa) identifiziert werden. Ein Vergleich der Größe der neu identifizierten Proteine mit den EST-Klonen aus den Sequenzdatenbanken sowie den dort vorgeschlagenen Transkripten lässt vermuten, dass mindestens sechs verschiedene *Sap47* Spleißvarianten existieren. Die aktualisierte Genstruktur besteht nun aus 11 Exons und 10 Introns, sechs Exons werden in verschiedenen Varianten alternativ benutzt und erzeugen damit die Vielfalt an Transkripten.

7. Summary

SAP47 (synapse-associated protein of 47 kDa) of *Drosophila melanogaster* belongs to a novel protein family of unknown function. Immunohistochemical staining of sections of adult flies and nerve-muscle preparations of third instar larvae show prominent SAP47 expression in the nervous system and its localisation in the cytoplasm of synaptic terminals.

The *Sap47* gene is highly conserved in evolution. Sequence homology was found in several insect species, *C. elegans*, mouse and human. SAP47 protein shows no distinctive homology with other proteins. All previous experiments to create a *Sap47* null mutant and to identify SAP47 interaction partners were unsuccessful.

The identification and characterisation of novel synaptic proteins can significantly contribute to our understanding of the communication processes between nerve cells and possibly to the definition of molecular causes of psychiatric diseases. Therefore, in this work we have again tried to create a *Sap47* mutant and to find a possible interaction partner.

Two relatively new techniques and a “classical” strategy were used for *Sap47* mutagenesis: “gene targeting” by homologous recombination, RNA interference (RNAi) and Jump-out mutagenesis.

Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila* was first described by Rong and Golic in the year 2000. For this technique two different large “donor” constructs (ca. 5 kb and ca. 7.6 kb “donor:target” homologies) were created and transformed into the fly germ line. Five independent transgenic lines were isolated: four for the 5 kb and one for the 7.6 kb “donor” construct. By crossing these transgenic flies with FLP/*SceI* lines from Kent G. Golic animals are generated which contain all three components of the system. The action of flipase and *I-SceI* produces a linear extrachromosomal recombinogenic donor DNA molecule, that can recombine with and destroy the *Sap47* gene. The progeny of this cross was selected for eye colour and the position of the donor construct on the third chromosome. By screening of ca. 280000 animals containing the 5 kb large “donor” construct and ca. 125000 animals containing the 7.6 kb construct one single fly with a nontargeted recombination event, but no targeted recombinants, were isolated.

For *Sap47* gene silencing by RNA interference, two different *Sap47* RNAi constructs were cloned. The first one consists of two *Sap47* cDNA fragments connected in opposite orientations without a heterologous spacer between them. The second one was named “RNAi genomic” construct. It consists of the fusion product of a ca. 6 kb genomic fragment of the

Sap47 gene and a 0.85 kb large corresponding cDNA fragment. Both RNAi constructs are under UAS control and can be induced by any Gal4 driver lines.

20 independent transgenic lines for the RNAi cDNA construct and 11 lines with different insertion sites for the “RNAi genomic” construct were isolated by transformation of the constructs into the w¹¹¹⁸ wild type. By crossing the RNAi transgenic flies with an actin-Gal4 line, the RNAi transgene was activated and the SAP47 expression characterised by Western blot. Analysis of the blots reveals a dramatic difference in residual SAP47 expression. A few RNAi fly lines show a very stringent suppression with only ca. 6% residual expression, some lines did not show any visible reduction in SAP47 expression. Such differences of expression levels were observed for both RNAi constructs.

The search for a phenotype of *Sap47* RNAi animals was restricted to qualitative inspection of nerve-muscle preparations of third instar larvae. The staining with an antibody against another synaptic protein (CSP) did not show any conspicuous difference to wild type.

In the final phase of this work a line with a P-element insertion in the 5′-untranslated region of the *Sap47* gene was identified by our regular search of the relevant data bases. The insertion itself did not visibly influence *Sap47* gene expression. Therefore, this P-element insertion was used for creating a *Sap47* null mutant by jump-out mutagenesis. Three lines with a significant reduction in SAP47 expression and three null mutants for the *Sap47* gene were identified by screening of ca. 230 “candidates”. A detailed phenotypic analysis of these mutants was not possible within the temporal framework of this thesis.

By a standard yeast-two-hybrid method (Clontech) it was attempted to identify interaction partners for the SAP47 protein. It was observed that the full ORF of SAP47 as “bait” activated the reporter genes by itself. Therefore, a 307 amino acid SAP47 fragment was used as “bait” for screening an adult *Drosophila* cDNA library for possible interaction partners. Screening of ca. $6 \cdot 10^6$ yeast clones lead to the isolation of 215 “positive” candidates, 40 of these were analysed by sequencing. The subsequent characterisation of the interaction shows however, that all isolated clones are false positive signals.

In a second attempt the “CytoTrap” assay (Stratagene) was used, a modification of the “classic” yeast-two-hybrid system. The screening of ca. $5.77 \cdot 10^4$ clones with the full ORF of SAP47 as “bait” lead to the identification of 45 “interaction candidates”, 44 of these were again false positive clones. The “prey” cDNA of one presumably true positive clone was identified as the product of the CG12214 gene from *Drosophila* the genome project.

Finally, the exon-intron structure of *Sap47* gene was updated using the available sequence information from our own lab and from the *Drosophila* genome project. Modification of the

conditions of the Western blot analysis leads to identification at least three additional SAP47 isoforms (ca. 90, 70 and 62 kDa). Comparison of the blots from wild type head homogenates with these of Sap47 RNAi animals demonstrated the specificity of the signals. In an attempt to associate the molecular weights of the novel protein isoforms with available cDNA and EST sequences and the transcripts suggested by computer analysis in the flybase data base we postulate the existence of at least six different SAP47 splice variants. The resulting gene structure of *Sap47* consists of 11 exons and 10 introns. Six of the exons are used alternatively to generate the different variants.

8. Literaturverzeichnis

Adams, M. D., Celniker, S.E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M., Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287 (5461): 2185-2195.

Akgun, E., Zahn, J., Baumes, S., Brown, G., Liang, F., Romanienko, P. J., Lewis, S. and Jasin, M. (1997). Palindrome resolution and recombination in the mammalian germ line. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5559-5570.

Amaya, Y., Nakano, A., Ito, K. and Mori, M. (1990). Isolation of a yeast gene, SRH1, that encodes a homologue of the 54K subunit of mammalian signal recognition particle. *J.Biochem.*, 107: 457-463.

Armstrong, J. D., Kaiser, K., Müller, A., Fischbach, K. F., Merchant, N., Strausfeld, N. J. (1995). Flybrain, an on-line atlas and database of the *Drosophila* nervous system. *Neuron*. 15: 17-20.

Bajjalieh, S. M. (1999). Synaptic vesicle docking and fusion. *Current Opinion in Neurobiology*. 9: 321-328.

- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*. 14(6): 920-924.
- Bass, B. L. (2000). Double-Stranded RNA as a Template for Gene Silencing. *Cell*. 101: 235-238.
- Becker, S. (1997). *sap47* und *black-pearl*. Molekulare Charakterisierung und Mutagenisierung zweier konservierter Genloci von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Becker, S., Gehrsitz, A., Bork, P., Buchner, S. and Buchner, E. (2001). The *black-pearl* gene of *Drosophila* defines a novel conserved protein family and is required for larval growth and survival. *Gene*. 262: 15-22.
- Bellaïche, Y., Mogila, V. and Perrimon, N. (1999). I-SceI Endonuklease, a New Tool for Studying DNA Double-Strand Break Repair Mechanisms in *Drosophila*. *Genetics*. 152: 1037-1044.
- Bernstein, E., Denli, A. M. and Hannon, G. J. (2001). The rest is silence. *RNA*. 7: 1509-1521.
- Betz, W. J. and Angleson, J. K. (1998). The Synaptic Vesicle Cycle. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 347-363.
- Birnbiom, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, S. J. (1996). *Protein Methods*. 2nd ed. Wiley-Liss, New York.
- Buchner, E., Buchner, S., Crawford, G., Mason, W. T., Salvaterra, P. M., Satelle, D. B. (1986). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 246: 57-62.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118(2): 401-415.
- Celniker, S. E. (2000). The *Drosophila* genom. *Current Opinion in Genetics & Development*. 10: 612-616.
- Cerutti, H. (2003). RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *TRENDS in Genetics*. 19 (1):39-46.
- Collick, A., Drew, J., Penberth, J., Bois, P., Luckett, J., Scaerou, F., Jeffreys, A. and Reik, W. (1996). Instability of long inverted repeats within mouse transgenes. *EMBO J.* 15(5): 1163-1171.
- Cox, M. M. (1988). FLP site-specific recombination system of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Genetic Recombination*, Kucherlapati, R. and Smith, G. R., eds. Washington, D. C.: American Society for Microbiology: 429-443.

- Doerks, T., Huber, S., Buchner, E. and Bork, P. (2002). BSD: a novel domain in transcription factors and synapse-associated proteins. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 27 (4): 168-170.
- Featherstone, D. E. and Broadie, K. (2000). Surprises from *Drosophila*: Genetic mechanisms of synaptic development and plasticity. *Brain Research Bulletin*. 53 (5): 501-511.
- Fernández-Chacón, R. and Südhof, T. C. (1999). Genetics of Synaptic Vesicle Funktion: Toward the Complete Functional Anatomy of an Organelle. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 753-776.
- Fjose, A., Ellingsen, S., Wargelius, A. and Seo, H. C. (2001). RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 7: 31-57.
- Fon, E. A. and Edwards, R. H. (2001). Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle & Nerve*. 24: 581-601.
- Funk, N. (2000). Charakterisierung des *sap47*-Gens aus *Drosophila melanogaster* und seines humanen Homologs *hsap*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Giordano, E., Rendina, R., Peluso, I. and Furia, M. (2002). RNAi Triggered by Symmetrically Transcribed Transgens in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 160: 637-648.
- Guthrie, C. and Fink, G. R. (1991). Guide to Yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* (Academic Press, San Diego) 194: 1-932.
- Golic, K. G. (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science*. 252 (5008): 958-961.
- Golic, K. G. and Lindquist, S. (1989). The FLP Recombinase of Yeast Catalyzes Site-Specific Recombination in the *Drosophila* Genome. *Cell*. 59: 499-509.
- Golic, M. M., Rong, Y. S., Petersen, R. B., Lindquist, S. L. and Golic, K. G. (1997). FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. *Nucleic Acids Research*. 25 (18): 3665-3671.
- Golic, K. G. and Golic, M. M. (1996). Engineering the *Drosophila* Genome: Chromosome Rearrangement by Design. *Genetics*. 144: 1693-1711.
- Gong, W. E. and Golic, K. G. (2003). Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *PNAS*. 100 (5): 2556-2561.
- Haley, B., Tang, G. and Zamore P. D. (2003). In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods*. 30: 330-336.
- Hamasaki, K., Nakao, K., Matsumoto, K., Ichikawa, T., Ishikawa, H. and Eguchi, K. (2003). Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Letters*. 543: 51-54.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*. 418: 244-251.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases. *Cell*. 75: 805-816.

Hasty, P., Rivera-Perez, J. and Bradley, A. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 11(11): 5586-5591.

Heslot, H. and Giallardin, C. (1992). *Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeast*. CRC Press, Inc.

Huber, S. (2003). Charakterisierung von SAP47 in *Drosophila melanogaster* und der dazugehörigen Proteinfamilie. Dissertation, Universität Würzburg.

Jahn, R., Lang, T. and Südhof, T. C. (2003). Membrane Fusion. *Cell*. 112 (4): 519-533.

Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *TIG*. 12 (6): 224-228.

Jen, K.-Y. and Gewirtz, A. M. (2000). Suppression of Gene Expression by targeted Disruption of Messenger RNA: A available Options and Current Strategies. *Stem Cells*. 18 (5): 307-319.

Kalidas, S. and Smith, D. P. (2002). Novel Genomic cDNA Hybrids Produce Effective RNA Interference in Adult *Drosophila*. *Neuron*. 33: 177-184.

Kennerdell, J. R and Carthew, R. W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotechnology*. 17: 896-898.

Khyse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209.

Kim, V. N. (2003). RNA Interference in Functional Genomics and Medicine. *J. Korean Med. Sci.* 18: 309-318.

Kornberg, T. B. and Krasnow, M. M. (2000). The *Drosophila* genom sequence: implications for biologie and medicine. *Science*. 287: 2218-2220.

Lao, G., Scheuss, V., Gerwin, C. M., Su, Q., Mochida, S., Rettig, J. and Sheng, Z.-H. (2000). Syntaphilin: A Syntaxin-1 Clamp that Controls SNARE Assembly. *Neuron*. 25: 191-201.

Lee, Y. S. and Carthew, R. W. (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods*. 30: 322-329.

Lewis, S., Akgün, E. and Jasun, M. (1999). Palindromic DNA and Genom stability. Further Studies. *Ann. NY Acad. Sci.* 810: 45-57.

Lipardi, C., Wei, Q., Paterson, B. M. (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert into dsRNAs that are degraded to generate mew siRNAs. *Cell*. 107: 295-307.

- Lobachev, K. S., Stenger, J. E., Kozyreva, O. G., Jurka, J., Gordenin, D. A. and Resnick, M. A. (2000). Inverted Alu repeats unstable in yeast are excluded from the human genome. *EMBO J.* 19: 3822-3830.
- MacDonald, P. N. (2001). Two-Hybrid Systems. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, Volume 177. Humana Press Inc.
- Marth, J. D. (1996). Recent Advances in Gene Mutagenesis by Site-directed Recombination. *The Journal of Clinical Investigation.* 97 (9): 1999-2002.
- Matzke, M., Matzke, A. J. M. and Kooter, J. M. (2001). RNAi: Guiding Gene Silencing. *Science.* 293: 1080-1083.
- McCaffrey, A. P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F. H., Xu, H., Wieland, S. F., Marion, P. L. and Kay, M. A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nature Biotechnology.* 21 (6): 639-644.
- Misquitta, L. and Paterson, B. M. (1999). Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 1451-1456.
- Mount, S. M., Burks, C., Hertz, G., Stormo, G. D., White, O. and Fields, C. (1992). Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acid research.* 20 (16): 4255-4262.
- Müller, U. (1999). Ten Years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mechanisms of Development.* 82:3-21.
- Peters, N. T., Rohrbach, J. A., Zalewski, B. A., Byrkett, C. M. and Vaughn, J. C. (2003). RNA editing and regulation of *Drosophila 4f-rnp* expression by *sas-10* antisense readthrough mRNA transcripts. *RNA.* 9: 698-710.
- Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C. P. and Costa, R. (2001). Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Research.* 29 (12).
- Reichmuth, C. (1993). DSAP47: Charakterisierung des Gens für ein neues synapsenassoziiertes Protein von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Reichmuth, C., Becker, S., Benz, M., Debel, K., Reisch, D., Heimbeck, G., Hofbauer, A., Klagges, B., Pflugfelder, G. O., Buchner, E. (1995). The *sap47* gene of *Drosophila melanogaster* codes for a novel conserved neuronal protein associated with synaptic terminals. *Mol. Brain Res.* 32: 45-54.
- Reisch, D. (2000). Strukturelle und physiologische Charakterisierung der larvalen Nerv-Muskel-Synapse von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Richmond, J. E. and Broadie, K. S. (2002). The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Current Opinion in Neurobiologie.* 12: 499-507.

- Ringrose, L., Chabanis, S., Angrand, P.-O., Woodroffe, C. and Stewart, A. F. (1999). Quantitative comparison of DNA looping *in vitro* and *in vivo*: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances. *The EMBO Journal*. 18 (23): 6630-6641.
- Robzyk, K. and Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* 20 (14): 3790
- Rong, Y. S. and Golic, K. G. (2000). Gene Targeting by Homologous Recombination in *Drosophila*. *Science*. 288: 2013-2017.
- Rong, Y. S. and Golic, K. G. (2001). A Targeted Gene Knockout in *Drosophila*. *Genetics*. 157: 1307-1312.
- Rong, Y. S., Titen, S. W., Xie, H. B., Golic, M. M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B. M., Brodsky, M., Rubin, G. M. and Golic, K. G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes & Development*. 16: 1568-1581.
- Rubin, G. M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an Experimental Organism. *Science*. 240 (4858): 1453-1459.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York.
- Schaupp, M. (1998). Reinigung und Charakterisierung zweier synaptischer Proteine, SYNAPSYN und SAP47, aus *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Schiavo, G. and Stenbeck, G. (1998). Molecular analysis of neurotransmitter release. *Essays in Biochemistry*. 33: 29-41.
- Serebriiski, I. and Golemis, E. A. (<<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>>).
- Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G. and Waterhouse, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*. 407:319-320.
- Südhof, T. C., Camilli, P. D., Niemann, H. and Jahn, R. (1993). Membran Fusion Machinery: Insights from Synaptic Proteins. *Cell*. 75: 1-4.
- Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 375: 645-653.
- Südhof, T. C. (2000). The Synaptic Vesicle Cycle Revisited. *Neuron*. 28: 317-320.
- Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A. and Figlerowicz, M. (2003). RNA interference and its role in the regulation of eukaryotic gene expression. *Acta Biochimica Polonica*. 50 (1): 217-229.
- Tilly, G., Chapuis, J., Vilette, D., Laude, H. and Vilotte, J. L. (2003). Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 305: 548-551.

- Tobaben, S., Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Südhof, T. C., Rettig, J. and Stahl B. (2001). A Trimeric Protein Complex Functions as a Synaptic Chaperone Machine. *Neuron*. 31: 987-999.
- Van Roessel, P., Hayward, N. M., Barros, C. S. and Brand, A. H. (2002). Two-Color GFP Imaging Demonstrates Cell-Autonomy of GAL4-Driven RNA interference in *Drosophila*. *Genesis*. 34: 170-173.
- Vance, V. and Vaucheret, H. (2001). RNA Silencing in Plants – Defense and Counterdefense. *Science*. 292: 2277-2280.
- Waldman, A. S., Tran, H., Goldsmith, E. C. and Resnick, M. A. (1999). Long Inverted Repeats Are an At-Risk Motif for Recombination in Mammalian Cells. *Genetics*. 153: 1873-1883.
- Waterhouse, P. M., Wang, M.-B. and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*. 411: 834-842.
- Wittmann, S. (2002). Untersuchungen zur *in-vivo* Lokalisation und Funktion des *sap47*-Gens von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Yoshihara, M., Ensminger, A. W. and Littleton, J. T. (2001). Neurobiology and the *Drosophila* genom. *Functional Integrative Genomics*. Mar; 1 (4): 235-240.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell*. 101: 25-33.

9. Abkürzungen

A	Adenin
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
3AT	3-Amino-1,2,4-Triazole
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxynukleinsäure
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
EST	expressed sequence tag
FRT	flipase recognition target sequence
G	Guanin
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunden
Kan.	Kanamycin
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
MAK	Monoklonaler Antikörper
μ	mikro
m	milli
mA	Milliampère
mRNA	messenger Ribonukeinsäure
ORF	open reading frame
P	Phosphat
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
ss	einzelsträngig
SV	synaptische Vesikel
T	Thymin
TTP	Thymidin-5'-Triphosphat
UAS	upstream activating sequence
ÜN	über Nacht
vir.	virgin
Vol.	Volumen
v/v	volume/volume
WT	Wildtyp

10. Anhang

Sap47 RNAi cDNA Konstrukt: Klonierung und Sequenz

Der vollständige kodierende Bereich der Sap47-1 cDNA (Becker, 1997) wurde mittels Linker-PCR amplifiziert und mit Schnittstellen versehen.

Primer für das „sense“ Fragment:

pUAST SAP47 sense 1 5'-GGCGTGAATTCAACATGTTTTTCGGGCCTAAC-3' *EcoRI*

pUAST SAP47 anti 1 5'-CATGATTCCGGAATCTTCATCTTCGCCG-3' *Kpn2I*

Dadurch erhaltenes Amplifikat:

GGCGTGAATTCAACATGTTTTTCGGGCCTAACAAATCAATTCACCTCGCTG *EcoRI*
GTGGGCGCCGTTAAAGGAGGCGCTGGCGACGAGGATGTGCCCGCGCCCAC
AGGAGATGCGCCCGCAGCCGCTCCAGCAGCATCCACATCTGTGGAGGCCA
CGGCCTCCTCCGCCGTGGACCCGGAGGCAGCTGCCGCCCGCGGTGGCGAA
GGACTCGAGGGCGAGGAAGCTGGCAAAAGCGGATGGCTGGGCAGTGCCAA
GGTTGGCTGGGAAACGCCTCGATACCGTCGATGCCAGCCATGCCGTCGA
TGCCATCGATGCCGGCCATGCCAGCGATGCCATCGATACCATCGATCCCG
GGACTCCGCAAGGGCGCAGGAGCCGATGGAGCCGAGGGCGCCGAGGGAGC
TGTCGCCGAGAGGGCGGGGCCCGCCAGTGGAGCCGTGAGTGGTGGCG
AGGATGACGACAAGTCGAGGTATATTAGCGCCACGGAGGGCGCCGACTCG
CATCCTGCATCGGGCGGTGGCACGCCCACCGGCGACGAGGGTCAAATCGG
ACAGGTTACCACAAAAGTAACACAGCAGGCCAAACACTTTGGATCCTTCT
TGTCATCGCCATCAGCAAGGCTGGCAGCAAATCAAGGAACTGTCAAG
GATAATACCATTCTCGACTCGTTCAACAAGGAACAGGAAGCTTTCATCAA
GGGCCAGGGAGGCGTGGGCAATGGAGCAGCCCCCTGGATCGGACACGCCA
ACGAGGCCAAGATCAAGGAGGAAATCCTTGGCCTGTTCGAGGATCGCCGC
AATTTCGTGCGCGCCCCCGCCCGCGGCGTGGACTTTGAGTTTAGCTACGA
CACCGCCTATCCTACGGCCATAGCCATTATGGCCGAAGACAAGGCGCTCG
AGACGATGCGATTTCGAGCTGGTGCCTAAGATCATCACTGAAGAGAATTC
TGGCGGAATTACTTCTACCGCGTCTCACTGATCATCCAGGCCGCGAGTT
GGGCACTCTGGGCGCCGATGGCGTGGGTCAAGCGGCGAAGATG
AAGATTCCGGATCATG *Kpn2I*

Primer für das „antisense“ Fragment:

SAP47senseKpn2I 5'-CTGACATCCGGACAATCTTCATCTTCGCCG-3' *Kpn2I*

SAP47antiNotI 5'-AAATAGGCGGCCGTTTTTCGGGCCTAACAAATC-3' *NotI*

Dadurch erhaltenes Amplifikat:

CTGACATCCGGACAATCTTCATCTTCGCCGCTTGAGGCCTGACCCACGCC *Kpn2I*
ATCGGCGCCCAGAGTGCCCAACTCGGCGGCCTGGATGATCAGTGAGACGC
GGTAGAAGTAATTCGCCAGAAATCTCTTCAGTGATGATCTTGGGCACC
AGCTCGAATCGCATCGTCTCGAGCGCCTTGTCTTCGGCCATAATGGCTAT
GGCCGTAGGATAGGCGGTGTCTAGCTAAACTCAAAGTCCACGCCGGCGG
GCGGGGCGCGCACGAAGTTGCGGCGATCCTGCGACAGGCCAAGGATTTCC
TCCTTGATCTTGGCCTCGTTGGCGTGTCCGATCCAGGGGGCTGCTCCATT
GCCCACGCCTCCCTGGCCCTTGATGAAAGCTTCTGTTCTTGTGTAACG

AGTCGAGAATGGTATTATCCTTGACAGTTTCCTTGATTTTGCTGCCAGCC
 TTGCTGATGGCCGATGACAAGAAGGATCCAAAGTGTGGCCTGCTGTGT
 TACTTTTGTGGTAACCTGTCCGATTTGACCCTCGTCGCCGGTGGGCGTGC
 CACCGCCCGATGCAGGATGCGAGTCGGCGCCCTCCGTGGCGCTAATATAC
 CTCGACTTGTCTCATCCTCGCCACCACTCACGGCTCCACTGGCGGCGGC
 CCCGCCCTCTCCGGCGACAGCTCCCTCGGCGCCCTCGGCTCCATCGGCTC
 CTGCGCCCTTGC GGAGTCCC GGATCGATGGTATCGATGGCATCGCTGGC
 ATGGCCGGCATCGATGGCATCGACGGCATGGCTGGCATCGACGGTATCGA
 GCGTTTTCCAGCCAACCCTTGGCACTGCCAGCCATCCGCTTTTGCCAG
 CTTCTCGCCCTCGAGTCTTCCGCCACCGCGGGCAGCTGCCTCCGGG
 TCCACGGCGGAGGAGGCCGTGGCCTCCACAGATGTGGATGCTGCTGGAGC
 GGCTGCGGGCGCATCTCTGTGGGCGGGCACATCCTCGTCGCCAGCGC
 CTCCTTTAACGGCGCCACCAGCGAGGTGAATTGATTTGTTAGGCCCGAA
AGCGGCCGCTATTT

NotI

Beide PCR-Produkte wurden mit *Kpn2I* geschnitten, ligiert und über *EcoRI* und *NotI* in den pUAST Vektor eingefügt. Das Insert wurde durch Sequenzierung überprüft.

Sap47 RNAi genomisch: Klonierung und Sequenz

Ein 1 kb großer genomischer Bereich des *Sap47* mit der 3'-Spleiß-Sequenz (orange) wurde durch Linker PCR amplifiziert und mit *EcoRI/Kpn2I* Erkennungssequenzen versehen.

Verwendete Primer:

RNAi-Intron 6 5'-GGGTCCAGGAATTCTCGCGAATTTGGTTTTCC-3'

RNAi-Exon VII 5'-CCTGATTCGGAGTCTTTTGGTTTTAATCCATTCAAT-3'

Dadurch erhaltenes Amplifikat:

GGGTCCAGGAATTCTCGCGAATTTGGTTTTCCTAACATCCCATTATCTATT *EcoRI* *Bsp68I*
 TTGCAACCAAAGCCACATATGAAAATATATAATTTCTTTGTGCCAAACAA
 ACAGAACAACAATCTAAAACAAACAAAATGTGTGTACAAATCAAGTGT
 AAAACCGAACAATTCTCTTTCTCTCCTCTGCTCTGTTTCTTTCTTTTAT
 ATAAATTACATTTTGTATGAAAATCGTTTTTACTTATTATATGACAACAA
 CTTCAAGCTCTGGCATTTAATTACTAAAGCGAATCTATCAATTGAAAGTAA
 TATTAACCAATAACGAAATCACACAATAAATAAATATAGAAGTAATGCA
 ACTAATGGATAACAAGAGTATTATAAATTATATAAACACATATAAATATA
 TATCCTGAATAAAATCGAACTCGACAAAACTCTCATTTGCCATTTAGCG
 AACTGCAAAATAATATCAAATATATATATATATATATGTATCATATGACATA
 TAATTTGATTTCAATTATCCAATAACAGTTTAAAGAAAGAGTTAAAGCCAC
 AAACCAAATTTGCAACAAGTTGAGTATGACCAAATGATCAAGAAATCT
 TATATACAACTATATCCTATTGATAACAATTTGCTCTCTCTTTGCAATT
 TCGTGCTCCTTTTTATTCAATTTGCAATTCATTTACAAAAATTT
 AGCTAGATGTAATTTTCGTTGTCTTCTTCTTCTCGATCCAATTATAATTT
 TGCCTCTTCTTTGACACATTTCTCCACATGTTTTAAACAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAACTGTATTCTAAACTAGCCGCGACACGAAAAGAACCTCCTTTC
 TAGCAATACACAAAATTTCCAAAAGTATCTTACCTTGAATATCTGATGA
 TGAATTTGTATGGGAAAACATTTTAAACAAAACATTTATTTTCTTCATGT
 ATTTCTTGATTTATTACGAATCATCTTGCAGAAGATTGAATGGATTAAA *3'Splice site*
 ACCAAAAGACTCGGATCAGG *Kpn2I*

Das inverse Sap47-1 cDNA Fragment von Exons 7 bis Exon 2 wurde durch Linker PCR amplifiziert und mit *Kpn2I/Asp718I* Schnittstellen versehen.

Verwendete Primer:

Sap47-ExonVII sense 5'-GGTCCTCCGGATTTTGGTTTTAATCCATTCAATC-3'
Kpn2I

Sap47-ExonII anti 5'-GTTCAGGTACCGATGGCTGGGCAGTGC-3'
Asp718I

Dadurch erhaltenes Amplifikat:

GGTCCTCCGGAGTTTTGGTTTTAATCCATTCAATCTTCATCTTCGCCGCT *Kpn2I*
TGAGG CCTGACCCACGCCATCGGCCGCCAGAGTGCCCAACTCGGCGGCC
TGGATGATCAGTGAGACGCGGTAGAAGTAATTCGCCAGAAATCTCTTC
AGTGATGATCTTGGGCACCAGCTCGAATCGCATCGTCTCGAGCGCCTTGT
CTTCGGCCATAATGGCTATGGCCGTAGGATAGGCGGTGTCGTAGCTAAAC
TCAAAGTCCACGCCGGCGGGCGGGCGCGCACGAAGTTGCGGGGATCCTG
CGACAGGCCAAGGATTTCCCTCCTTGATCTTGGCCTCGTTGGCGTGTCCGA
TCCAGGGGGCTGCTCCATTGCCACGCCTCCCTGGCCCTTGATGAAAGCT
TCCTGTTTCCTTGTGAACGAGTCGAGAATGGTATTATCCTTGACAGTTTC
CTTGATTTTGCTGCCAGCCTTGCTGATGGCCGATGACAAGAAGGATCCAA
AGTGTTTGGCCTGCTGTGTTACTTTTGTGGTAACCTGTCCGATTTGACCC
TCGTCCCGGTGGCGGTGCCACCGCCCGATGCAGGATGCGAGTCGGCGCC
CTCCGTGGCGCTAATATACCTCGACTTGTGTCATCCTCGCCACCACTCA
CGGCTCCACTGGCGGGCGCCCGCCCTCTCCGGCGACAGCTCCCTCGGCG
CCCTCGGCTCCATCGGCTCCTGCGCCCTTGGGAGTCCCGGGATCGATGG
TATCGATGGCATCGCTGGCATGGCCGGCATCGATGGCATCGACGGCATGG
CTGGCATCGACGGTATCGAGGCGTTTCCAGCCAACCTTGGCACTGCC
AGCCATCGGTACCTGAAG *Asp718I*

Beide PCR-Produkte wurden entsprechend geschnitten, ligiert und in den pUAST Vektor eingefügt.

Jump-out Mutagenese

EY07944 flankierende Sequenzen (aus <http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/>):

5'-Ende:

CTGCAATTGCTTTGTCCAGATGGCCGAGATGGAAGGTAAAAGAATGGTTT
TTATTGCTACTTGGCGAGGCGGTGGGGAAAATCAATAAAACGGACTGGGA
ATTGCGTGGCTATTGGGCACAATTACACGATAAATACTCTGCGATTTCGAT
CGATTTTCCACATGGACACACGCCACGCTCGAGTTTCTTTTCTTTTGGG
TTTATAGCTATTGCTATTTGCACAATAAAGTAATTTGAGTCGCAGCCA
ATTACCACTTGAGCTTTTCTCTGCCAACCTGGATTTTGGCTTTTCTTATTTT
TTTTCTCTTTGGTTTCCGTTTCGCTGCCAGGAGACTTTTGGATTTTTCGGCT
GCCCACTTCGAAGTCTCTGAAAACCTGACGGAGCAGCGGAATGTGGGTG
TCTCAAATACCGAGCTGGAG

3'-Ende:

AGCTGGAGTGTGCTCTTCGCTCTCTTGGACTCGGGGATTGGGGATTCTCA
GATTCGGATTCTCGTATGCGTACGTTTCGCTTTCTCCCTGAAAAAGTGGAG
TCCACCCCTCCTCCGCGTTGCTGGGGCGATGGTATTGCGATTTTTCGTGG
GTGGGATATTTGTGCGCTGGAATGCGCATGTGTGCTTTGGCGTCTTTTGTG
CTGCTGCTGGCGCAATTAGACAAAACAATTGACACGTCTATGGAAAACAACA
ACTGCGCACCAAGTAATGATTATTTTTCGGTTTGTCTCGGCCAGTGTGCC
CATCGAACAGCTGACTGCTGTGCGTTCGATAGCTCTACCGATATGTTTCGCG
CATCTCTGGCTTCTGCAACAGCTGATTTTAAAATTTCCAAGTTCTTATTG
CGAAAGTTTGGAAAGCCATTGCAGCATTAGTTTATTTACATCAGCATAAT
TTTAGCTATAGCTAGATCAAGACATGGAACCTTTGTTGATACTTAAAGTAT

TTTTATTTTCAAACCCCAAGAAGCGTGATCTTAAAATCGATCCGATTCTA
 GTTACCTGGCCTGAGAGTAAAATATTTATACCTAACCGTCTGAGCTAATC
 CGTGTTAGTTTACAAGA

„Köder“-Konstrukte für den „klassischen“ Yeast-Two-Hybrid Screen: Klonierung und Sequenz

Die Sap47 cDNA Fragmente wurden mit Hilfe einer Linker PCR amplifiziert und mit *EcoRI* (5'-Ende) und *Sall* (3'-Ende) Erkennungssequenzen versetzt.

Primer für 5'-Ende:

YTH-sense 3 5'-CAGGAATTCATGCCAGCGATGCCATC-3'
 YTH-sense 4 5'-GCAGGAATTCACATCTGTGGAGGCCACG-3'
 YTH-sense 5 5'-CGGAATTCGAGGAAGCTGGCAAAGCGGAT-3'

Primer für 3'-Ende:

YTH- α -sense 5'-GGCAGCGTCGACTCCATTCAATCTTCATCTT-3'

Position der Primer in der Sap47 cDNA-1:

1	AAAAGTCTCC	TGGCAGCGAA	CGGAAAACCA	AAGAGAAAAA	AAATAAGAAA	
51	AGCAAAATCC	AGTTGGGCAG	AGAAAAGCTC	AAGTGGTAAT	TGGCTGCGAC	
101	TCAAATTACT	TTAGTTGTGC	AAATAGCGAA	TAGCTATAAA	GCCAAAAAGA	
151	AAAGAAACTC	GAGCGTGGCG	TGTGTCCATG	TGGAAAATCG	ATCGAATCGC	
201	AGAGTATTTA	TCGTGTAATT	GTGCCAATA	GCCACGCAAT	TCCCAGCCCG	
251	TTTTATTGAT	TTTCCCCACC	GCCTCGCCAA	GTAGCAATAA	AAACCATCTCT	
301	TTTACCTTCC	ATCTCGGCCA	TCTGGACAAA	GCAATTGCAG	CGTGAAAAAT	
351	TCAAATTTCA	AGTTAAATGC	GAGAATTTAC	ATAACGCCGA	GCGTTGAAAG	
401	TGAAACTTCT	GTGGTGCAG	CGAAACACTG	AAAGAAAAGGA	AAACCCATTA	
451	CAGGACATTC	TATCTGCCTC	TGCCAGTGT	AGTAAAAGTT	GGAGAGCCAG	
501	GAGCGGGAGA	GCAGTGGAAA	ACCGTGAGAA	CCGCGAGAAC	AAGAGAGCCT	
551	AGAGAGCGTT	GAACGTGCGC	ACGTCTTCCT	GGTCAGGACA	CACCACCAAT	
601	CCTTGAGAGA	AACAGCAGGA	GCCAAC <u>ATG</u> T	TTTCGGGCCT	AACAAATCAA	Start
651	TTCACCTCGC	TGGTGGGCGC	CGTTAAAGGA	GGCGCTGGCG	ACGAGGATGT	
701	GCCC	CGCCCC	ACAGGAGATG	CGCCCCGAGC	CGCTCCAGCA	GCATCCACAT sense 4 AS 41-347
751	CTGTGGAGGC	CACGGCCTCC	TCCGCCGTGG	ACCCGGAGGC	AGCTGCCGCC	
801	GCCGGTGGCG	AAGGACTCGA	GGGC GAGGAA	GCTGGCAAAA	GCGGATGGCT	sense 5 AS 67-347
851	GGGCAGTGCC	AAGGGTTGGC	TGGGAAACGC	CTCGATAACG	TCGATGCCAG	
901	CCATGCCGTC	GATGCCATCG	ATGCCGGCCA	TGCCAGCGAT	GCCATCGATA	sense 3

951 CCATCGATCC CGGGACTCCG CAAGGGCGCA GGAGCCGATG GAGCCGAGGG
 1001 CGCCGAGGGA GCTGTGCGCCG GAGAGGGCGG GGCCGCCGCC AGTGGAGCCG
 1051 TGAGTGGTGG CGAGGATGAC GACAAGTCGA GGTATATTAG CGCCACGGAG
 1101 GGCGCCGACT CGCATCCTGC ATCGGGCGGT GGCACGCCCA CCGGCGACGA
 1151 GGGTCAAATC GGACAGGTTA CCACAAAAGT AACACAGCAG GCCAAACACT
 1201 TTGGATCCTT CTTGTCATCG GCCATCAGCA AGGCTGGCAG CAAAATCAAG
 1251 GAAACTGTCA AGGATAATAC CATTCTCGAC TCGTTCAACA AGGAACAGGA
 1301 AGCTTTCATC AAGGGCCAGG GAGGCGTGGG CAATGGAGCA GCCCCCTGGA
 1351 TCGGACACGC CAACGAGGCC AAGATCAAGG AGGAAATCCT TGGCCTGTCTG
 1401 CAGGATCGCC GCAACTTCGT GCGCGCCCCG CCCGCCGGCG TGGACTTTGA
 1451 GTTTAGCTAC GACACCGCCT ATCCTACGGC CATAGCCATT ATGGCCGAAG
 1501 ACAAGGCGCT CGAGACGATG CGATTTCGAGC TGGTGCCCAA GATCATCACT
 1551 GAAGAGAATT TCTGGCGGAA TTACTTCTAC CGCGTCTCAC TGATCATCCA
 1601 GGCCGCCGAG TTGGGCACTC TGGGCGCCGA TGGCGTGGGT CAGGCCTCAA
 1651 GCGGCGAAGA TGAAGATTGA ATGGATTAAA ACCAAAACAC AAAACAAAAT
 1701 GCTAAATCTA AATTTCAAAA TGCAAAAAAA CCAACTAACA AAATAAACAA
 1751 GAACAAAATT ATAAAAAAA AAATACTACA AAATTGCCCA CAAGAAAGAA
 1801 AAGAAATTGT TAAGCGAAAA AA

Stop
 α- sense

„Köder“-Konstrukt für das CytoTrap Verfahren: Klonierung und Sequenz

Der vollständige kodierende Bereich aus der Sap47-1 cDNA wurde durch Linker PCR amplifiziert und mit *NcoI* und *Sall* Schnittstellen versehen.

Verwendete Primer:

pSos-sense 5'-CAATGCCATGGCCAACATGTTTTTCGGGC-3'

YTH-α-sense 5'-GGCAGCGTCGACTCCATTCAATCTTCATCTT-3'

Dadurch erhaltenes Amplifikat:

CAATGCCATGGCCAACATGTTTTTCGGGCCTAACAAATCAATTCACCTCGC *NcoI*
 TGGTGGGCGCCGTTAAAGGAGGCGCTGGCGACGAGGATGTGCCCGCGCCC
 ACAGGAGATCGCCCCGAGCCGCTCCAGCAGCATCCACATCTGTGGAGGC
 CACGGCCTCCTCCGCCGTGGACCCGGAGGCAGCTGCCGCCGCCGGTGGCG
 AAGGACTCGAGGGCGAGGAAGCTGGCAAAAGCGGATGGCTGGGCAGTGCC
 AAGGGTTGGCTGGGAAACGCCTCGATACCGTCGATGCCAGCCATGCCGTC
 GATGCCATCGATGCCGGCCATGCCAGCGATGCCATCGATACCATCGATCC
 CGGGACTCCGCAAGGGCGCAGGAGCCGATGGAGCCGAGGGCGCCGAGGGA

GCTGTCGCCGGAGAGGGCGGGGCCGCCAGTGGAGCCGTGAGTGGTGG
 CGAGGATGACGACAAGTCGAGGTATATTAGCGCCACGGAGGGCGCCGACT
 CGCATCCTGCATCGGGCGGTGGCACGCCCACCGGCGACGAGGGTCAAATC
 GGACAGGTTACCACAAAAGTAACACAGCAGGCCAAAACACTTTGGATCCTT
 CTTGTTCATCGGCCATCAGCAAGGCTGGCAGCAAAATCAAGGAAACTGTCA
 AGGATAATACCATTCTCGACTCGTTCAACAAGGAACAGGAAGCTTTCATC
 AAGGGCCAGGGAGGCGTGGGCAATGGAGCAGCCCCCTGGATCGGACACGC
 CAACGAGGCCAAGATCAAGGAGGAAATCCTTGGCCTGTTCGAGGATCGCC
 GCAACTTCGTGCGCGCCCCGCCCGCCGGCGTGGACTTTGAGTTTAGCTAC
 GACACCGCCTATCCTACGGCCATAGCCATTATGGCCGAAGACAAGGCGCT
 CGAGACGATGCGATTTCGAGCTGGTGCCCAAGATCATCACTGAAGAGAATT
 TCTGGCGGAATTACTTCTACCGCTCTCACTGATCATCCAGGCCGCCGAG
 TTGGGCACTCTGGGCGCCGATGGCGTGGGTGAGGCTCAAGCGGCGAAGA
 TGAAGATTGAATGGAGTGCACGCTGCC

Sall

Das Amplifikat wurde mit *NcoI* und *Sall* geschnitten und in den pSos-Vektor ligiert.

Bei dem CytoTrap Screen gefundene Sequenz:

NGGAATATTTAACGCTAGANCTTCTAGTATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCAGCCAGCGCCGGTC
 TAGAGACGATGTGGAGCGAGAGCCGGTTCGTGGACATCTATCTGACCGTCAACGATTTGAAGGTGAAGCTGGAGA
 AGCTGGTGGGTCTGGCGCCCAACAAGATGCGCCTCTACTATCTGGATCAGGACTACAAGGAATTCGGGCCGGAGG
 AGATGCGGTACCCCAACAAGCAGTTGTACAGCTACAACATCCAGTCGGGCGACGAGATCATCATCGATGCCAAGA
 AGTGAGGCGCGACGTATGGGCTACATGCTTCCGTATCTGGAGAGGATTACCATTAACCCGAACCGCGCTTCGTCC
 CCGCTGGTGCTACAACCTTGTGATCTTGTACGAATATTTACATTACTTTCTCTCTGTAAGTGCCGTCTGTCTCCG
 AACGAAACCCTGTGTCATACGTTTTGAAATGGGCAACGACATACTGGCNCNATGNATTTTAATATTTCTGCTACTA
 GCCCCCCAATCAATCNACCCCAAAAAAAAAAACTCNGGCATATGATANAGTTTANG

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:

Score P(N)

CG12214 -RB transcript from_gene[CG12214 CG12214 FBgn00334...	1709	4.2e-73
CG12214 -RA transcript from_gene[CG12214 CG12214 FBgn00334...	1709	4.8e-73

Lebenslauf

Funk Natalja
Ringstrasse 63
63843 Niedernberg

Persönliche Daten	30. 01. 1974	geboren in Balchasch (Kasachstan)
-------------------	--------------	-----------------------------------

Schulausbildung	09/ 1981-06/ 1991	Grund- und Mittelschule in Balchasch (Kasachstan)
-----------------	-------------------	---

Berufsausbildung	09/ 1991-12/ 1995	Studium der Biologie an der Universität Ust-Kamenogorsk (Kasachstan)
	06/ 1996-11/ 1996	Deutsch-Sprachkurs (Arbeitsamt Obernburg)
	05/ 1997-09/ 2000	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius Maximilians Universität in Würzburg
	10/ 1999-09/ 2000	Diplomarbeit mit dem Thema: „Charakterisierung des <i>Sap47</i> -Gens aus <i>Drosophila melanogaster</i> und seines humanen Homologs <i>hsap</i> “
	ab Oktober 2000	Promotionsstudium am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Bayerischen Julius Maximilians Universität in Würzburg Thema: „Das <i>Sap47</i> -Gen aus <i>Drosophila melanogaster</i> : Gezielte Mutagenisierung und Suche nach Interaktionspartnern“

Würzburg, den 12. 09. 2003

Natalja Funk

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegeben angewandt wurden. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen und Abbildungen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt.

Ich habe außer dem, durch die beigefügte Urkunde belegten, Universitätsdiplom keine anderen akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 12. 09. 2003

Natalja Funk

Dankeschön!

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich die letzten drei Jahren mit Rat und Tat unterstützt haben. Ein ganz großer DANK geht an alle Genetiker, und vor allem Buchners, dafür, dass das Wort MENSCHLICHKEIT an diesem Lehrstuhl Groß geschrieben wird.

Ein besonderer DANK geht an Erich Buchner, für seine unerschöpfte Geduld (den als besonders pflegeleicht kann man mich leider nicht bezeichnen), und seine Fähigkeit in jeder Situation auch die positiven Seiten zu finden, auch dann, wenn es sich um eine oder andere misslungene Mutagenese handelte.

Der dickste DANK geht an Sonja, die mich in Grunde genommen zu das gemacht hat, was ich bin. Ich frage mich nur, warum hast du mich von dem Sap-Projekt nicht gewarnt? Hätte ich nur gewusst, was mich erwartet, wer weiß... Ich hoffe nur sehr, dass ich deine Erwartungen nicht enttäuscht habe.

Tausend DANK an Christian, für seine Bereitschaft immer zu helfen (vor allem wenn es sich um nie in die Vergangenheit gehende Probleme mit dem Rechner handelte), für die Hilfe bei der Fliegen-Arbeit (wer hat mir denn beigebracht wie man rosy vom Wildtyp unterscheidet?) und für die Lehrstunde „Wie finde ich eine Nadel?“, aber vor allem für viele Diskussionen und einen tollen Deutschunterricht (da wird der Hund in der Pfanne verrückt!).

Ein ganz, ganz großer DANK geht an Susanne, die drei Jahre lang ohne zu meckern DK 39 mit mir teilen musste. Du bist eine wirklich tolle Labormitbewohnerin gewesen, Danke für deine Geduld und Verständnis, und dafür dass du meine oft ziemlich miserable Laune ausgehalten hast.

Vielen, vielen DANK an Natascha und Saskia, für die seelische Unterstützung und für die Hilfe in jeder Situation, egal ob es sich dabei um Hilfe beim Fliegenschupsen oder neuer Klonierungsstrategie handelte. Danke für die schöne Zeit beim Eis essen (und „Sekt-Runden“).

Ein großer DANK geht an Thomas. Das ist wirklich Pech für dich, dass du so ein leidenschaftlicher Raucher und ein unglaublich netter Mensch bist. Ich Danke dir für deine Verständnis und hoffe, dass ich deine Geduld nicht zu sehr überstrapaziert habe (aber jetzt hast du mich endlich los!).

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich täglich bei meiner Arbeit unterstützt haben und immer wieder bereit waren zu helfen: Isabell (auch für die Hilfe bei den Larvenpräparationen), Kristina (dafür, dass du auch nach dem Lehrstuhlwechsel immer wieder Zeit für kleine Gespräche gefunden hast), Dieter (für die schönen Schnitte), Steffi, Sören, Henrike, Uschi, Tom, Andre, Jakob und Doris (für die Hilfe und Tipps beim Yeast-two-hybrid).

Самое большое Спасибо конечно-же моим самым, самым дорогим людям: маме, папе и брату. Без вашей помощи у меня бы точно абсолютно ничего не вышло.

Zuletzt möchte ich mich auch für mein Promotionsstipendium der Universität Würzburg bedanken, denn ohne diese finanzielle Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit überhaupt nicht möglich.

