

Teil 2

INHALTSVERZEICHNIS

Ektopische Expression von FLAG-Spaghetti in <i>Drosophila melanogaster</i> mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems	3
Das ektopische FLAG-Spaghetti-Protein ist im Zytoplasma von Imaginalscheiben lokalisiert.....	6
Fliegen, in denen das ektopische Spaghetti-Protein exprimiert wurde, sind lebensfähig und zeigen Abnormalitäten in den scutellaren Makrochaeten sowie im Flügel.....	8
Die Erforschung der Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> mit Hilfe des FLP/FRT-Systems	12
Analyse der genetischen Mosaik für die Mutation l(2)k12101 und für die Gene l(2)gl und scrib ^{var}	12
Mosaik von Mutationen der Gene l(2)gl und scrib ^{var} als Kontrolle für Klone der Mutation l(2)k12101	13
Eine kurze Vorstellung der Gene l(2)gl und scribble (vartul).....	14
Früh induzierte, spaghetti-mutierte Klone führen zum Tod der Fliege	16
Die spaghetti-mutierten Klone, induziert zu verschiedenen Zeiten, erzeugen schwere Defekte in den Imaginalscheiben von Drittlarvenstadien	26
Konfokale Analyse der F-Aktin Struktur, die von Imaginalscheiben in denen früh spaghetti-mutierten Klone induziert wurden, zeigen einen massiven Verlust von Gewebe und abnormale Faltungen	28
Spät induzierte spaghetti-mutierte Klone zeigen kaum noch Defekte in den Imaginalscheiben	30
Die Kernaktivität ist in den Arealen, in denen sich vormals spaghetti-mutierte Klone befanden, stark erhöht.....	32
Frühe Induktion von spaghetti-mutierten Klonen in den Imaginalscheiben von genetischen Mosaiken führen zu einer falschen Platzierung des Wingless-Proteins	35
Die Suche nach dem Spaghetti-Protein homologen Proteinen	37
Das Spaghetti-Protein besitzt eine TPR-Domäne, die aus drei hochkonservierten TPR-Motiven besteht.....	37
Das yeast two-hybrid System	51
UAS und TATA Regionen sind die beiden wesentlichen Einheiten eines Hefe Promotors	51
UAS und TATA-Regionen können zu neuen Promotoren verschaltet werden.....	51
Reportergene unter der Kontrolle von GAL4-responsiven Elementen.....	52
Beim „screenen“ zweier verschiedener embryonaler cDNA -Bibliotheken von <i>Drosophila melanogaster</i> konnten sechs verschiedene Gene identifiziert werden, deren Produkte mit dem Spaghetti-Protein im yeast two-hybrid System interagieren.....	52
Das „screenen“ einer früh embryonalen cDNA-Bibliothek (E 0-5h) von <i>Drosophila melanogaster</i> mit dem DNA-BD-Spaghetti-Fusionsprotein ergab 20 potentielle Partner, das „screenen“ einer älteren embryonalen cDNA Bibliothek (E 0-16h) ergab 37 potentielle Partner	52
Die Gruppierungen der gefundenen Bibliotheks-cDNA zeigte zwei dominante Gruppen sowie vier seltenere Fälle von mit dem Spaghetti-Protein interagierenden Proteinen.....	54
Die Überprüfung der neu gefundenen interagierenden Partner ergab drei neue, mit dem Spaghetti-Protein interagierende Partnerproteine.....	60
Das Spaghetti-Protein interagiert mit einem Produkt des Gens CG3168 von <i>Drosophila melanogaster</i> im yeast two-hybrid System, welches vermutlich Transporter-Eigenschaften besitzt	65
Das Spaghetti-Protein interagiert im yeast two-hybrid System mit einer Reihe von Komponenten, die an der Biosynthese in den Ribosomen beteiligt sind	66
Das Spaghetti-Protein benötigt zur Interaktion im yeast two-hybrid System seine TPR-Domäne für die Produkte der Gene hsp83, CG8615, CG2957 und CG13849, es benötigt diese Domäne jedoch nicht für die Gene CG5792, CG3168 und emc.....	68
Nachweis der Interaktion des Spaghetti-Proteins mit dem Hsp90-Protein, dem EMC-Protein und dem CG5792-Protein mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase Gen-Fusionssystems	72
Diskussion	79
Die homozygoten l(2)k12101-Larven sterben als überalterte Drittlarvenstadien und zeigen atrophische Imaginalscheiben und melanotische (Pseudo-) Tumore	79
Die Imaginalscheiben der homozygoten Larven von l(2)k12101 zeigen Apoptose und anschließend eine partielle Kompensation der durch Apoptose eliminierten Zellen.....	79
Das Spaghetti-Protein ist auch im Zellkern nachweisbar	82
Ektopische Expression des Spaghetti-Proteins mit Hilfe der UAS/ GAL4-Methode zeigt einen geringen Effekt auf die Entwicklung der Taufliege	83
Das Spaghetti-Protein interagiert im yeast two-hybrid System mit dem Hsp90-Protein und den Produkten der Gene CG5792, CG3168, CG13849, CG8615 und CG2957	83
Ein Modell zur Erklärung der Funktion des Spaghetti-Proteins in der Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	86

Ektopische Expression von FLAG-Spaghetti in *Drosophila melanogaster* mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems

Die Menge des Spag-Proteins ist während der Embryogenese im Vergleich zur larvalen Entwicklung sehr viel höher. Daher könnte ein FLAG-markiertes Spag-Protein für zwei Versuche nützlich sein. Zum einen kann die interzelluläre Lokalisierung des FLAG-Spag-Proteins in den verschiedenen larvalen und imaginalen Geweben bestimmt werden, und zum anderen kann der Einfluss des ektopischen FLAG-Spag-Proteins auf die Entwicklung der Fliege untersucht werden.

Es wurde das binäre UAS/GAL4-System (Abb. 1) benutzt, um das FLAG-markierte Spag-Protein zu exprimieren.

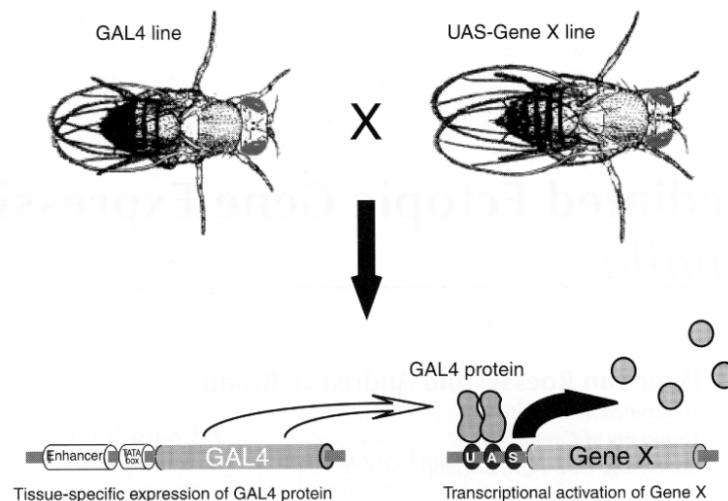


Abb. 1 Das UAS/GAL4-System besteht aus zwei Komponenten, (1) transgene Fliegen die ein UAS-Konstrukt mit der cDNA des Gens von Interesse tragen und (2) transgene Fliegen, die eine GAL4-Quelle tragen (weitere Erklärungen im Text).

Eine Komponente dieses Systems besteht aus Fliegenstämmen, welche GAL4-Transgene tragen, die unter der Kontrolle von bestimmten „enhancer“-Elementen des *Drosophila*-Genoms stehen. Das GAL4-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor der Hefe, den es weder in *Drosophila* gibt, noch erkennt er *Drosophila*-Promotorsequenzen. Der GAL4-Transkriptionsfaktor kann ausschließlich die Hefe UAS-Promotorsequenz erkennen. Die zweite Komponente besteht aus Fliegen, die ein Transgen tragen, welches aus der Hefe-UAS-Promotorsequenz sowie einer *Drosophila*-cDNA besteht. Dieses Konstrukt kann nur in Fliegen exprimiert werden, welche wiederum den GAL4-Transkriptionsfaktor exprimieren. Dieser Zustand kann durch Kreuzung von zwei Fliegenstämmen herbeigeführt werden, die zum einen das GAL4-Transgen und zum

anderen das UAS-*spaghetti*-Transgen tragen. Die *spaghetti*-Transkription während der Entwicklung von *Drosophila* ist abhängig von der verwendeten GAL4-Quelle.

Das FLAG-markierte UAS-*spaghetti*-Konstrukt wurde durch Anfügen einer 24 Nukleotide langen Sequenz an die *spaghetti*-cDNA hergestellt.

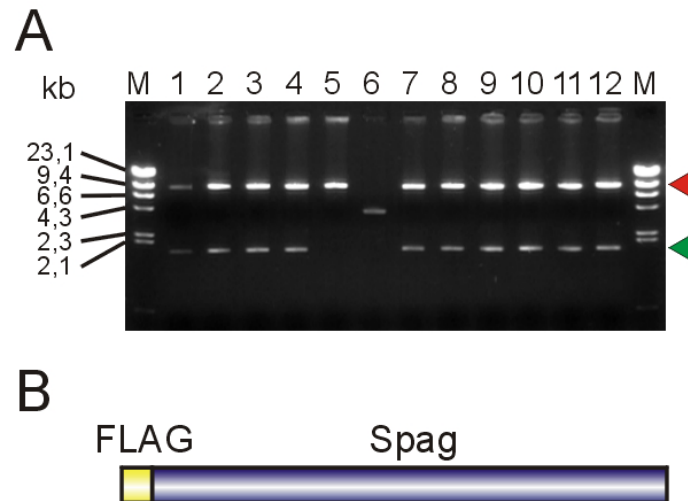


Abb. 2 Herstellung des pUAST-FLAG-*spaghetti*-Konstrukts. (A) zeigt ein 1% Agarosegel, mit welchem die Plasmid-DNA von 12 Klonen des FLAG-*spaghetti*-Konstrukts nach einer Restriktionsverdauung mit *NotI* und *KpnI* separiert worden war. Die DNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und mit einer Videokamera aufgenommen. Das rote Dreieck zeigt die DNA-Bande des pUAST-Vektors mit seiner Größe von 9,3kb. Das grüne Dreieck zeigt die DNA-Bande, welche das FLAG-*spaghetti* "insert" repräsentiert (ca. 1,6kb). Die einzelne Bande in Spur 5 repräsentiert einen pUAST-Vektor ohne insert. Die Bande in Spur 6 ist weder dem Vektor noch dem insert zuzuordnen. (B) schematische Darstellung des FLAG-Spag Proteins, welches in den transgenen Fliegen von dem Konstrukt aus (A) exprimiert wird.

Diese Sequenz befindet sich am Anfang und „in frame“ mit dem *spaghetti*-ORF (Abb. 2B). Diese 24 Nukleotide lange Sequenz kodiert für ein Peptid, welches kein Äquivalent im *Drosophila*-Proteom besitzt und als eine spezifische Markierung („tag“) fungiert. Die Aminosäuresequenz (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Asp) wird als FLAG bezeichnet und kann mit monoklonalen Antikörpern erkannt werden. Die Abbildung 2A zeigt ein 1% Agarosegel, mit welchem die Plasmid-DNA von 12 Klonen des FLAG-*spaghetti*-Konstrukts nach einer Restriktionsverdauung mit *NotI* und *KpnI* separiert worden war. Die DNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und mit einer Videokamera aufgenommen. Das rote Dreieck zeigt die DNA-Bande des pUAST-Vektors mit seiner Größe von 9,3kb. Das grüne Dreieck zeigt die DNA-Bande, welche das FLAG-*spaghetti* "insert" repräsentiert (ca. 1,6kb).

Das FLAG-markierte UAS-*spaghetti*-Konstrukt wurden anschließend in Embryonen injiziert. Es wurden vier transgene Linien hergestellt, von denen die Linien „A“ und „C“ das Konstrukt auf dem X-Chromosom tragen, die Linie „B“ das Konstrukt auf dem 2. Chromosom und die Linie „E“ das Konstrukt auf dem 3. Chromosom trägt.

Für die folgende Analyse der Expression des FLAG-Spag-Proteins in den Larven der verschiedenen transgenen Linien wurde die Linie „E“ verwendet, welches das FLAG-Protein mit der erwartenden molekularen Größe von ca. 70kDa exprimiert (Abb. 3). Diese Linie wurden mit den folgenden GAL4-Linien gekreuzt: *P{GawB}T80-GAL4* (Perrimon), *Aktin-GAL4* (Bloomington) und *dpp-GAL4* (Bloomington).

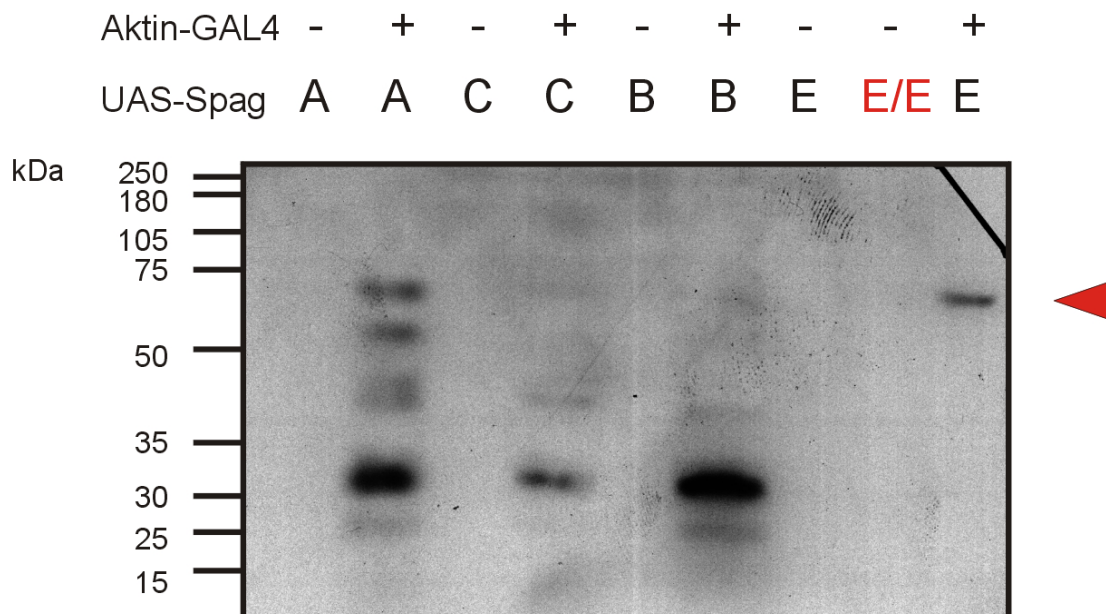


Abb. 3 Das UAS-FLAG-Spaghetti-Fusionsprotein ist in den Larven exprimiert. Es wurden Proteinextrakte von Larven mit den folgenden Kombinationen hergestellt, auf einem SDS-Polyacrylamidgel separiert und das ektopische Protein mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers detektiert: (A, C, B, E) sind Fliegen, die die pUAST-spaghetti-Transgene auf unterschiedlichen Chromosomen tragen. (A/+ , C/+ , B/+ und E/+) sind die oben genannten Fliegenlinien, verpaart mit AktinGAL4 tragenden Fliegen, zur Expression des ektopischen Fusionsproteins. E/E ist ein Sonderfall, bei der homozygot UAS-spaghetti tragende Fliegen bereits einen abnormalen Phänotyp besitzen (also ohne GAL4-Quelle). Um zu prüfen, ob dieser Phänotyp durch die Insertion des Transgens in ein Gen der Fliege oder durch eine basale Expression des Transgens verursacht wird, wurden homozygot UAS-spaghetti tragende Larven untersucht. Nur die Linie E zeigte ausschließlich die korrekte Größe (weiter Erläuterungen im Text).

Die Fliegenlinie E, die eine einzelne Bande auf dem Western-Blot zeigt (roter Pfeil), stellt eine Besonderheit dar. Homozygote Tiere zeigen einen abnormalen Phänotyp. Der Thorax dieser Tiere ist weitestgehend ohne Makrochaeten. Es wurde beschrieben, dass manche UAS-

Transgene einen "Leckfluss" zeigen, d.h. eine geringe basale Expression auch ohne GAL4-Quelle haben können (Perrimon *et al.*, 1998). Daher wurden ebenfalls Proteinextrakte von heterozygoten Larven, homozygoten Larven und Larven, die heterozygot für das Transgen und für die GAL4-Quelle (Aktin-GAL4) sind, hergestellt. Es konnte nur in der letzten Kombination das ektopische Protein nachgewiesen werden (Abb. 3). Daher lässt sich der Phänotyp der für das E-Transgen homozygoten Fliegen wahrscheinlich darauf zurückführen, dass das Transgen in ein rezessiv vererbtes Gen integriert hat, welches an der Entstehung der Makrochaeten beteiligt ist und so in den homozygoten Tieren zum Verlust des Genprodukts führt.

Das ektopische FLAG-Spaghetti-Protein ist im Zytoplasma von Imaginalscheiben lokalisiert

Immunfluoreszenzfärbungen larvaler Gewebe von Tieren mit dem Genotyp *w; P[w+mW.hs=GawB]T80/+;P[UAS-spaghetti]/+*, welche mit anti-FLAG-Antikörper gefärbt worden sind, zeigen, dass das ektopische Protein ebenso im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 4A und 4A') wie das endogene Spaghetti-Protein auch (Abb. 4B und 4B'). Als GAL4-Quelle wurde das T80-Konstrukt verwendet, welches das GAL4-Protein in den Imaginalscheiben, im Gehirn und in den Speicheldrüsen von Larven des dritten Stadiums exprimiert. Im Gegensatz zu dem endogenen Spaghetti-Protein (Abb. 4D) konnte das ektopische Spaghetti-Protein (Abb. 4C) in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Das ektopische Spag-Protein ist im Gehirn (Abb. 4E) deutlich stärker nachweisbar als das endogene Spag-Protein (Abb. 4F).

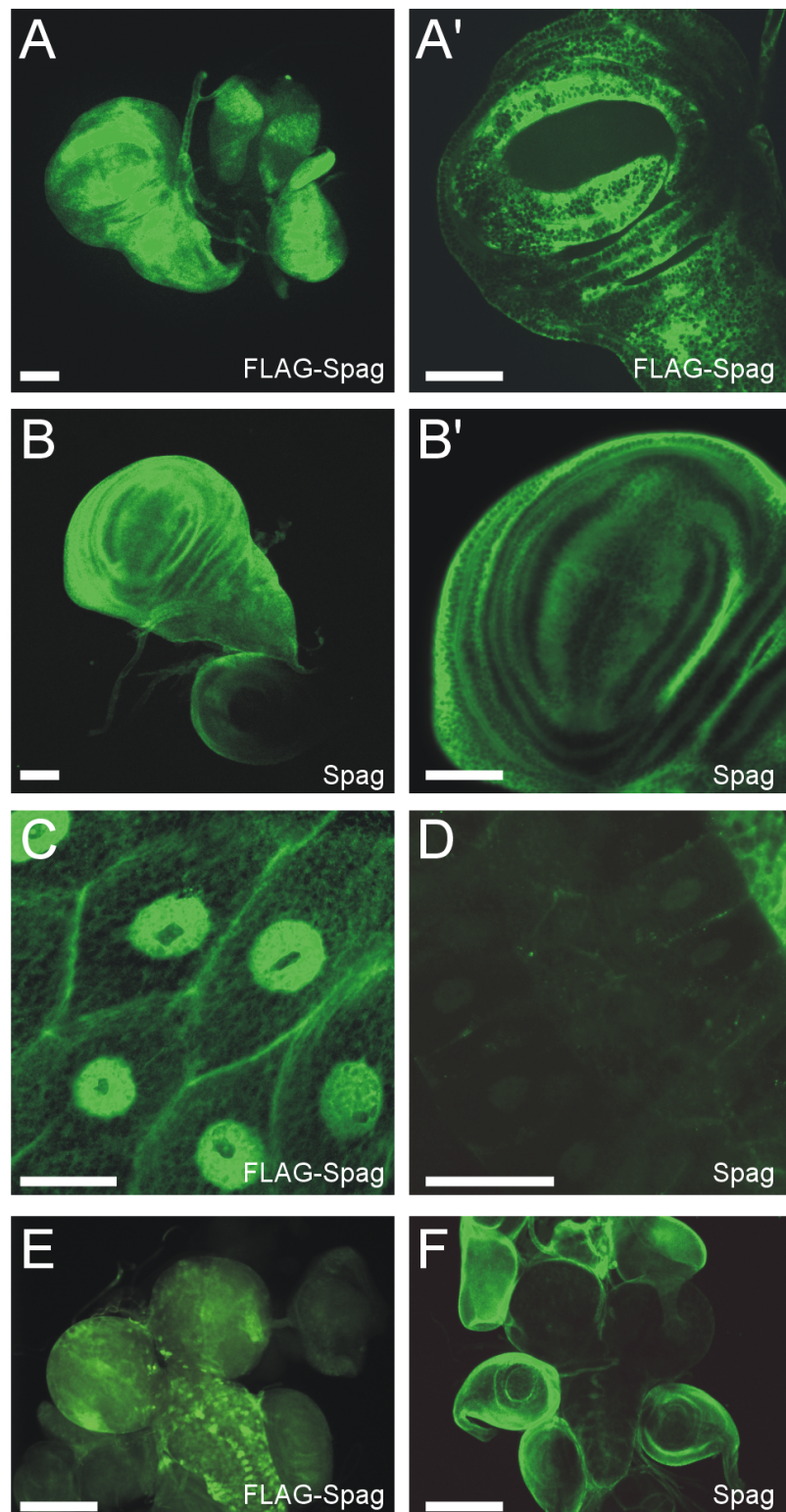


Abb. 4 Das ectopische Spaghetti-Protein kann in den Imaginalscheiben und in den polytären Geweben nachgewiesen werden. (A und A' Vergrößerung von A) zeigen eine Flügelimaginalscheibe einer Fliege, deren pUAST-spaghetti-Transgen durch eine T80-GAL4-Quelle exprimiert wird. Das ectopische Protein wurde mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers (grün) nachgewiesen. (B und B' Vergrößerung von B) zeigen eine Flügelimaginalscheibe einer Wildtyp-Larve, die für das endogene Spaghetti-Protein gefärbt wurde. (C) In den Speicheldrüsen kann das ectopische Spaghetti-Protein auch im Zellkern nachgewiesen werden. (D) Im Gegensatz hierzu kann das endogene Spaghetti-Protein nur gering in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden. (E) Das ectopische Spaghetti-Protein ist im Gehirn deutlich stärker nachweisbar als (F) das endogene Spaghetti-Protein (weitere Erklärungen im Text).

Fliegen, in denen das ektopische Spaghetti-Protein exprimiert wurde, sind lebensfähig und zeigen Abnormalitäten in den scutellaren Makrochaeten sowie im Flügel

Fliegen mit dem Genotyp $w; P[w+mW.hs=GawB]/T80/+; P[UAS-spaghetti]/+$, bei denen das ektopische Spaghetti-Protein zum Zeitpunkt des dritten Larvenstadiums in den Imaginalscheiben, im Gehirn und in den Speicheldrüsen exprimiert wurde, zeigen in etwa 50% abnorme scutellare Makrochaeten (Abb. 5A-G; es wurden etwa 400 Fliegen unter dem Binokular analysiert. Fliegen, bei denen augenscheinliche Entwicklungsstörungen auftraten, wurden statistisch erfasst und ihre Flügel bzw. ihr Thorax präpariert.). Die Makrochaeten sind Teil des Nervensystems der Fliege. Da vorher gezeigt werden konnte, dass das ektopische Protein auch im Gehirn der Larven exprimiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt spezifisch für die ektopische Expression ist. Sämtliche Kontrollen, d.h. die parentalen Stämme (heterozygote „E“-Fliegen sowie die Fliegen mit den GAL4-Quellen), zeigen keinerlei Abnormalitäten.

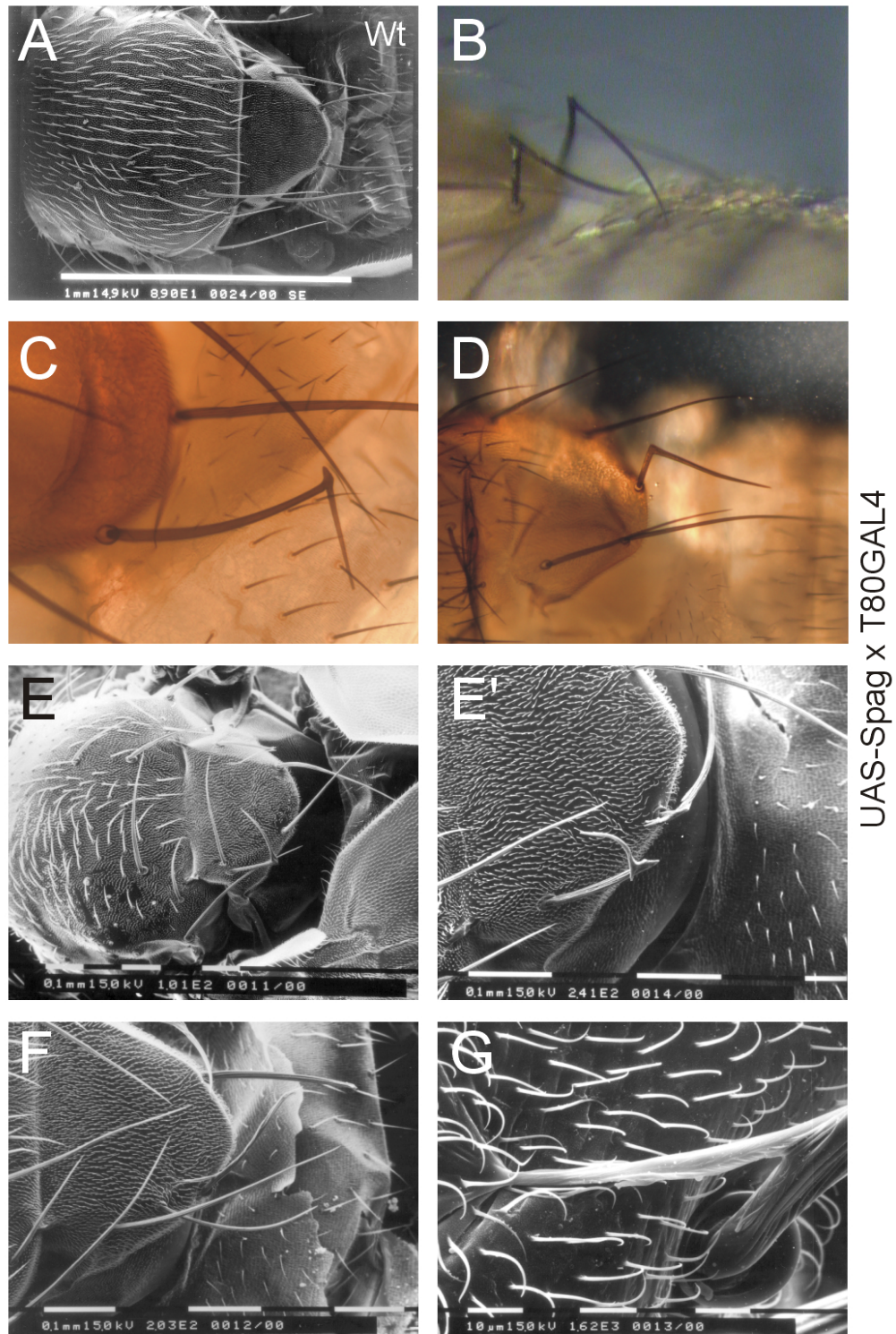


Abb. 5 Die ectopische Expression des Spaghetti-Proteins führt zur Bildung von abnormalen Formen der scutellaren Makrochaeten. (A) zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Wildtypthorax. (B) zeigt eine binokulare Aufnahme eines Thorax einer Fliege, in dem das ectopische Spag-Protein durch die T80-GAL4-Quelle exprimiert wird. (C und D) zeigen präparierte Thoraxe, die mittels Durchlichtmikroskopie fotografiert wurden. (E-G) zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Thoraxen mit den scutellaren Defekten (E' ist Vergrößerung von E, weitere Erläuterungen im Text).

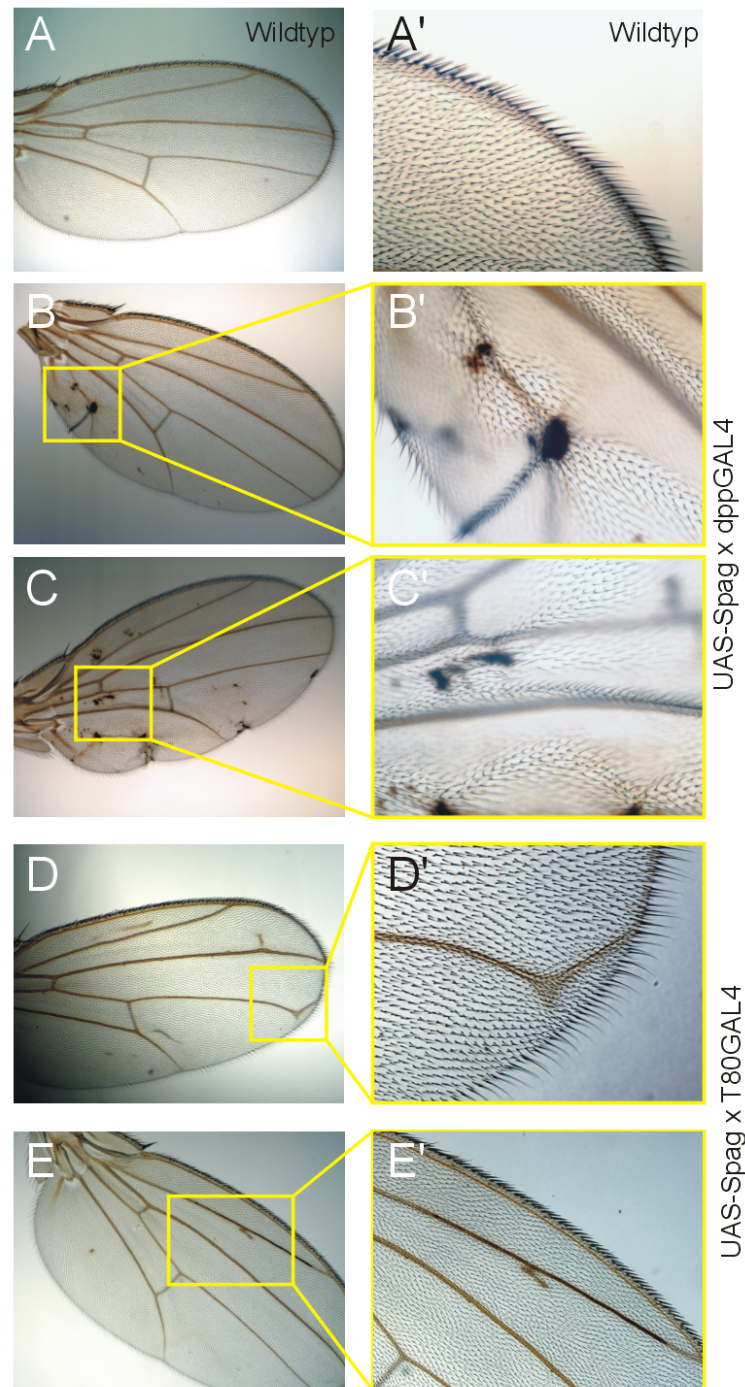


Abb. 6 Die Ektopische Expression des Spaghetti-Proteins führt zu Formationen von Extra-Venen in den Flügeln. Fliegen, die das pUAST-spaghetti-Transgen tragen, wurden mit Fliegen verpaart, die als GAL4-Quelle dppGAL4 oder T80GAL4 tragen. Die Flügel der Nachkommen wurden präpariert und unter dem Mikroskop betrachtet. (A und A' Vergrößerung von A) zeigen einen Wildtypflügel. (B-C') zeigen Flügel von Fliegen, in denen das ektopische Spaghetti-Protein durch dppGAL4 exprimiert wurde. (D-E') zeigen Flügel von Fliegen, in denen das ektopische Spaghetti-Protein durch T80GAL4 exprimiert wurde (Erklärung im Text).

Doch nicht nur die scutellaren Makrochaeten zeigen sich betroffen. Auch die Flügel dieser Tiere zeigen Abnormalitäten. Nach der Präparation der Flügel wurden diese unter dem Mikroskop (Durchlicht, Vergrößerung 50x und 200x) analysiert. Es konnten Formationen von venenartigen

Strukturen, die parallel der normalen Venen verlaufen (Abb. 6D, E sowie deren Vergrößerungen D' und E'), beobachtet werden. Zum Teil waren auch die normalen Venen verändert (Abb. 6D und D'). Fliegen mit dem Genotyp: *w; BcGl/+;P[UAS-spaghetti]/P[w+mW.hs=GAL4-dpp.blk1]40C.6*, bei denen das ektopische Spaghetti-Protein dem Expressionsmuster von *decapentaplegic* folgt, zeigen keinen Phänotyp im Thorax, jedoch einen verstärkten Phänotyp in den Flügeln (Abb. 6B-C). Die Expression von *decapentaplegic* verläuft früher als die des *T80*-Gens. Das Decapentaplegic-Protein wird bereits in embryonalen Stadien von *Drosophila melanogaster* benötigt. Später kann es unter anderem in Form eines Streifens in der Notum-Flügelimaginalscheibe nachgewiesen werden. Der unterschiedliche Zeitpunkt und der unterschiedliche Ort der Expression des GAL4-Proteins, welches das ektopische Spaghetti-Protein exprimiert, scheint für den unterschiedlichen Phänotyp der Fliegen verantwortlich zu sein.

Inwiefern war die ektopische Expression von FLAG-Spaghetti-Protein hilfreich, die Funktion von Spaghetti in *Drosophila melanogaster* zu verstehen?

- 1) Die ektopische Expression von FLAG-Spaghetti-Protein hatte keinerlei nachweisbare toxische oder letale Effekte.
- 2) Die Detektion des ektopischen Proteins in den dritten Larvenstadien zeigt, dass das ektopische Spaghetti-Protein prädominant im Zytoplasma von Imaginalscheibenzellen zu finden, und auch in den polyploiden Zellkernen von Speicheldrüsen nachweisbar ist. Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit dem Verhalten des endogenen Spaghetti-Proteins. Auch hier kann das Protein prädominant im Zytoplasma nachgewiesen werden und im Falle der Embryonen auch im Kern.
- 3) Der Phänotyp der adulten Fliegen, der durch ektopische Expression hervorgerufen wurde, lässt keine spezifische Funktion des Spaghetti-Proteins auf die Entwicklung der Fliege erkennen. Es handelt sich um einen Phänotyp, der durch vielerlei Umstände entstehen kann. So haben genetische Mosaik-Studien der unterschiedlichsten Gene (z.B. *apterous*, *vestigial* und viele mehr) einen ähnlichen Phänotyp gezeigt (Zerstörung des Aufbaus von Borsten, abnormale Strukturen in Thorax und Flügel etc). Es kann nur soweit geschlussfolgert werden, dass die Funktion des Spaghetti-Proteins wohl hauptsächlich den Flügel und den Thorax betrifft und hier die Differenzierung von Flügelzellen und Zellen des Thorax determiniert.

Die Erforschung der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* mit Hilfe des FLP/FRT-Systems

Analyse der genetischen Mosaik für die Mutation $l(2)k12101$ und für die Gene $l(2)gl$ und $scrib^{part}$

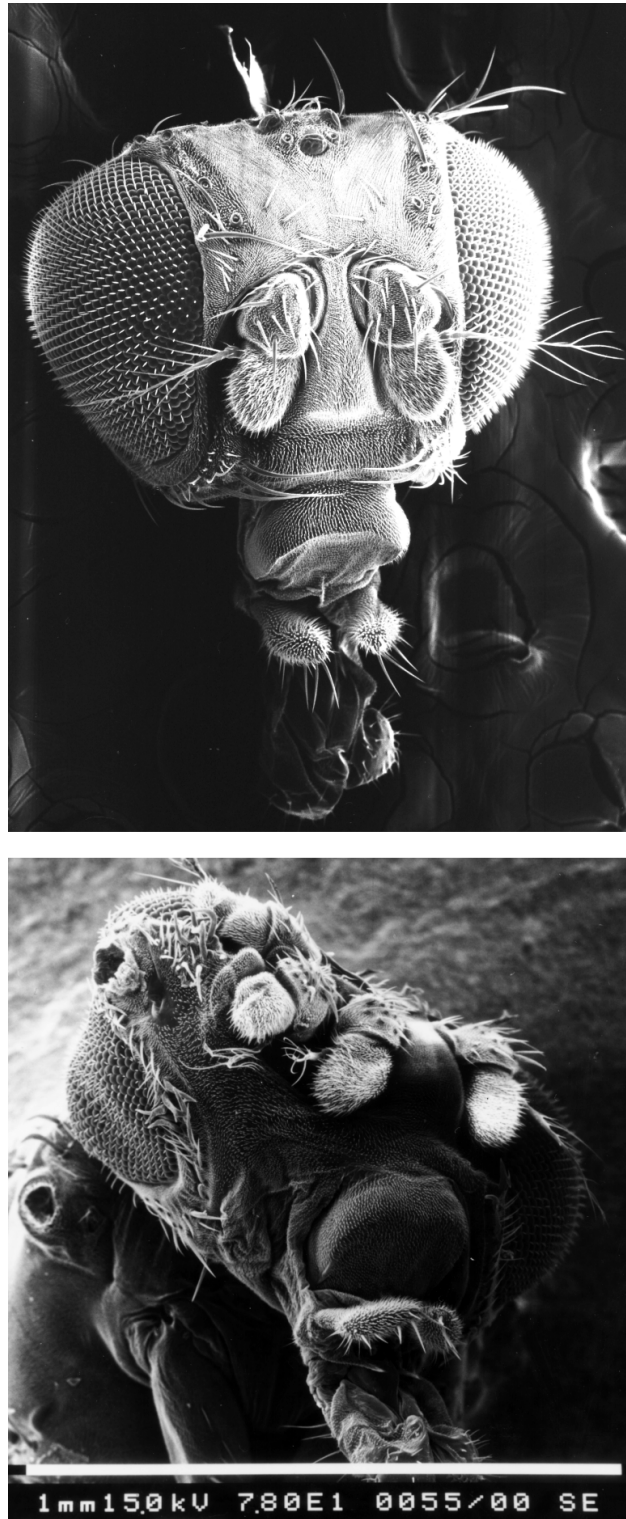


Abb. 7 Der Phänotyp, den $scrib^{part}$ -defiziente Klone im Kopf einer adulten Fliege verursachen. Oben: Kopf einer Wildtypfliege; unten: Kopf einer Fliege, in dem früh $scrib^{part}$ -defiziente Klone induziert wurden. Es konnten vier Antennen gezählt werden (Erklärung im Text).

Beim Studieren der Entwicklung eines komplexen Organismus wie *Drosophila melanogaster* stößt man auf eine Reihe fundamental bedeutsamer Fragen: Welche Zellen im jungen Embryo werden später zu den verschiedenen adulten Strukturen wie Flügel, Augen, Beine und Thorax etc. führen? Entwickeln sich diese Strukturen unabhängig von bestimmten Zelllinien? Wie viele Zellen werden für spätere Strukturen benötigt, und wie werden diese Zellen im Zuge der Entwicklung des Tieres kompartimentiert? Es ist in der molekularen Genetik schon seit längerem bekannt, dass Zellen miteinander kommunizieren und so ihre Genaktivität kontrollieren. Die Methode der Wahl ist die Erzeugung genetischer Mosaik in den verschiedenen Geweben von *Drosophila*. Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um genetische Mosaik zu erzeugen: es wurde ein Verlust von Chromosomen durch Einführung von instabilen oder mutierten Chromosomen induziert, es wurden Zellen oder Kerne transplantiert, es wurden lokal Gene inaktiviert oder aktiviert und es wurden mitotische Rekombinationen mit Hilfe von Röntgenstrahlung induziert (Garcia-Bellido *et. al.*, 1969). Röntgenstrahlung produziert seltene Brüche in den Chromosomen, welche zum Austausch der homologen Chromosomen-Arme führen können. Eine Zelle kann nun homozygot für diese Mutation werden, wenn die Schwesterchromatiden während der Mitose segregieren. Sichtbar würde dieser mutierte Klon jedoch nur dann werden, wenn in der Nähe der Mutation ein genetischer Marker rekombiniert wäre. Und genau hier beginnt die Limitierung dieser Art der Erzeugung genetischer Mosaik. Die Verfügbarkeit dieser genetischen Marker ist begrenzt. Die geringe Ausbeute an Klonen, die durch Röntgenstrahlung erzeugt werden kann, macht statistische Aussagen sehr schwer. Eine Erhöhung der Dosis der Röntgenstrahlung, welche die Ausbeute erhöhen könnte, führt jedoch nur zu massivem Zellsterben. Die Entwicklung des *yeast site-specific recombination* FLP/ FRT-Systems und die Herstellung neuer Zellmarker hat viele dieser Limitierungen überwunden. Die Konstruktion von *Drosophila*-Chromosomen mit integrierten FLP/ FRT-Elementen und Zellmarkern haben Mosaik-Studien zu einer Routineprozedur werden lassen.

Mosaik von Mutationen der Gene *l(2)gl* und *scrib^{var}* als Kontrolle für Klone der Mutation *l(2)k12101*

Die Interpretation von genetischen Mosaiken ist ohne sinnvolle Kontrollen kaum machbar. Daher wurden neben der Herstellung genetischer Mosaik für die Mutation *l(2)k12101* auch noch Mosaik für die Gene *l(2)gl* und *scrib^{var}* hergestellt. Die Herstellung der Klone erfolgte unter Anleitung von Dr. Arati Mishra, die im Zuge einer Kollaboration (*Indo-German cooperation programme of the Bundesministerium für Bildung und Forschung (Bonn) and the Department of Biotechnology,*

Ministry of Science and Technology (New Delhi), Project IND 98/316) mit mir zusammen am Projekt *scrib-Vartul* beteiligt war (Publikation, siehe CD).

Eine kurze Vorstellung der Gene *l(2)gl* und *scribble* (*vartul*)

Die erste Tumore aufweisende Fliege wurde 1967 in einem *Drosophila melanogaster* Wildtypstamm gefunden (Gateff *et al.*, 1967). Die Mutation wurde anschließend als eine Allel des schon lange vorher bekannten *lethal(2)giant larvae*-Gens [*l(2)gl*] identifiziert, das bereits 1933 von Bridges beschrieben wurde. Mutationen des rezessiv vererbten Tumorsuppressorgens *l(2)gl* sind verantwortlich für maligne Transformationen der Neuroblasten in den Drittlarvenstadien sowie der Imaginalscheiben (Gateff *et al.*, 1967). In homozygot *l(2)gl*-defizienten Tieren werden diese Effekte am Ende des dritten Larvenstadiums, kurz vor der Metamorphose, sichtbar. Das Tumorstadium verursacht ein Aufblähen der Larve (*giant larvae*), welches vor allem die Ringdrüse und Region des Prothorax betrifft, also jene Regionen, welche für die Produktion des Ecdysons zuständig sind. Als Konsequenz kann kein Ecdyson produziert werden. Damit ist eine Verpuppung nicht möglich. Die Abwesenheit des Ecdysons alleine ist jedoch nicht der Grund für die Defekte in den Mutanten, denn weder Injektion von Ecdyson noch Transplantation von normalen Ringdrüsen können die Mutanten retten (Hadorn *et al.*, 1937). Ebenso induziert das Fehlen des Hormons kein Tumorstadium (Karlson *et al.*, 1952). Das von *l(2)gl* kodierte Protein wird aufgrund seiner molekularen Größe als p127 benannt. Das Protein ist assoziiert mit der Zellmembran bzw. der interzellulären Matrix (Klämbt *et al.*, 1986, auch eigene Beobachtung). Die genaue Funktion des Proteins ist zur Zeit noch unbekannt. Arbeiten jüngerer Datums postulieren eine Rolle des p127-Proteins in der Stabilisierung von bestimmten Proteinen, die an der natürlichen Apoptose von Zellen der Speicheldrüse beteiligt sind (Farkas *et al.*, 2000) sowie an der Herstellung der Polarität innerhalb von Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass das p127-Protein ähnlich wie auch das Spaghetti-Protein lokalisiert ist und aufgrund dessen, dass *l(2)gl* Mutanten den gegenteiligen Phänotyp des Phänotyps der *l(2)gl¹²¹⁰¹* Mutanten zeigen ("tumor-disc" versus "small-disc", Nekrosis/Transformation versus Apoptosis), sind die *l(2)gl*-Mosaiken attraktiv für eine vergleichende Untersuchung.

Ähnlich verhält es sich mit dem zweiten Gen, das zur vergleichenden Analyse von genetischen Mosaiken gewählt wurde: das *scrib^{vart}*-Gen. Der Phänotyp beider Mutanten, der Gene *l(2)gl* und *scrib^{vart}*, ist ähnlich. *Scrib^{vart}*-defiziente Tiere zeigen ebenfalls einen "*giant larvae*"-Phänotyp sowie tumoröse und im Vergleich zu *l(2)gl*-Mutante wahrhaft gigantische Imaginalscheiben (Mishra, Marhold *et al.*, 2000 unpubliziert; siehe Abb. 8D).

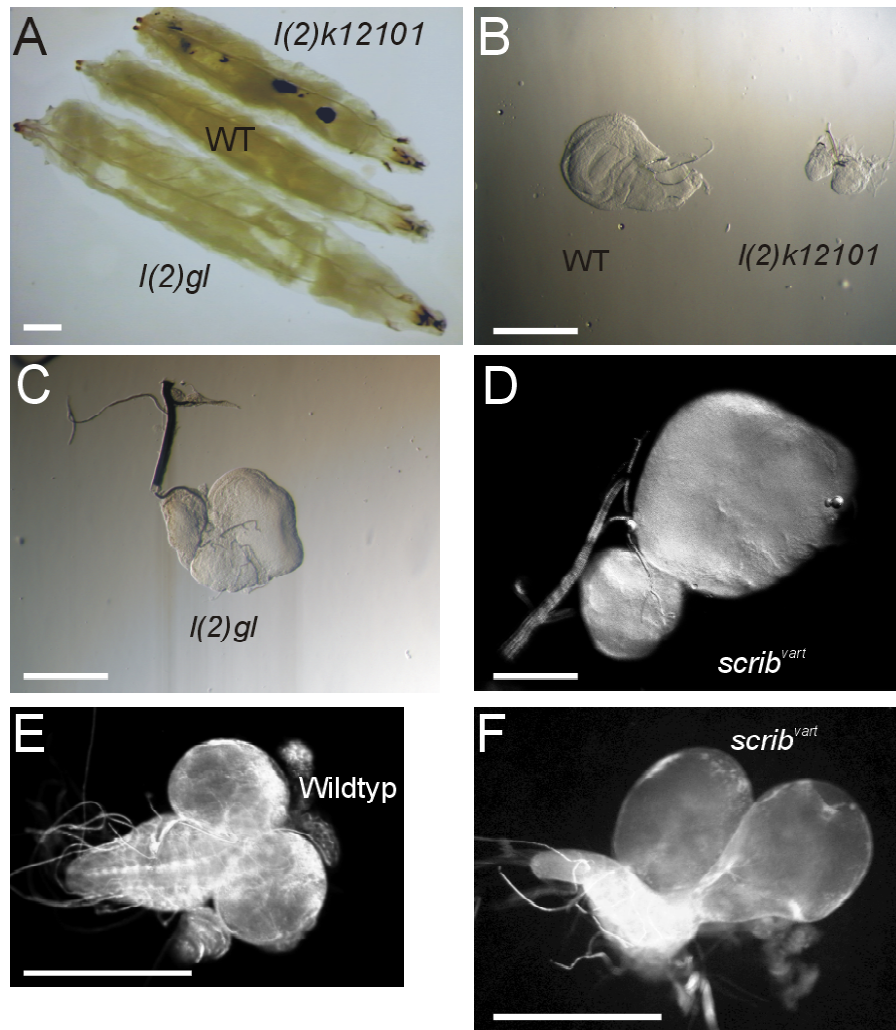


Abb. 8 Der Phänotyp von homozygoten *l(2)k12101*-Larven, sowie der von homozygot *l(2)gl*- und *scrib^{vart}*-defizienten Larven. (A) zeigt die typischen melanotischen Pseudotumore von *l(2)k12101* Larven und eine „giant larvae“ als Resultats des Verlusts beider Allele von *l(2)gl*. (B) zeigt die atrophischen Imaginalscheiben der homozygoten *l(2)k12101*-Larven, im Vergleich zu den Imaginalscheiben des Wildtyps (WT), (C) der homozygot *l(2)gl*-defizienten Larven und (D) homozygot *scrib^{vart}*-defizienter Larven. (E) zeigt das tumoröse Gehirn einer *scrib^{vart}*-defizienten Larve im Vergleich zu (E) einem Gehirn einer Wildtyp-Larve (weitere Erläuterungen im Text).

Die Art des abnormen Wachstums der *scrib^{vart}*-Tumoren ist jedoch nicht invasiv und metastasenbildend wie bei den *l(2)gl*-defizienten Tieren. Transplantationsexperimente zeigen, dass das transplantierte *scrib^{vart}*-Tumorgewebe im Vergleich zu *l(2)gl*-Gewebe niemals invasives Verhalten zeigt (Mishra, Marhold *et al.*, 2000 unpubliziert). Mutationen des *scrib^{vart}*-Gens verursachen Tumore in den Gehirn-Hemisphären und in einigen (nicht jedoch den Augen-Antennen-Imaginalscheiben) Imaginalscheiben, wobei die p127- und Dlg- (*discharge*) Proteine nicht korrekt lokalisiert werden. Das Tumorstadium der *scrib^{vart}*-Mutanten kann durch ektopische Expression des Dlg-Proteins komplett verhindert werden, die Fliegen können sich völlig normal entwickeln (Mishra, Marhold *et al.*, 2000, unpubliziert). Kürzliche immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass das *scrib^{vart}*-Gen für zwei verschiedenen Protein-

Isoformen kodiert, die in unterschiedlichen Arealen des embryonalen Strickleiternnervensystems lokalisiert sind (Li und Marhold *et al.*, 2001). Abbildung 8 zeigt einen Vergleich der Phänotypen der homozygoten *l(2)k12101*-Tiere und *l(2)gl*- und *scrib^{part}*-defizienten Tiere. Abbildung 8A zeigt den Phänotyp der *l(2)k12101*-mutierten Larven mit den typischen melanotischen Pseudotumoren sowie die *l(2)gl*-defizienten "giant-larvae" (*scrib^{part}*-defiziente Larven haben den gleichen Phänotyp; Aufnahme: Binokular mit Videokamera). Abbildung 8B zeigt präparierte Imaginalscheiben von Wildtyp (links, WT) und *l(2)k12101*-Mutanten (rechts; Aufnahmen: Vergrößerung 50x Durchlicht mit Videokamera). Abbildung 8C zeigt typische tumoröse Imaginalscheiben einer *l(2)gl*-defizienten Larve. Betont werden sollte die Morphologie dieser Imaginalscheiben; sie zeigen zwar noch Faltungen, die denen der Wildtyp-Imaginalscheiben ähneln, jedoch auch invasiv-tumoröses Verhalten im Gegensatz zu Abbildung 8D, den tumorösen Imaginalscheiben von *scrib^{part}*-defizienten Larven. Diese erscheinen als "Bälle" (Name: *vartul*; Hindi, etwas das vormals flach ist und dann anschwillt) und zeigen keinerlei Invasivität oder Metastasen. Abbildung 8F zeigt ein präpariertes larvales Gehirn einer *scrib^{part}*-defizienten Larve, das im Vergleich zu Abbildung 8E, dem Gehirn vom Wildtyp ebenfalls eine tumorartige Vergrößerung der Gehirnhemisphären aufweist.

Früh induzierte, spaghetti-mutierte Klone führen zum Tod der Fliege

Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die *spag*-defizienten Klone induziert. Hierzu wurden die Fliegenstämme: *w1118*, *P[ry+ hsFLP]/f36a*; *l(2)k12101* *P[ry+t7.2=neoFRT]43D* *P[w+mC=piM]* 46F *P[w+mC=piM]*47F / *CyO*; *kar2*, *ry506* mit *w1118*, *P[ry+ hsFLP]/f36a*; *P[ry+t7.2=neoFRT]43D* *f+ M(2R)* / *CyO*; *kar2*, *ry506* verpaart. Die Eier dieser Kreuzung wurden über Nacht gesammelt und die adulten Fliegen in neue Futterröhrchen überführt. Die Eier wurden bei 25°C entsprechend lang inkubiert (siehe Tabelle 1) und anschließend im Wasserbad bei 37°C für 1h einem Hitzeschock unterzogen, um die Flipase zu aktivieren.

Tabelle 1 Die Induktion von *spag*-defizienten Klonen zu verschiedenen Zeitpunkten haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung von *Drosophila*

<i>Zeitpunkt der Induktion der spag-Klone</i>	<i>Effekt auf die Entwicklung</i>
12-24h AEL	Tod während der Metamorphose
24-48h AEL	Tod während der Metamorphose; wenige geschlüpfte Fliegen (eine Fliege von 19 möglichen), mit z.T. dramatischen

	Abnormalitäten in Thorax (Abb. 11B, 12A-D)
48-72h AEL	vollständige Entwicklung der Imago mit Abnormalitäten in Augen, Thorax und Flügeln (Abb. 10B und C, 12E-H)
72-96h AEL	vollständige Entwicklung der Imago mit geringeren, Flügeln und Augen (Abb. 9B und B', 10B und C, 12I und J)
96-120h AEL	vollständige Entwicklung der Imago ohne erkennbare Abnormalitäten

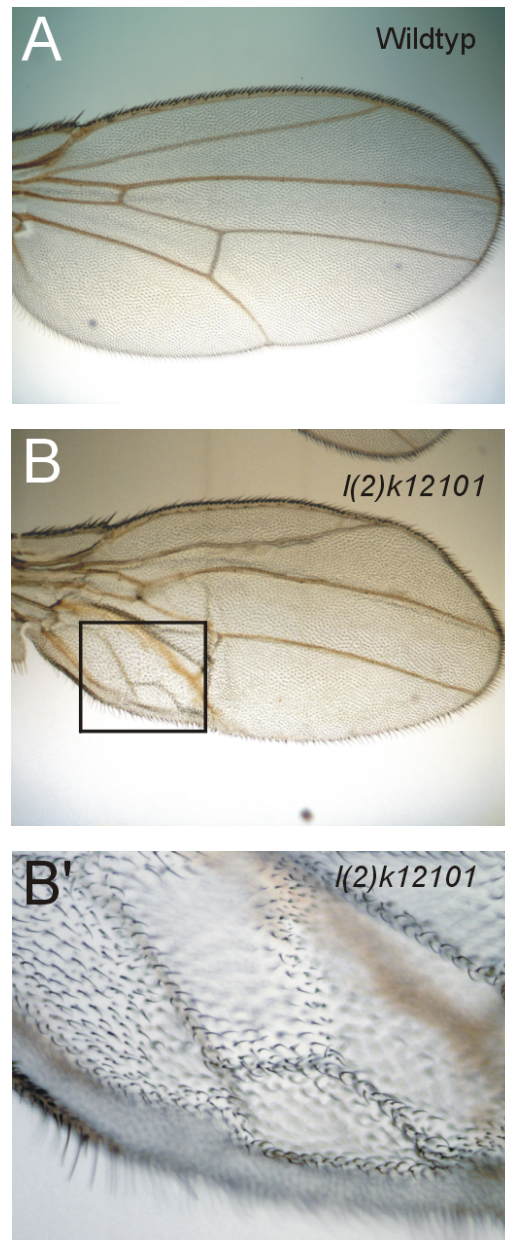


Abb. 9 Flügel, in denen Klone für die Mutation *l(2)k12101* induziert wurden. (A) zeigt einen Wildtypflügel. (B und B' Vergrößerung von B) zeigen einen Flügel, in dem *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden. Die Gesamtgröße ist reduziert, obwohl nicht überall im Flügel die mit dem *forked*-Marker markierten Klone zu finden sind (nicht-autonomer Effekt). Da die Klone stark elongiert sind und parallel zu den Venen verlaufen, hat man das Gen als „*spaghetti*“-Gen bezeichnet (*Spaghetti-Nudeln*).

Abbildung 9A zeigt einen Wildtyp-Flügel. Die Abbildungen 9B und B' zeigen den typischen *l(2)k12101*-Phänotyp im Flügel, den *spaghetti*-mutierte Klone verursachen, die zwischen 72-96h induziert wurden. Der Flügel ist insgesamt stark verkleinert, obwohl die Klone nur in bestimmten Regionen zu finden sind (nicht-autonomer Effekt). Die Klone sind mit dem "*forked*" (*ſ*)-Marker (gekrümmte "Haare" [Trichome]) markiert. Die Form der Klone ist stark elongiert. Sie verlaufen parallel zu den Venen, was zur Namensgebung ("*Spaghetti-Nudeln*") geführt hat. Die Ergebnisse sind identisch mit denen von Garcia-Bellido, was ein Beweis dafür ist, dass das

gleiche Allel zur Herstellung der Klonen verwendet wurde. Ähnliche Verhaltensweisen der Klonen können auch in Abbildung 10 erkannt werden.

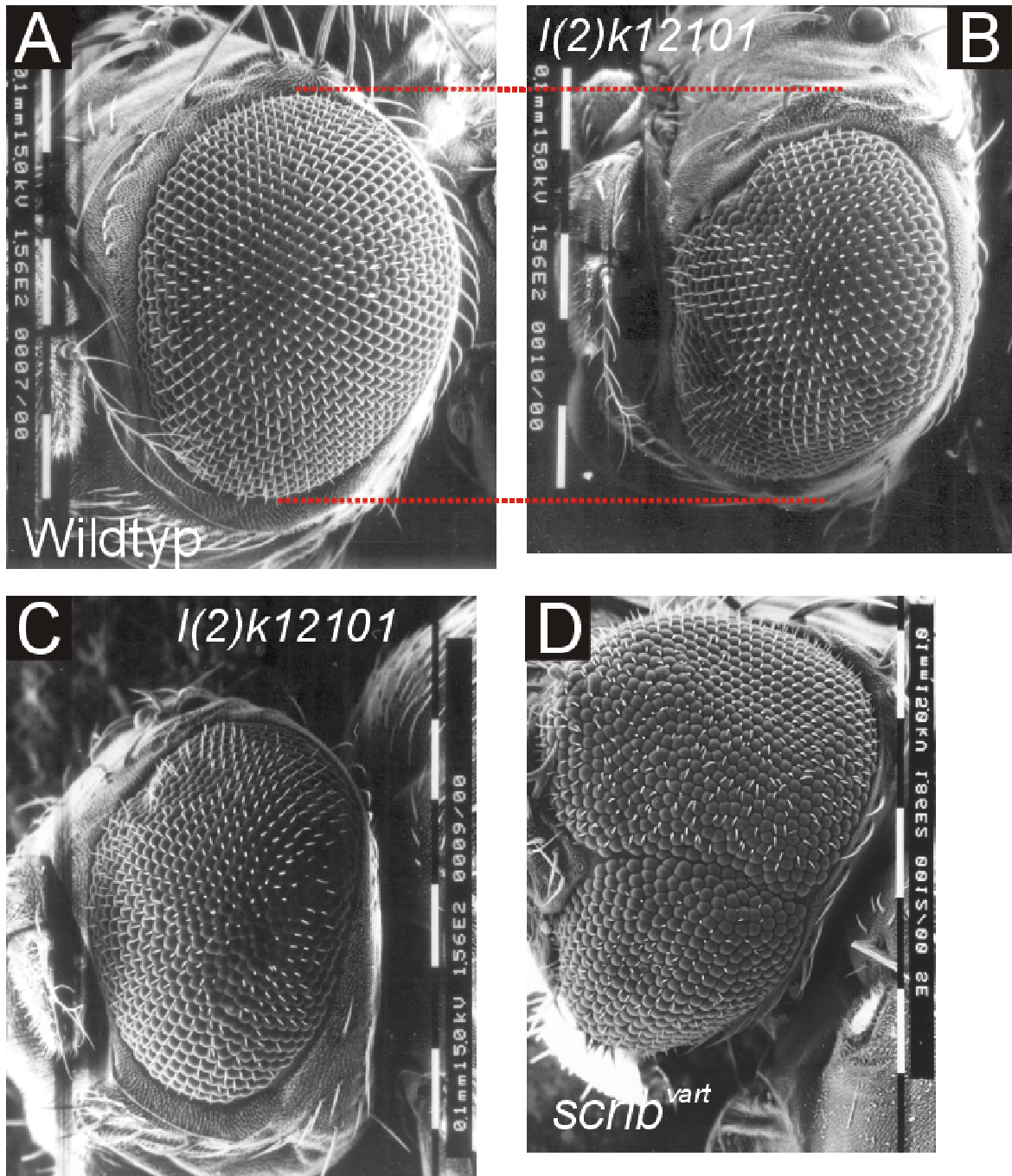


Abb. 10 Komplexaugen, in denen spaghetti- und scrib^{var}-defiziente Klone induziert wurden. (A) zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Komplexauges von einer Wildtypfliege. (B) und (C) zeigen Komplexaugen von Fliegen, in denen spaghetti-mutierte Klone induziert wurden. Die Gesamtgröße ist reduziert (nicht-autonomer Effekt), es fehlen Ommatidien und sensorische Stäbchen. (D) zeigt den spektakulärsten Phänotyp, den scrib^{var}-defiziente Klone in den Komplexaugen verursachen. Das Auge ist entlang der dorso-ventralen Achse („Equator“) dupliziert, ohne jedoch größer zu sein, als ein Wildtypauge. Es scheint, als ob die Zellen der einen Hälfte des Auges ein neues „fate“ erhalten haben.

Abbildung 10A zeigt ein Wildtyp-Auge mit seinen wohlgeordneten ca. 800 Ommatidien. Die Abbildungen 10B und 10C zeigen die Augen, in denen sich *spaghetti*-mutierte Klone befinden. Analog zu den Beobachtungen in den Flügeln ist auch hier die Gesamtgröße reduziert (nicht-autonomer Effekt, siehe rote gestrichelte Linie als Größenvergleich), obwohl sich nicht überall im Auge Klone befinden. Es fehlen ganze Areale von Ommatidien samt sensorischer Stäbchen.

Besonders spektakulär offenbaren sich *scrib^{var}*-defiziente Klone in den Strukturen, die sich aus der Auge-Antennen-Imaginalscheibe ableiten. Es sei hier erwähnt, dass die Imaginalscheiben der homozygot *scrib^{var}*-defizienten Larven tumorartig extrem vergrößert sind, mit Ausnahme der Auge-Antennen-Imaginalscheibe. Sie fehlt bereits nach dem ersten Larvenstadium (Mishra, Marhold *et al.*, 2000, unpubliziert). Abbildung 10D zeigt eine dorso-ventrale Achsenspiegelung innerhalb des Komplexauges an einer Struktur, die der „Equator“ genannt wird. Diese Struktur teilt das Auge in ein dorsales und ventrales Kompartiment. Die Gesamtgröße ist jedoch gleich der eines Wildtypauges, was darauf schließen lässt, dass ein Teil des Auges eine neue Differenzierung („fate“) angenommen hat, jedoch mengenmäßig nicht mehr Zellen gebildet werden. Ein weitere spektakulärer Phänotyp von *scrib^{var}*-defizienten Klonen ist in Abbildung 1, unten, gezeigt, nämlich die Duplikationen von ganzen Antennenstrukturen. Der Rekord lag oft bei fünf kompletten Antennen (d.h. drei ektopische komplette Antennen). Die Kopfkapsel ist stark verformt, wohl Aufgrund des benötigten Platzes, den die ektopischen Strukturen benötigen, jedoch nicht vergrößert.

Einen ähnlich spektakulären Phänotyp zeigen *spaghetti*-mutierte Klone im Thorax der Imagines (Abb. 12).

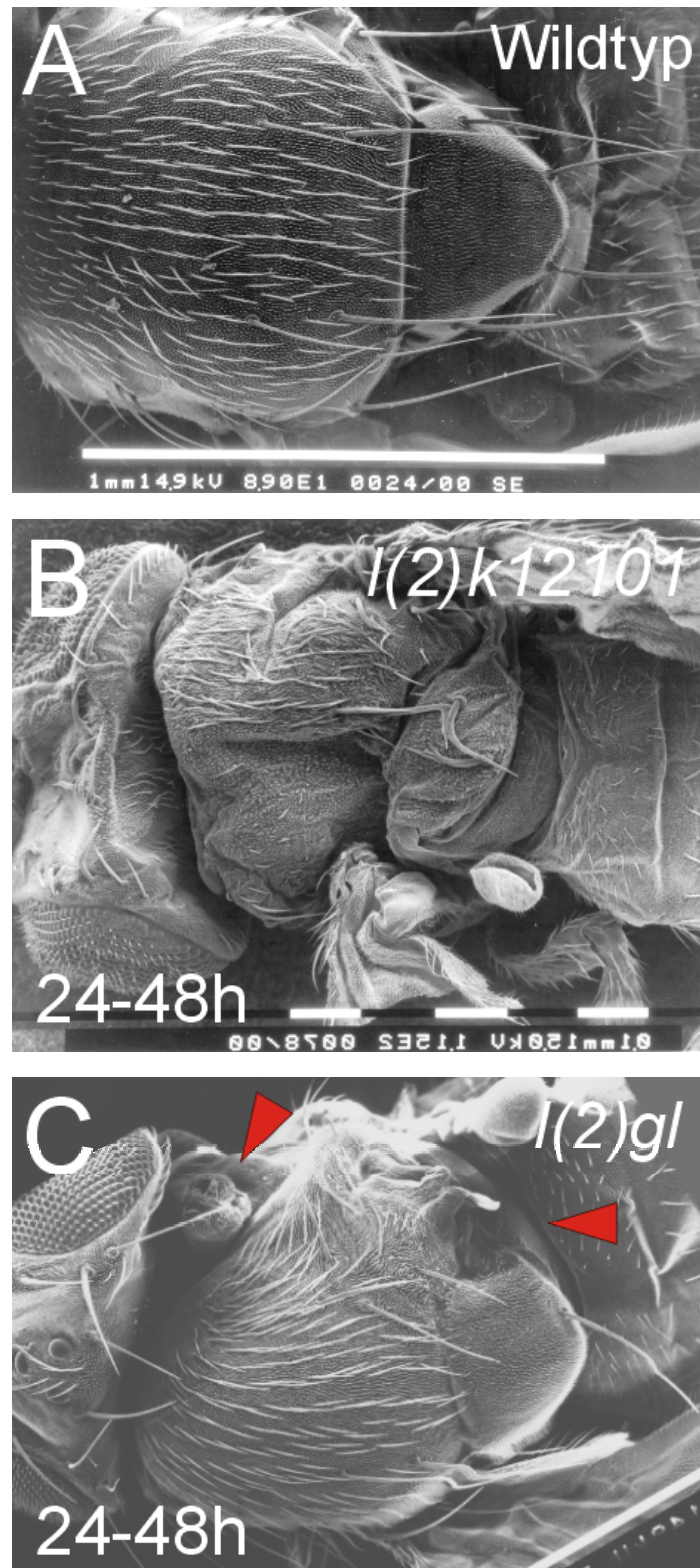


Abb. 11 Thoraxe, in denen spaghetti- und *l(2)gl*-defiziente Klone induziert wurden. (A) zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Wildtypthoraxes mit dem Scutum und dem Scutellum. (B) zeigt einen Thorax, in dem *spag*-Klone induziert wurden. (C) zeigt den Phänotyp, den *l(2)gl*-defiziente Klone im Thorax der Fliegen verursacht. Die roten Pfeile markieren die durch die Klone verursachten Abnormalitäten („outgrowth“, Nekrose). Die Klone wurden zwischen 24-48h induziert (weitere Erklärungen im Text).

Abbildung 11A zeigt das Scutum und Scutellum einer Wildtyp-Imago. Die Abbildungen 11B und 12 zeigen den dramatischen Einfluss von *spaghetti*-mutierten Klonen auf die Entwicklung des Thorax der Imagines. Ganze Areale wurden nicht gebildet. Je nach Zeitpunkt der Induktion der Klone war der Organismus in der Lage, das fehlende Gewebe zu kompensieren, was zu spaltartigen Strukturen im Thorax geführt hat (Abb. 11B). Der *f*-Marker, der den Klon markiert, konnte nur in peripheren Regionen der Defekte erkannt werden, was zur Annahme führt, dass im Zentrum der Defekte die Klone fehlen. Abb. 11C zeigt den Einfluss von *l(2)gl*-defizienten Klonen auf die Entwicklung des Thorax. Es kann ein nekrotisches Verhalten (Abb. 11C, rotes Dreieck, rechts) sowie ein „outgrowth“ (Abb. 11C, rotes Dreieck, links) beobachtet werden.

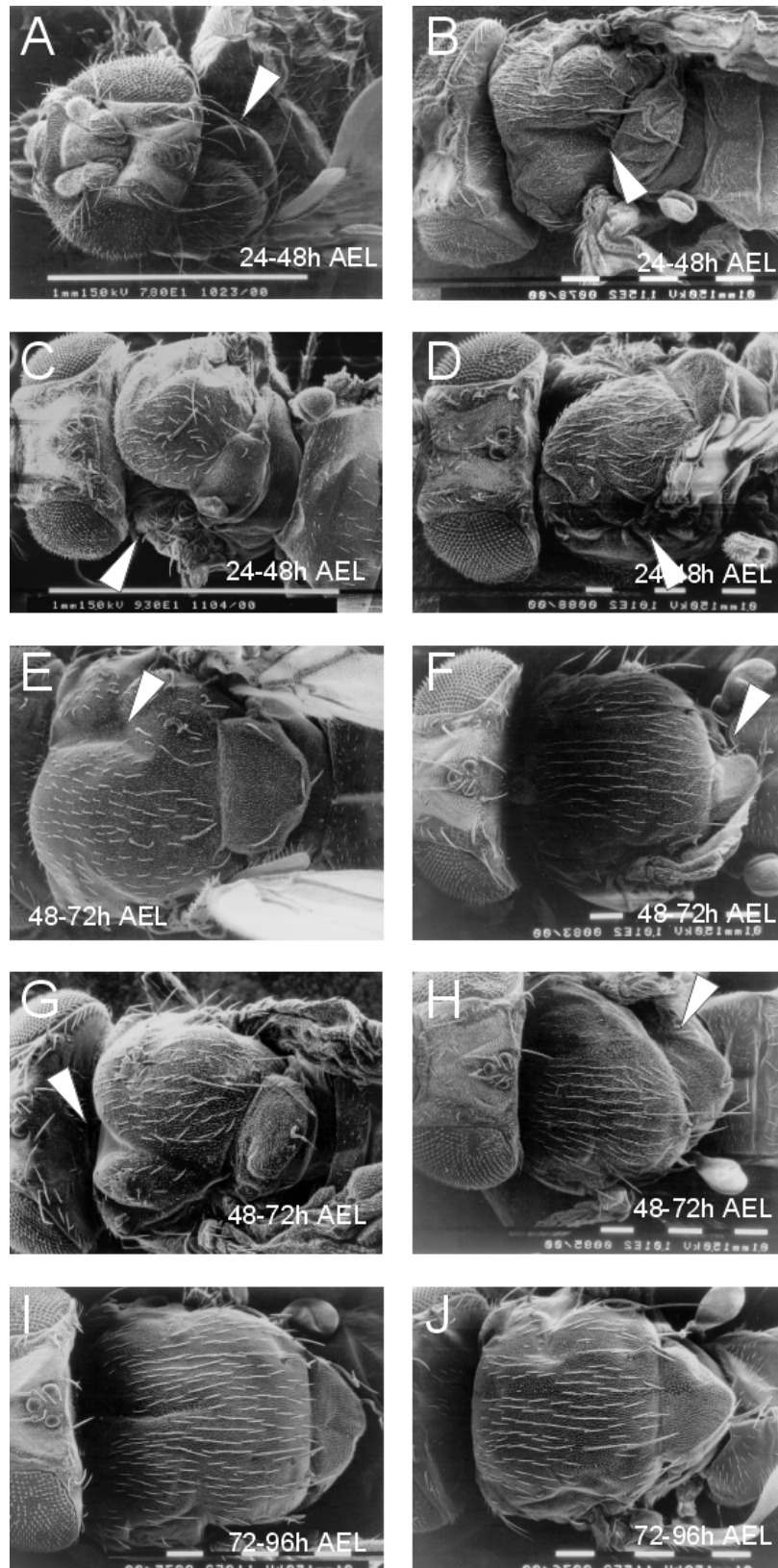


Abb. 12 Der prominenteste Phänotyp, den Klone für die Mutation *l(2)k12101* in den Thoraxen zeigt. (A-D) zeigen Defekte in den Thoraxen, die früh induzierte (24-48h, nach Eiablage) spaghetti-mutierte Klone verursachen. Die Dreiecke zeigen jeweils auf die Orte mit dem größten Defekt. Es fehlt z.T. bis zu 70% des Thorax. (E-H) zeigen den Phänotyp im Thorax der Fliegen, den später induzierte (48-72h, nach Eiablage) spaghetti-mutierte Klone verursachen. Der Zeitpunkt der Induktion der Klone ist direkt proportional zum Verlust an Gewebe. (I-J) zeigen spät induzierte Klone, die kaum noch abnormale Effekte aufweisen (weitere Erläuterungen im Text).

Die Abbildung 12 zeigt den Einfluss des Zeitpunkts der Induktion von *spaghetti*-mutierten Klonen auf die Entwicklung des Scutum-Scutellum Komplexes: Abb. 12A zeigt einen Thorax, in dem schon sehr früh Klone (24-48h, AEL) induziert wurden. Der Thorax ist nur teilweise vorhanden (Abb. 12A), oder (Abb. 12B-D) zur Hälfte gemacht. Diese Tiere sind, wie nicht anders zu erwarten, äußerst kurzlebig. Etwa zwei Stunden nach dem Schlüpfen fallen sie ins Futter und verenden dort. Später induzierte, *spaghetti*-mutierte Klone (48-72h, AEL) verursachen geringere Effekte, wie in Abb. 12E-H (Dreiecke) zu sehen ist, was direkt proportional zur Größe ist, den ein Klon an Fläche in den Imaginalscheiben einnimmt, die später die adulten Strukturen bilden. Spät (72-96h, AEL) induzierte Klone zeigen kaum noch abnormale Effekte auf den Thorax (Abb. 12I und J).

Abbildung 13 zeigt den prominentesten Phänotyp, der von *l(2)gl*-defizienten Klonen erzeugt wird. Dieser Phänotyp konnte in ungewöhnlich hoher Anzahl (in ca. 80% der Fliegen, die Klone tragen) beobachtet werden.

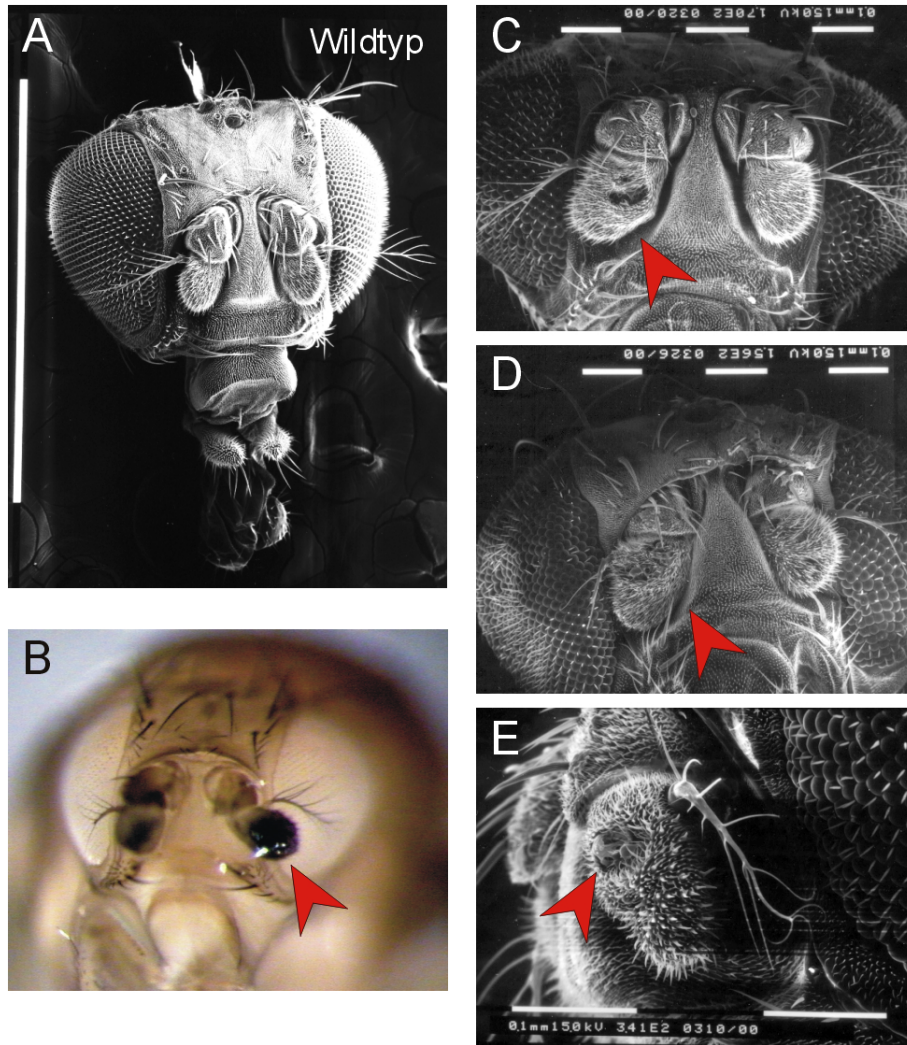


Abb. 13 Der prominenteste Phänotyp, den *l(2)gl*-defiziente Klone in den Antennen zeigt. (A) zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Wildtypkopfes. (B) zeigt eine binokulare Aufnahme eines Kopfes, in dem *l(2)gl*-defiziente Klone induziert wurden. Eine Antenne (rotes Dreieck) ist schwarz verfärbt und von abnormaler Form. (C-E) zeigen diesen Defekt, mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops. (C) zeigt eine Antenne (rotes Dreieck), die Löcher zu haben scheint und leicht vergrößert ist. (D) zeigt ein Beispiel mit einem größeren Defekt. Die Arista ist deformiert und die Kopfkapsel stark verformt. (E) zeigt in einer höheren Vergrößerung eine dieser löchrigen Strukturen, als Beispiel für Nekrose (weitere Erklärungen im Text).

Die Abbildung 13A zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Wildtypfliegenkopfes mit den beiden Antennen, Komplexaugen und Mundwerkzeugen. Abb. 13B-E zeigen Köpfe von Tieren, in denen *l(2)gl*-defiziente Klone induziert worden sind: Abb. 13B zeigt eine Farbaufnahme, die mit Hilfe eines Binokulars aufgenommen wurde. Der rote Pfeil markiert eines der drei Antennensegmente, das schwarz verfärbt (nekrotisch) und verformt ist. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. 13C-E) solcher Antennen zeigen eine Vergrößerung des betroffenen Organs, es enthält "Löcher" oder Verformungen, die mit dem μ -Marker markiert sind, d.h. auch hier erzeugt der Klon selbst den Defekt. In Abb. 13E kann

darüber hinaus eine degenerierte Arista (Tannenbaum- artige Struktur des Antennenkomplexes) erkannt werden.

Die spaghetti-mutierten Klone, induziert zu verschiedenen Zeiten, erzeugen schwere Defekte in den Imaginalscheiben von Drittlarvenstadien

Um den Ursprung der Defekte zu bestimmen, den *spag*-Klone verursachen, wurden die Imaginalscheiben der Larven untersucht, in denen Klone zu verschiedenen Zeitpunkten induziert wurden. Die adulten Strukturen, wie Thorax, Flügel, Beine und Augen werden in *Drosophila melanogaster* von den entsprechenden Imaginalscheiben abgeleitet. Die größten Defekte, die *spaghetti*-mutierte Klone in den Imagines erzeugen, konnten vor allem im Thorax und dem Flügel beobachtet werden. Beide adulten Strukturen entstehen aus der gleichen Imaginalscheibe: der Notum-Flügelimaginalscheibe. Daher wurde im Folgenden ein besonderes Augenmerk auf diese Imaginalscheibe gelegt. Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung der im Folgenden gezeigten Daten wieder.

Tabelle 2 Die Induktion von *spag*-defizienten Klonen zu verschiedenen Zeitpunkten haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung der Notum-Flügelimaginalscheiben.

<i>Zeitpunkt der Induktion der spag-Klone</i>	<i>Effekt auf die Entwicklung</i>
24-48h AEL	Notum-Flügelimaginalscheiben drastisch deformiert, erhöhte Kernaktivität nachweisbar, Muster der <i>wingless</i> -Expression abnormal, Klone können <u>nicht</u> nachgewiesen werden (Abb. 15D-L, 17A-C", 18B-C', 19C-L)
48-72h AEL	Form der Notum-Flügelimaginalscheiben nahezu normal, jedoch einige Bereiche reduziert (Notum), Klone können <u>nicht</u> nachgewiesen werden (Abb. 14B-D)
72-96h AEL	keine auffälligen morphologischen Defekte in den Notum-Flügelimaginalscheiben, Klone können nachgewiesen werden (Abb. 16A-B")

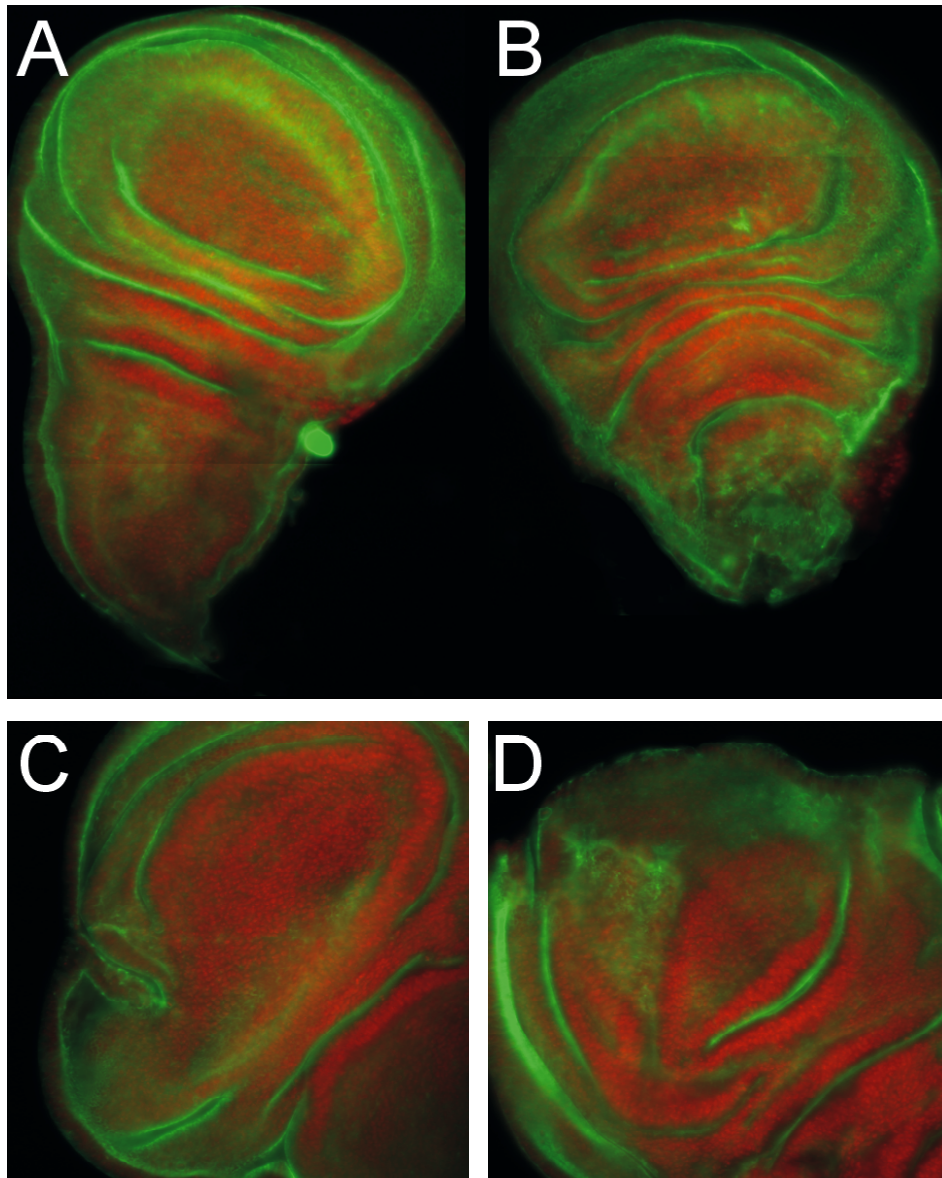


Abb. 14 Die Induktion von spaghetti-mutierten Klonen in den Notum-Flügelimaginalscheiben (48-72h AEL) verursachen abnormale Faltungen und Reduktion von ganzen Zellarealen. (A) zeigt eine Notum-Flügelimaginalscheibe, welche für F-Aktin (grün) und DNA (rot) gefärbt wurde, und mit Hilfe eines Laser-Scanningmikroskops fotografiert wurde. (B-D) zeigen Notum-Flügelimaginalscheiben, in denen spaghetti-mutierte Klone induziert wurde. Die Faltungen sind abnormal und zum Teil fehlen ganze Areale (weitere Erläuterungen im Text).

Abbildung 14 zeigt konfokale Laserscanning-Aufnahmen von (A) Notum-Flügelimaginalscheiben des Wildtyps und (B-D) der der genetischen Mosaïke. Es wurde hier für filamentöses F-Aktin (mit Phalloidin-Alexa488) und DNA (mit Propidiumjodid) doppelgefärbt, um zum einen die Faltungen in den Imaginalscheiben zu zeigen und zum anderen die Anzahl der Zellen mit Hilfe der Kernfärbung darzustellen. Abb. 14B zeigt deutliche Defekte im Notum-Bereich, also jenem Bereich, der später in den adulten Tieren eine Hälfte des Thorax macht. Dieser Bereich ist stark verkleinert, die Kernfärbung in den Bereichen mit den größten Defekten nahezu abwesend. Ebenfalls kann eine Kompression der gesamten Imaginalscheibe entlang der

anterior-posterioren Achse beobachtet werden. Abb. 14C und D zeigen Faltungsprobleme im dem Bereich der Imaginalscheibe, der später den Flügel macht. Leichte Faltungsdefekte, wie sie in Abb. 14C zu sehen sind, führen später zu den elongierten "nudelartigen" Klonen im adulten Flügel, die zur Namensgebung des *spaghetti*-Gens geführt haben. Hingegen werden größere Defekte, wie in Abb. 14D zu sehen sind, kaum einen ordentlichen Flügel machen, hier wird ein verstümmeltes Organ gebildet werden.

Konfokale Analyse der F-Aktin Struktur, die von Imaginalscheiben in denen früh spaghetti-mutierten Klone induziert wurden, zeigen einen massiven Verlust von Gewebe und abnormale Faltungen

Imaginalscheiben, in denen früh (24-48h, AEL) *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden, zeigen einen massiven Verlust an Gewebe sowie abnorme Faltungen.

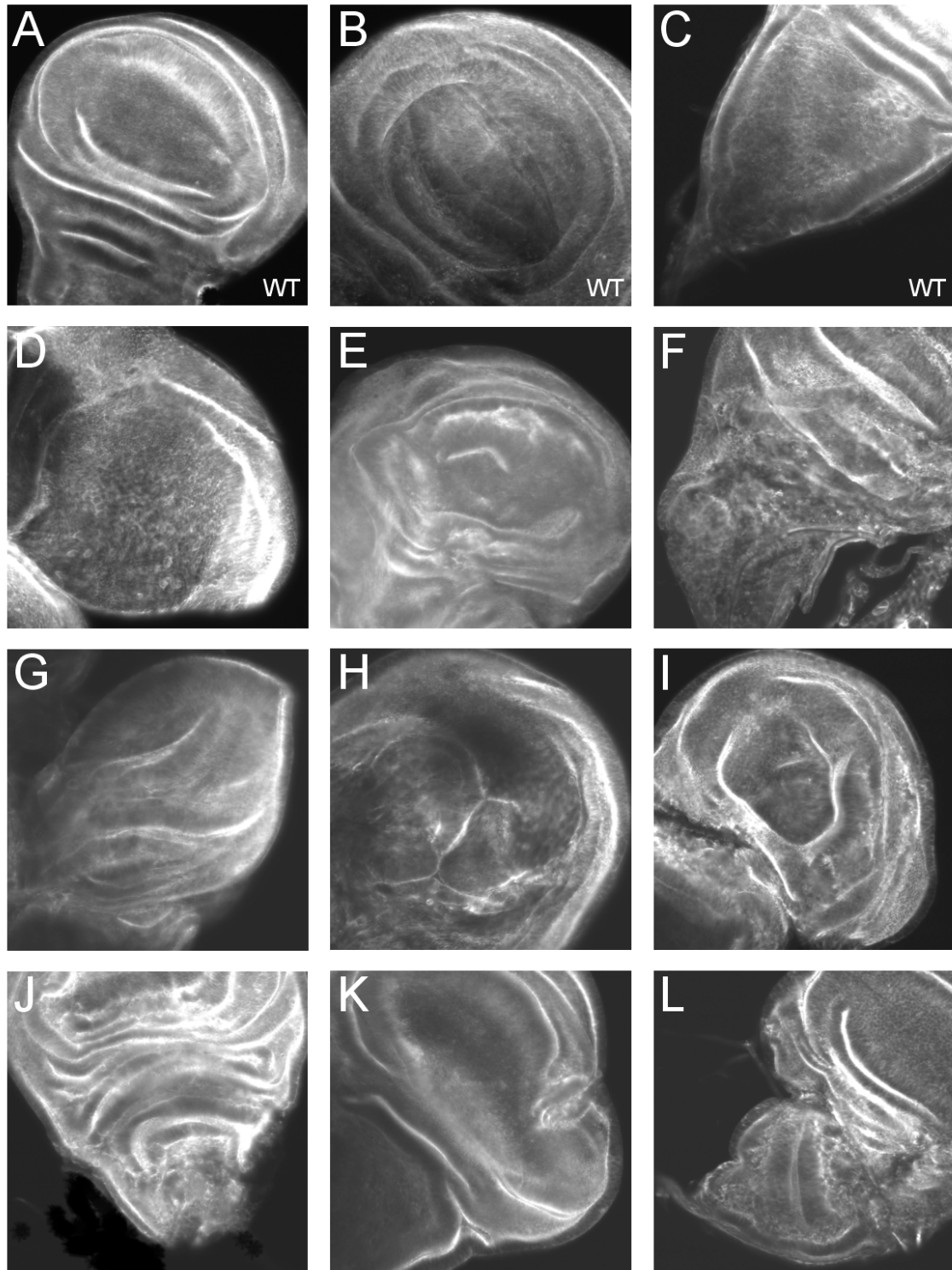


Abb. 15 Klone, die für die Mutation *l(2)k12101* in den Flügelimaginalscheiben induziert wurden (24-48h AEL), verursachen abnormale Faltungen und Reduktion ganzer Zellareale. (A-C) zeigen Ausschnitte von Wildtyp Notum-Flügelimaginalscheiben, die für F-Aktin gefärbt wurden, und mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie aufgenommen wurden. (A) und (B) zeigen den Bereich der Imaginalscheibe, der später den Flügel machen wird und (C) zeigt den Notumbereich, der später eine Hälfte des Thorax machen wird. (D-L) zeigen Ausschnitte aus Notum-Flügelimaginalscheiben, in denen spaghetti-mutierte Klone induziert wurden. Deutlich können Faltungsprobleme, bzw. der Verlust ganzer Areale von Zellen beobachtet werden (Erklärung im Text, siehe auch Filme im Anhang).

Die Abbildung 15A und B zeigen konfokale Aufnahmen von Wildtyp-Flügelimaginalscheiben, welche für F-Aktin (mit Phalloidin-Alexa488) gefärbt wurden, Abb. 15C zeigt den Notumbereich einer Wildtyp-Notum-Flügelimaginalscheibe. Von diesen und den folgenden Imaginalscheiben der Mosaiken (Abb. 15D-L) wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops Schnittstapel aufgenommen, mit einer Dicke von je 3µm. Diese Schnittstapel können mit Hilfe des "Microsoft Powerpoint"-Programms als Präsentation in Form kleiner Filme betrachtet werden (Anhang auf CD). Es wurde jeweils eine repräsentative Ebene für die Abbildung 15 ausgewählt. Es kann deutlich die abnormale Faltung in den Mosaiken (Abb. 15E, F, G, H, I und K) sowie der Verlust von Gewebe (Abb. 15D, G, I, J und L) beobachtet werden.

Spät induzierte spaghetti-mutierte Klone zeigen kaum noch Defekte in den Imaginalscheiben

Um die *spaghetti*-mutierten Klone sichtbar zu machen, wurden Imaginalscheiben von Tieren mit genetischen Mosaiken für das Spaghetti-Protein (mit polyklonalem Antikörper) und für F-Aktin (Phalloidin-Alexa488) gefärbt. Da die Klone defizient für das *spaghetti*-Gen sein sollten, werden diese Klone (Genotyp: *spag-/spag-*) nicht gefärbt sein, das umliegende, für die Mutation heterozygote (Genotyp: *spag-/+*) Gewebe, wie auch das Wildtypgewebe (Genotyp: *+/+*) wird hingegen gefärbt werden.

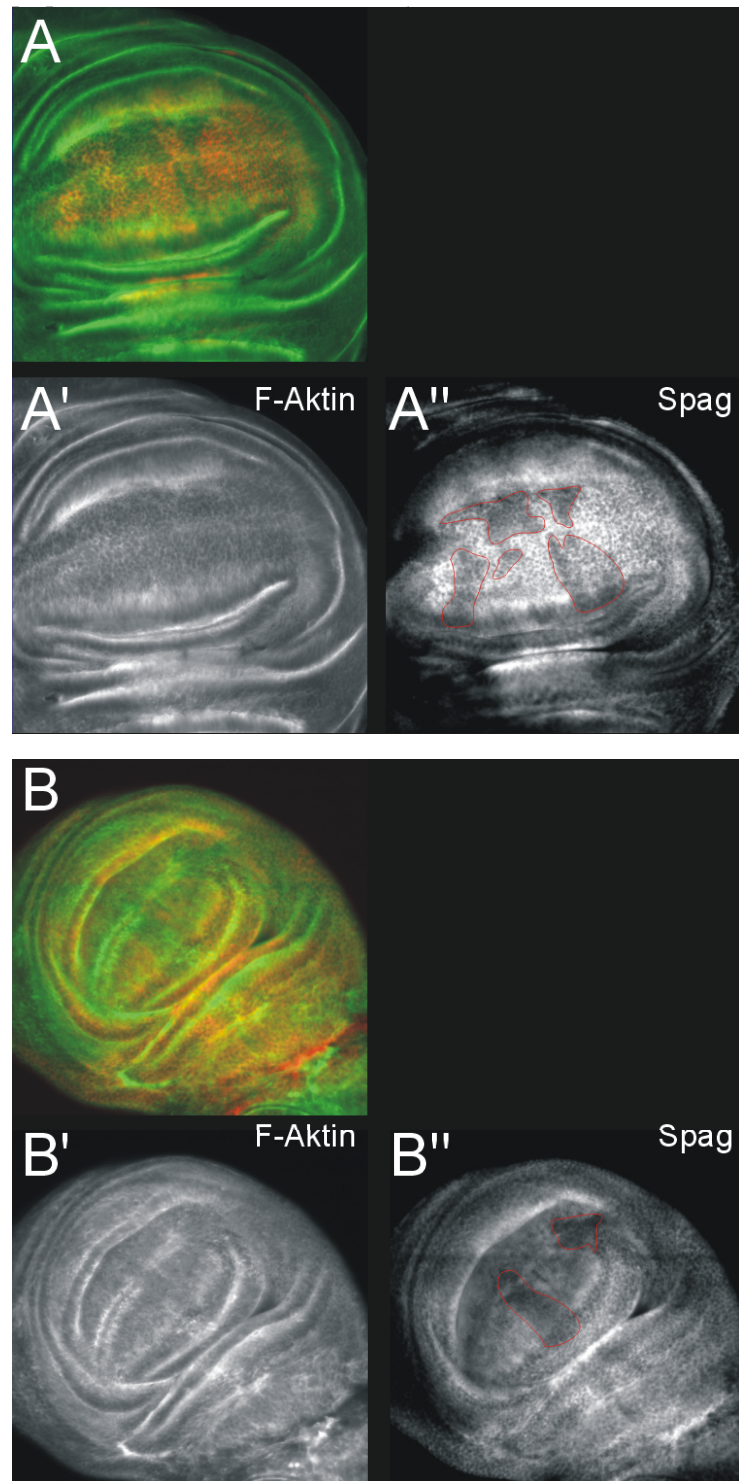


Abb. 16 Spät induzierte Klone für die Mutation *l(2)k12101* in den Flügelimaginalscheiben zeigen kaum einen Effekt. (A-A'') und (B-B'') zeigen zwei Flügelimaginalscheiben, in denen spät (72h-96h AEL) spaghetti-mutierte Klone induziert wurden. Die Imaginalscheiben wurden für das Spaghetti-Protein (rot, A'' und B'') und F-Aktin (grün, A' und B') gefärbt, und mit Hilfe einer konfokalen Laserscanning-Mikroskops aufgenommen. Die Klone, sind die nicht gefärbten Bereiche in den Imaginalscheiben (mit roter Umrandung hervorgehoben). Im Gegensatz zu den früh induzierten spaghetti-mutierten Klonen kann hier kaum ein Defekt beobachtet werden (weitere Erläuterungen im Text).

Abbildung 16A zeigt Imaginalscheiben, in denen spät (72-96h AEL) *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden. Diese Imaginalscheiben wurden für das Spaghetti-Protein (rot) und F-Aktin (grün) gefärbt und mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops aufgenommen. Abbildung 16A' zeigt die Färbung für F-Aktin separat und Abb. 16A'' zeigt die Färbung für das Spaghetti-Protein separat. Die Klone präsentieren sich als trapezförmige, ungefärbte Strukturen, die besonders gut im Zentralbereich der Flügelimaginalscheibe zu sehen sind (rote Umrandung). Im Gegensatz zu den vorher gezeigten Abbildungen der früh induzierten Klone, können keine signifikanten Faltungsstörungen erkannt werden. Abb. 16B-B'' zeigen eine weitere Imaginalscheibe, in der leichte Faltungsprobleme im Bereich der Klone beobachtet werden können.

Es muss erwähnt werden, dass es niemals möglich war, *spaghetti*-mutierte Klone in früh induzierten Mosaiken in den Imaginalscheiben zu finden. Es war immer eine Färbung für das Spaghetti-Protein vorhanden, obwohl diese Imaginalscheiben stark verkleinert und deformiert waren; was darauf schließen lässt, dass früh induzierte *spaghetti*-mutierte Klone schlichtweg abwesend sind. Es kann weiterhin, im Einklang mit den Färbungen der homozygoten *l(2)k12101*-Larven für apoptotische Vorgänge, davon ausgegangen werden, dass die Abwesenheit der Klone durch apoptotische Vorgänge verursacht wird, da niemals Zelltrümmer oder nekrotische Strukturen, wie sie in den genetischen Mosaiken für das Gen *l(2)gl* zu sehen sind, sichtbar waren.

Die Kernaktivität ist in den Arealen, in denen sich vormals spaghetti-mutierte Klone befanden, stark erhöht

In einer Arbeit von Milan *et al.*, 1997, wurde das folgende Phänomen beschrieben: Nach Induktion von Zelltod mit Hilfe ektopischer Expression eines "Killer"-Gens (*hid*, *head involution defect*), konnte eine starke Zunahme der DNA-Syntheserate festgestellt werden. Vermutlich führt der Verlust der Kontakt-Inhibition der apoptotischen Nachbarzellen zur erhöhten DNA-Synthese. Dieser Effekt konnte auch in den Mosaik-Imaginalscheiben, in denen früh *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden, beobachtet werden. Abbildung 17 zeigt konfokale Laserscanning-Aufnahmen dieser Imaginalscheiben.

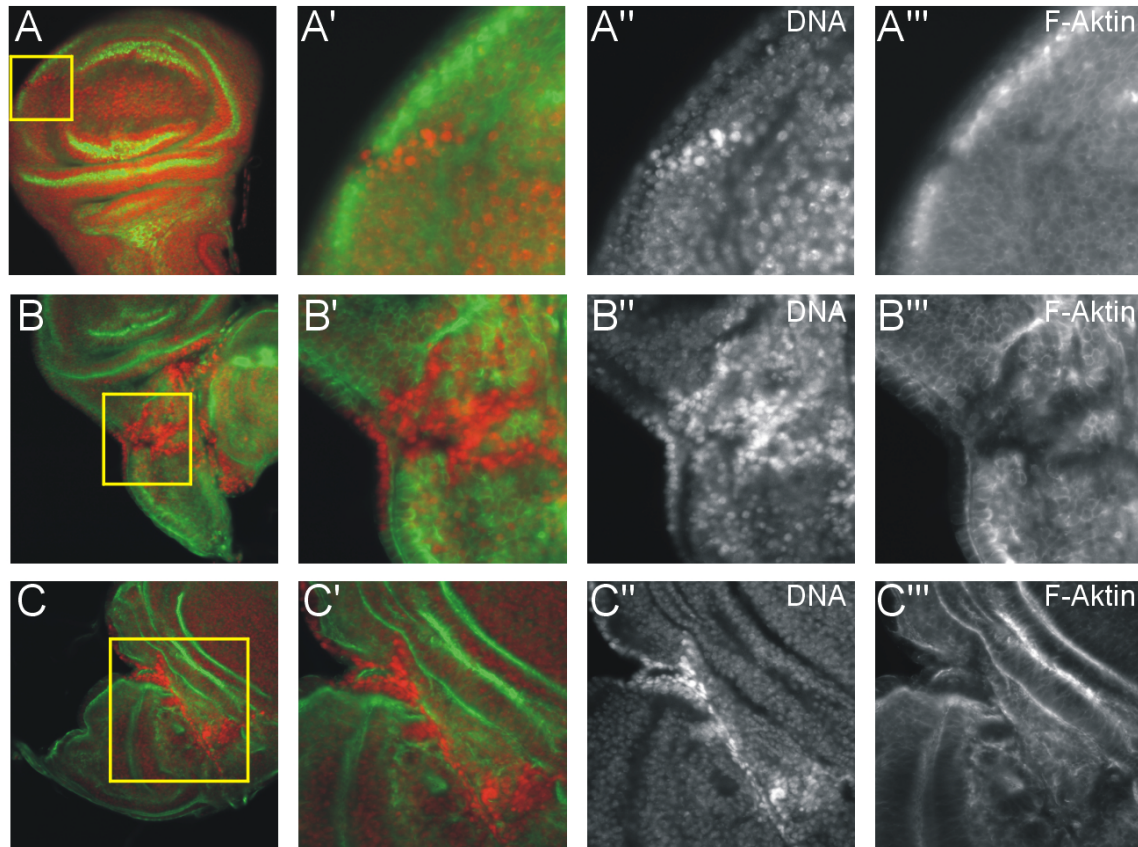


Abb. 17 Früh induzierte Klone für die Mutation *l(2)k12101* in den Flügelimaginalscheiben verursachen eine verstärkte Kernaktivität. (A-C) zeigen Notum-Flügelimaginalscheiben, in denen früh (24-48h AEL) spaghetti-mutierte Klone induziert wurden. (A'-C') sind Vergrößerungen von (A-C). Die Imaginalscheiben wurden für F-Aktin (grün) und DNA (rot) gefärbt und mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. (A''-C'') zeigt die DNA in einem separaten Kanal und (A'''-C''') zeigt F-Aktin in einem separaten Kanal. Es kann gezeigt werden, dass in den Bereichen, in denen (A'''-C''') Faltungsprobleme vorliegen, die (A''-C'') Kernaktivität stark erhöht ist (weitere Erläuterungen im Text).

Die Abbildungen 17A-C zeigen Übersichten der mit Propidiumjodid (für DNA) und Phalloidin-Alexa488 (für F-Aktin) gefärbten Imaginalscheiben, in denen *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden. Die Bereiche der jeweiligen Vergrößerungen (A'-C'') sind in den Übersichten als gelbe Rechtecke markiert. Abb. 17A'-A''' zeigen ein Faltungsproblem (A'''), in dem die Kernfärbung (A'') verstärkt ist (Abb. 17A' zeigt beide Färbungen zugleich). Abb. 17B'-B''' zeigen ein großes Areal, in dem ganze Zellkomplexe (B''') keine F-Aktin Färbung zeigen. Auch hier kann eine deutlich stärkere Kernfärbung beobachtet werden. Der gleiche Effekt ist in Abb. 17C'-C''' zu sehen. Diese Beobachtungen können auch durch Histon3-Färbungen der Imaginalscheiben, in denen *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden, bestätigt werden (Abb. 18).

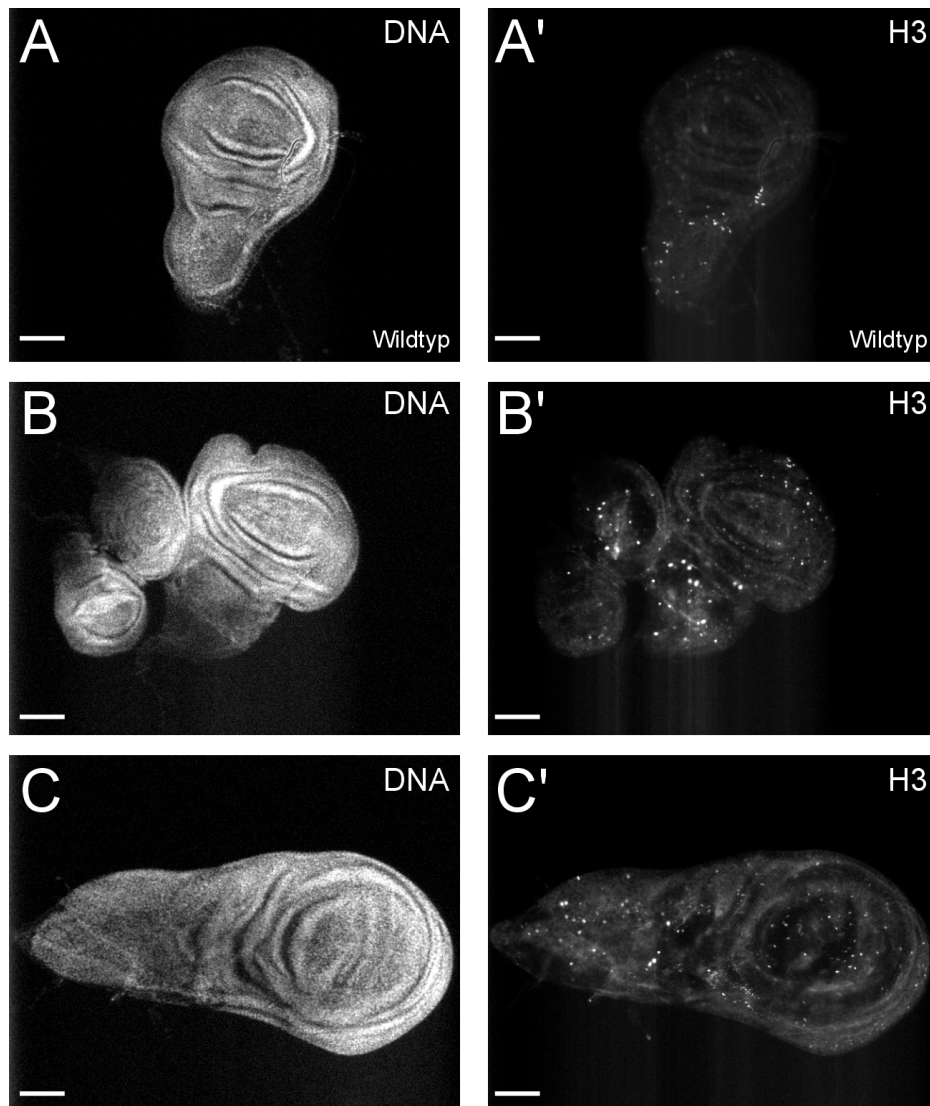


Abb. 18 Früh induzierte Klone für die Mutation *l(2)k12101* in den Flügelimaginalscheiben verursachen eine verstärkte Kernaktivität. (A-A') zeigt eine Notum-Flügelimaginalscheiben, in denen früh (24-48h AEL) *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden. Die Imaginalscheiben wurden für DNA und Phospho-Histon3 (Mitosemarker) gefärbt und mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops analysiert. Es kann eine leicht erhöhte Anzahl mitotischer Zellen in den Imaginalscheiben beobachtet werden, in denen *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden (weitere Erläuterungen im Text).

Die Abbildungen 18B-C' zeigen Flügelimaginalscheiben, in denen früh (24-48h AEL) *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden. Die Imaginalscheiben wurden für DNA (DAPI) und Phospho-Histon3 (Mitosemarker) gefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Da es sich hierbei um keine konfokale Analyse handelt, können Areale mit erhöhter Kernaktivität, wie in Abb. 17 gezeigt, nicht erkannt werden.) Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 18A') kann eine leicht erhöhte Anzahl mitotischer Zellen beobachtet werden.

Frühe Induktion von spaghetti-mutierten Klonen in den Imaginalscheiben von genetischen Mosaiken führen zu einer falschen Platzierung des Wingless-Proteins

Um zu demonstrieren, dass der vorher beschrieben massive Verlust von Zellen und die abnormen Faltungen einen negativen Einfluss auf die Platzierung von Morphogenen, wie z.B. dem Wingless-Protein, haben, wurden Imaginalscheiben, in denen früh *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden, mit einem Antikörper gegen das Wingless-Protein gefärbt.

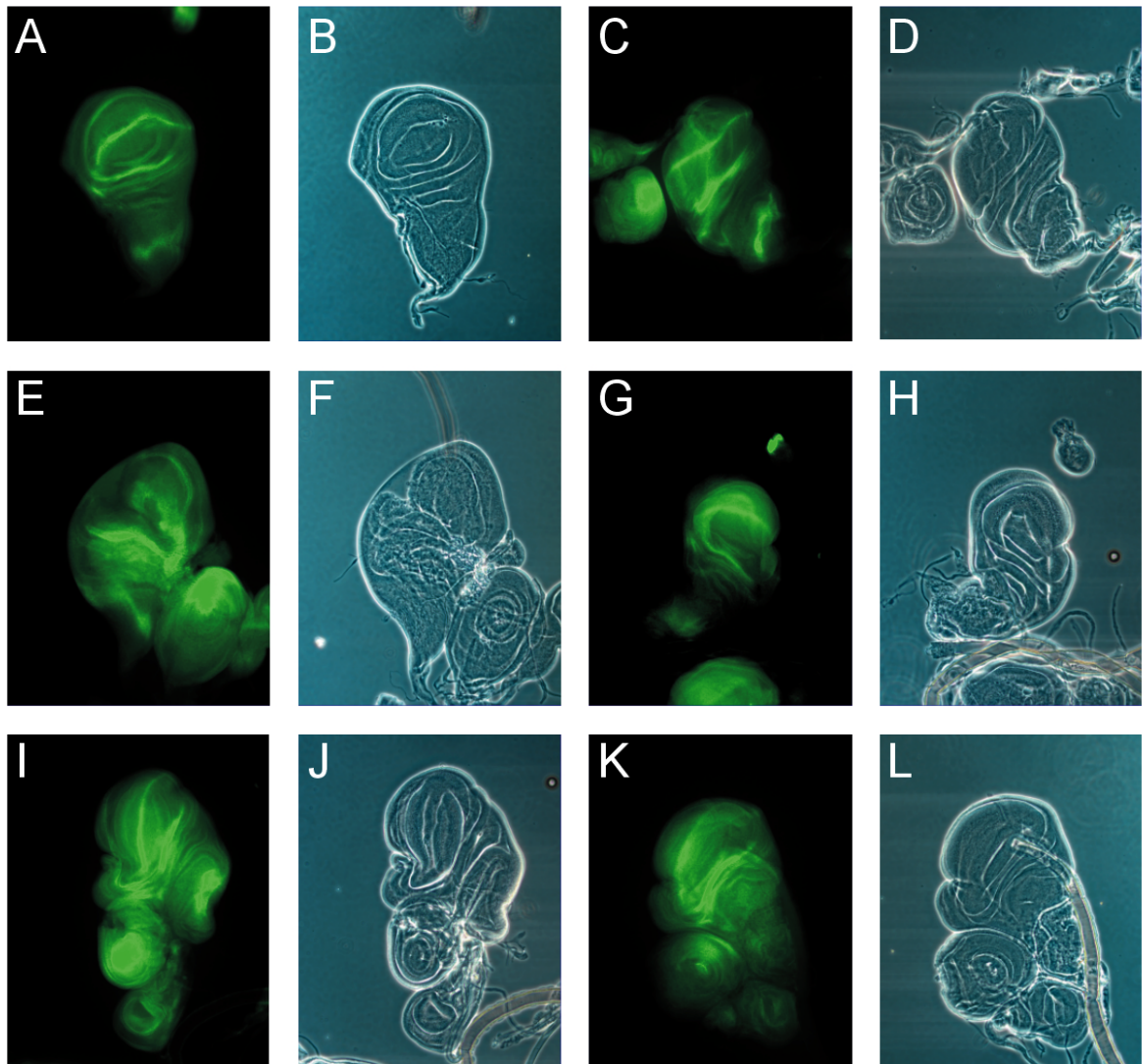


Abb. 19 Früh induzierte Klone für die Mutation *l(2)k12101* in den Flügelimaginalscheiben verursachen eine abnormale Verteilung des Wingless-Proteins. (A) zeigt eine Wildtyp-Notum-Flügelimaginalscheibe, die für das Wingless-Protein gefärbt wurde und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie fotografiert wurde. (B) zeigt dieselbe Imaginalscheibe im Phasenkontrast. (C, E, G, I, K) zeigen Notum-Flügelimaginalscheiben, in denen früh (24-48h AEL) *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden. Das typische „theta“-artige Färbungsmuster des Wingless-Proteins ist gestört. (D, F, H, J, L) zeigen dieselben Imaginalscheiben im Phasenkontrast, um die abnormen Faltungen zu demonstrieren (weitere Erläuterungen im Text).

Abbildung 19A zeigt eine Immunfluoreszenz-Aufnahme des normalen „theta“-artigen Färbungsmusters für das Wingless-Protein in Wildtyp-Notum-Flügelimaginalscheiben (B zeigt

eine Phasenkontrastaufnahme derselben Imaginalscheibe). Die Abbildungen 19C-L zeigen deutlich das veränderte Muster der Wingless-Färbung in den genetischen Mosaiken. Ebenso können auch hier die abnormalen Faltungen erkannt werden.

Die vorangegangenen Versuche zeigen, dass früh induzierte *spaghetti*-mutierte Klone nicht nachweisbar sind, jedoch große Abnormalien in den Imaginalscheiben verursachen. Spät induzierte Klone hingegen können nachgewiesen werden, verursachen jedoch keine auffälligen Defekte mehr. Der Grund für das Fehlen der früh induzierten Klone könnte durch apoptotische Vorgänge erklärt werden. Der Organismus versucht anschließend den Schaden durch verstärkte Zellteilungen zu kompensieren, kann diesen jedoch nicht vollständig beheben. Daher kann auch die hohe Letalität der Imagos erklärt werden, in denen sehr früh *spaghetti*-mutierte Klone induziert wurden.

Die Suche nach dem Spaghetti-Protein homologen Proteinen

Das Spaghetti-Protein besitzt eine TPR-Domäne, die aus drei hochkonservierten TPR-Motiven besteht

Die Aminosäuresequenz des Spaghetti-Proteins zeigt eine konservierte Domäne, die sogenannte *Tetratricopeptid-repeat-* (TPR-, *Tetratrico*; griech. 34) Domäne. TPR-Domänen bestehen aus drei oder mehr hochkonservierten TPR-Motiven zu je 34 Aminosäuren (Lamb *et al.*, 1995). Es wurde für das TPR-Protein Hop gezeigt, dass diese TPR-Domänen verantwortlich für die Bindung dieses Proteins an die Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 sind. Hop besitzt neun TPR-Motive, die zwei funktionelle TPR-Domänen bilden. Die N-terminale Domäne ist hierbei für die Bindung des Hsp70-Proteins verantwortlich, was durch Deletions-Analysen dieser Domäne bewiesen wurde (Chen *et al.*, 1996). Die C-terminale TPR-Domäne, die aus sechs TPR-Motiven besteht, hingegen ist für die Bindung des Hsp90-Proteins verantwortlich. Diese TPR-Domäne bindet hierbei an eine bestimmte Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich des Hsp90-Proteins, einem konservierten EEVD-Motiv (Chen *et al.*, 1998). Es ist weiterhin bekannt, dass diese C-terminale Region des Hsp90-Proteins mit einer Reihe anderer TPR-Proteine, wie z.B. den Immunophilinen Cyp-40, FKBP51, FKBP52 und der Serin-Threonin-Phosphatase5, binden kann (Pratt *et al.*, 1997). Proteinvergleichsstudien zeigen jedoch auch, dass die Konservierung dieser Domäne nicht strengen Regeln folgt, es werden hauptsächlich kleine, hydrophobe Aminosäuren innerhalb dieser Domänen gefunden (Lamb *et al.*, 1995). Aufgrund des Vorkommens der TPR-Domäne im Spaghetti-Protein, sowie der Tatsache, dass das Spaghetti-Protein mit dem Hsp90-Protein im *yeast two-hybrid* System interagiert (Marhold, 1998, Diplomarbeit), wurde mit der Aminosäuresequenz des 534 Aminosäuren langen Spaghetti-Proteins eine Datenbanksuche durchgeführt. Abbildung 20 zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse dieser Suche.

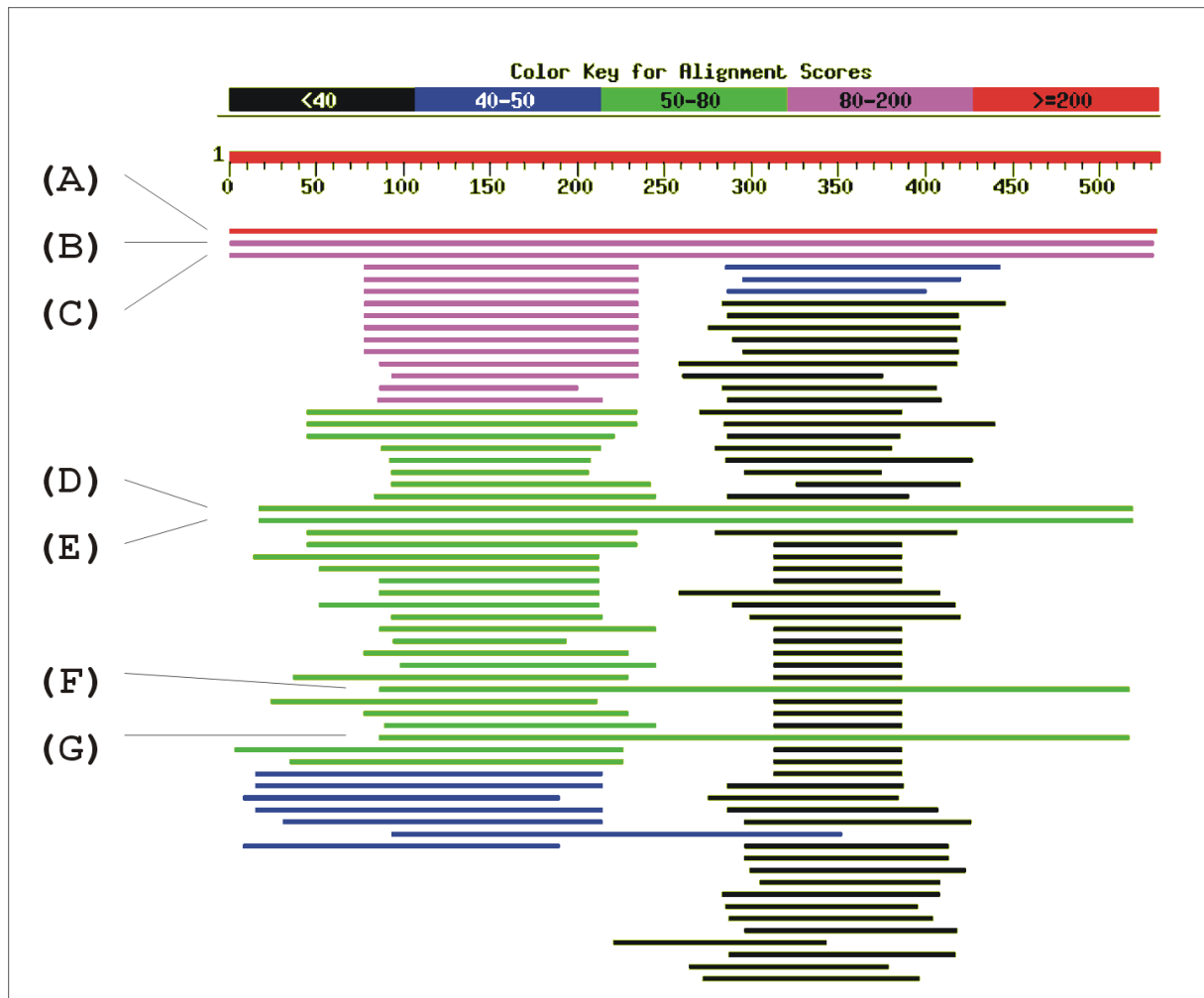


Abb. 20 Die Aminosäuresequenz des Spaghetti-Proteins (A) zeigt Sequenzübereinstimmungen zu zwei (B und C) Proteinen, deren Funktion noch unbekannt ist, sowie zu vier (D-G) Proteinen die an der Spermatogenese beteiligt sind. (B) hypothetical protein FLJ21908 (*Homo sapiens*). (C) RIKEN cDNA-Gen (*Mus musculus*). (D) sperm associated antigen 1 (*Homo sapiens*). (E) sperm associated antigen 1 (*Homo sapiens*). (F) sperm associated antigen 1 (*Mus musculus*). (G) TPR-containing protein involved in spermatogenesis TPIS (*Mus musculus*) (Erläuterung im Text).

Die Farben in dieser Abbildung stellen den Grad der Sequenzübereinstimmung bzw. der Identität der Aminosäuren dar: (Rot) identisches Protein; (Magenta) hohe Sequenzübereinstimmung; (Grün) signifikante Sequenzübereinstimmung, (Blau) geringe Sequenzübereinstimmung, (Schwarz) keine signifikante Sequenzübereinstimmung. In der Abbildung wurden die Proteine mittels eines Buchstabens hervorgehoben, die auch außerhalb der konservierten TPR-Domäne eine Sequenzübereinstimmung aufweisen (Siehe hierzu auch Abbildung 21).

BLASTP 2.1.2 [Nov-13-2000]

Database: nr

663,889 sequences; 209,105,469 total letters

Query= Spaghetti- Protein
(534 letters)

significant alignments:	(bits)	Value	Score	Seque
(A) gi 7242524 emb CAB64598.2 (AJ252086) spaghetti [Drosophila...			899	0.0
(B) gi 13375809 ref NP_078880.1 hypothetical protein FLJ21908 ...			107	5e-22
(C) gi 13386276 ref NP_082279.1 RIKEN cDNA 2310042P20 gene [Mu...			106	7e-22
gi 1122931 gb AAB60384.1 (U25174) serine-threonine phosphatase...			86	8e-16
gi 2135921 pir S52570 phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3...			86	8e-16
gi 5453958 ref NP_006238.1 protein phosphatase 5, catalyti...			86	8e-16
gi 897761 emb CAA61595.1 (X89416) protein phosphatase 5 [H...			86	8e-16
gi 12653913 gb AAH00750.1 AAH00750 (BC000750) Unknown (prot...			86	8e-16
gi 1083755 pir A55346 phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3...			86	8e-16
gi 1709745 sp P53042 PPP5 RAT SERINE/THREONINE PROTEIN PHOS...			86	9e-16
gi 2407637 gb AAB70573.1 (AF018262) protein phosphatase 5;...			86	1e-15
gi 3212250 pdb 1A17 Tetratricopeptide Repeats Of Protei...			86	2e-15
gi 1663530 gb AAB18614.1 (U12203) phosphoprotein phosphata...			84	3e-15
gi 2499735 sp Q60676 PPP5 MOUSE SERINE/THREONINE PROTEIN PH...			84	4e-15
gi 2407639 gb AAB70574.1 (AF018263) protein phosphatase 5;...			83	9e-15
gi 12742315 ref XP_009521.2 translocase of outer mitochondr...			80	6e-14
gi 7671655 emb CAB89422.1 (AL109839) dJ1069P2.2 (outer mit...			80	7e-14
gi 5803205 ref NP_006800.1 translocase of outer mitochondr...			79	1e-13
gi 7453538 gb AAF62870.1 AF179282_1 (AF179282) Toc64 [Pisum...			77	6e-13
gi 7299242 gb AAF54438.1 (AE003684) PpD3 gene product [Dro...			76	1e-12
gi 9294499 dbj BAB02718.1 (AB019230) gb AAB70409.1-gene_id...			75	2e-12
gi 11359775 pir T45058 hypothetical protein Y39B6B.ff [imp...			74	6e-12
gi 13435705 gb AAH04717.1 AAH04717 (BC004717) Unknown (prot...			73	9e-12
(D) gi 12734290 ref XP_011690.1 sperm associated antigen 1 [Ho...			73	1e-11
(E) gi 11024639 ref NP_003105.1 sperm associated antigen 1 [Ho...			72	2e-11
gi 12857073 dbj BAB30882.1 (AK017699) putative [Mus musculus]			71	2e-11
gi 13385500 ref NP_080272.1 RIKEN cDNA 2610100K07 gene [Mu...			71	3e-11
gi 12323021 gb AAG51498.1 AC058785_1 (AC058785) hypotetica...			71	3e-11
gi 7296220 gb AAF51511.1 (AE003590) Hop gene product [Dros...			69	1e-10
gi 6321562 ref NP_011639.1 serine/threonine phosphatase; P...			69	1e-10
gi 897806 emb CAA61596.1 (X89417) protein phosphatase T [S...			69	1e-10
gi 3037137 gb AAC12945.1 (AF056198) Hsp70/Hsp90 organizing...			68	2e-10
gi 11359699 pir T46576 serine/threonine protein phosphatas...			68	3e-10
gi 7662673 ref NP_055635.1 translocase of outer mitochondr...			67	4e-10
gi 12248771 dbj BAB20273.1 (AB014736) SMAP-1b [Homo sapiens]			67	5e-10
gi 13277936 gb AAH03836.1 AAH03836 (BC003836) Unknown (prot...			67	6e-10
gi 13472042 ref NP_103609.1 hypothetical protein [Mesorhiz...			67	7e-10
gi 12248757 dbj BAB20266.1 (AB014729) SMAP-1 [Homo sapiens]			66	7e-10
gi 12848607 dbj BAB28018.1 (AK012084) putative [Mus musculus]			66	8e-10
gi 6753882 ref NP_034349.1 FK506 binding protein 4 (59 kDa...			66	1e-09
gi 13097417 gb AAH03447.1 AAH03447 (BC003447) FK506 binding...			66	1e-09
gi 2407970 emb CAA75047.1 (Y14750) TOM70 [Podospora anserina]			65	2e-09
gi 1708135 sp P30416 FKB4 MOUSE P59 PROTEIN (HSP BINDING IM...			65	2e-09
gi 110056 pir S14538 transition protein - mouse >gi 54876 ...			65	2e-09
gi 110055 pir S14529 transition protein 2 - mouse >gi 5487...			65	2e-09
gi 12804261 gb AAH02989.1 AAH02989 (BC002989) Unknown (prot...			64	5e-09
gi 12741709 ref XP_009137.2 small glutamine-rich tetratric...			64	5e-09
gi 4506921 ref NP_003012.1 small glutamine-rich tetratric...			64	5e-09
gi 7512934 pir T08782 hypothetical protein DKFZp586N1020.1...			64	5e-09
gi 12804069 gb AAH02887.1 AAH02887 (BC002887) Similar to FK...			64	5e-09
gi 4503729 ref NP_002005.1 FK506-binding protein 4 (59kD) ...			64	5e-09
(F) gi 67555616 ref NP_036161.1 sperm associated antigen 1; TPR...			64	6e-09
gi 478009 pir C48583 stress-inducible protein STI1 homolog...			63	6e-09
gi 7493391 pir T40391 serine/threonine protein phosphatase...			63	8e-09
gi 12855300 dbj BAB30284.1 (AK016522) putative [Mus musculus]			63	8e-09
gi 6324580 ref NP_014649.1 small glutamine-rich tetratric...			63	8e-09
gi 5295966 dbj BAA81867.1 (AB026295) Similar to Glycine ma...			63	9e-09
gi 12083667 ref NP_073194.1 small glutamine-rich tetratric...			63	9e-09
gi 8923505 ref NP_060338.1 hypothetical protein FLJ20535 [...			63	1e-08
gi 10436007 dbj BAB14725.1 (AK023921) unnamed protein prod...			63	1e-08
gi 12736618 ref XP_006333.2 hypothetical protein FLJ20535 ...			63	1e-08
gi 7506306 pir T16689 hypothetical protein R05F9.10 - Caen...			63	1e-08
gi 4512673 gb AAD21727.1 (AC006931) putative phosphoprotei...			62	1e-08
gi 7511685 pir T32493 unc-45 protein - Caenorhabditis eleg...			61	2e-08
gi 7298982 gb AAF54185.1 (AE003677) CG2708 gene product [D...			61	3e-08
gi 122768 sp P27124 FKB4 RABIT P59 PROTEIN (HSP BINDING IMM...			61	3e-08
gi 7506528 pir T03899 hypothetical protein R09E12.3 - Caen...			61	3e-08
(G) gi 6272682 gb AAF06161.1 AF181253_1 (AF181253) TPR-containi...			61	4e-08

Abb. 21 Fortsetzung von Abbildung 20.

Die TPR-Domäne des Spaghetti-Proteins befindet sich zwischen den Aminosäure-Positionen 96 bis 197, was das Auftreten der meisten „Treffer“ in diesen Bereich erklärt. Da dieser Bereich hochkonserviert ist, muss nach Proteinen gesucht werden, die auch außerhalb dieser Domäne eine Homologie mit dem Spaghetti-Protein zeigen, um dessen vermutliche Funktion zu untersuchen. (A) markiert das Spaghetti-Protein selbst (AJ25086) und zeigt deshalb auch völlige Identität. (B) markiert ein hypothetisches menschliches Protein (NP_078880) mit einer Länge von 665 Aminosäuren (siehe hierzu Abbildung 22). (C) markiert das Produkt des *RIKEN*-Gens der Maus mit einer Länge von 660 Aminosäuren (siehe Abbildung 23). (D) markiert das menschliche *sperm associated antigen1*-Protein (XP_011690) mit einer Länge von 911 Aminosäuren (siehe Abbildung 24). (E) markiert ein weiteres menschliches Protein, das *sperm associated antigen-1*-Protein (NP_003105) mit einer Länge von 926 Aminosäuren (siehe Abbildung 25). (F) markiert ein *sperm associated antigen1*-Protein der Maus (NP_036161) mit einer Länge von 901 Aminosäuren (siehe Abbildung 26) und (G) markiert ein weiteres Protein der Maus, das *TPR-containing protein involved in spermatogenesis* TPIS (AF181253) mit einer Länge von 529 Aminosäuren (siehe Abbildung 27).

Ein multipler Vergleich der oben genannten Proteine mit Hilfe des *pyle-up*-Programms (HUSAR) zeigt eine über lange Strecken der Aminosäuresequenzen verlaufende Sequenzübereinstimmung, wie in den Abbildungen 28 und 29 zu sehen ist. „Blaue Aminosäuren“ kennzeichnen die in allen sieben Proteinen identischen Aminosäuren, rot markierte Aminosäuren sind funktionell gleiche Aminosäuren, die orangemarkierten Aminosäuren sind funktionell ähnliche Aminosäuren. Wie zu erwarten befindet sich die höchste Identität innerhalb der TPR-Domäne, jedoch auch teilweise außerhalb dieser Domäne. Die Abbildung 30A zeigt in einer grafischen Darstellung, welche Bereiche der Proteine Spaghetti (*sequence* 1: gi7242524) und FLJ21908 (*sequence* 2: gi13375809) zueinander homolog sind. Anhand der Grafik kann erkannt werden, dass sich die Sequenzübereinstimmung über die gesamte Länge der Proteine erstreckt. Von insgesamt 671 Aminosäuren (dies entspricht der Gesamtlänge der miteinander "verpaarten" beiden Proteine mit kleiner Überlappung) konnte das *NCBI-Blast-2* Sequenz- zu Sequenz-Vergleichsprogramm (Version 2.1.2) 163 identische Aminosäuren (24%) sowie 268 positive (funktionell gleiche) Aminosäuren (39%) identifizieren. Der Vergleich der Sequenzen des Spaghetti-Proteins (*sequence* 1: gi7242524) und des *RIKEN*-Proteins (*sequence* 1: gi7242524), wie in Abbildung 30B zu sehen ist, ergab folgende Werte: Identität: 165 von 665 (24%), Positive 264 von 665 (38%). Der Vergleich des Spaghetti-Proteins mit dem menschlichen *sperm associated antigen 1* (gi12734290), dargestellt in Abbildung 30C, zeigt hohe Homologien nur im Bereich der TPR-Domäne: Identität: 43 von 122 (35%), Positive 67 von 122 (54%); Abbildung 31D, das *sperm associated*

protein antigen 1 der Maus (gi6755616) zeigt hingegen auch außerhalb der TPR-Domäne Homologie: Identität: 97 von 465 (20%), Positive: 170 von 465 (35%) und Abbildung 31E, TPIS der Maus (gi6272682): Identität: 97 von 465 (20%), Positive: 170 von 465 (35%).

(B) :

```

LOCUS       NP_078880        665 aa                        PRI      18-MAR-2001
DEFINITION  hypothetical protein FLJ21908 [Homo sapiens].
ACCESSION   NP_078880
PID         g13375809
VERSION     NP_078880.1   GI:13375809
DBSOURCE    REFSEQ: accession NM_024604.1
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM   Homo sapiens
              Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
              Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..665
                       /organism="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:9606"
                       /clone="HEP03830"
                       /cell_line="HepG2"
                       /cell_type="hepatoma"
                       /clone_lib="HEP"
                       /note="cloning vector pME18SFL3"
     Protein           1..665
                       /product="hypothetical protein FLJ21908"
     Region            133..166
                       /region_name="Tetratricopeptide repeats"
                       /db_xref="CDD:TPR"
                       /note="TPR"
     Region            133..166
                       /region_name="TPR Domain"
                       /db_xref="CDD:pfam00515"
                       /note="TPR"
     Region            202..234
                       /region_name="TPR Domain"
                       /db_xref="CDD:pfam00515"
                       /note="TPR"
     Region            202..234
                       /region_name="Tetratricopeptide repeats"
                       /db_xref="CDD:TPR"
                       /note="TPR"
     CDS               1..665
                       /gene="FLJ21908"
                       /db_xref="LocusID:79657"
                       /coded_by="NM_024604.1:47..2044"

ORIGIN
   1  MTSANKAIEL QIQVKQNAEE LQDFMRDLN WEKDIKQKDM ELRRQNGVPE ENLPPIRNGN
  61  FRKKKKGKAK ESSKKTREEN TKNRIKSYDY EAWAKLDVDR ILDELKDIDS THESLSQSE
 121 SEEDGIHVDS QKALVLKEKG NKYFKQGGYD EADICYTKGM DADPYNPVLV TNRASAYFRL
 181 KKFVAESDC  NLAVLNRSY TKAYSRRGAA RFALQKLEEA KKDYERVLEL EPNNEFATNE
 241 LRKISQALAS KENSYPKEAD IVIKSTEGE KQIEAQGNKQ QAISEKDRGN GFFKEGKYER
 301 AIECYTRGIA ADGANALLPA NRAMAYLKI QYEEAEKDC TQAILLDGSYS KAFARRGTAR
 361 TFLGKINEAK QDFETVLLLE PGNKQAVTEL SKIKKELIEK GHWDVFLDS TQRQNVVKPI
 421 DNPPHPGSTK PLKKVIIET GNLIQTI DVP DSTAAAPEN NPINLANVIA ATGTTSKNS
 481 SQDVLFPSTD TPRAKVLKIE EVSDTSSLQ QASLKQDVQC SYSEKMPIEI EQKPAQFATT
 541 VLPPIPANSE QLESDFRQLK SSPDMLYQL KQIEPSLYPK LFQKNLDPDV FNQIVKILHD
 601 FYIEKEKPLL IFEILQRLSE LKRFDMAVMF MSETEKKIAR ALFNHIDKSG LKSSSVEELK
 661 KRYGG

```

Abb. 22 Die Aminosäuresequenz des hypothetischen menschlichen Proteins FLJ21908 (Erläuterung im Text).

(C) :

```

LOCUS      NP_082279      660 aa      ROD      20-MAR-2001
DEFINITION RIKEN cDNA 2310042P20 gene [Mus musculus].
ACCESSION  NP_082279
PID        g13386276
VERSION    NP_082279.1  GI:13386276
DBSOURCE   REFSEQ: accession NM_028003.1
KEYWORDS   .
SOURCE     house mouse.
ORGANISM   Mus musculus
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..660
                       /organism="Mus musculus"
                       /strain="C57BL/6J"
                       /db_xref="taxon:10090"
                       /clone="2310042P20"
                       /sex="male"
                       /tissue_type="tongue"
                       /clone_lib="RIKEN full-length enriched mouse cDNA"
     library"
     Protein          1..660
                       /product="RIKEN cDNA 2310042P20 gene"
     Region            134..167
                       /region_name="TPR Domain"
                       /db_xref="CDD:pfam00515"
                       /note="TPR"
     Region            134..167
                       /region_name="Tetratricopeptide repeats"
                       /db_xref="CDD:TPR"
                       /note="TPR"
     Region            203..235
                       /region_name="TPR Domain"
                       /db_xref="CDD:pfam00515"
                       /note="TPR"
     Region            203..235
                       /region_name="Tetratricopeptide repeats"
                       /db_xref="CDD:TPR"
                       /note="TPR"
     Region            284..317
                       /region_name="Tetratricopeptide repeats"
                       /db_xref="CDD:TPR"
                       /note="TPR"
     CDS               1..660
                       /gene="2310042P20Rik"
                       /db_xref="LocusID:71919"
                       /db_xref="MGD:MG1:1919169"
                       /coded_by="NM_028003.1:90..2072"

ORIGIN
1  MTSASKAVEL QLQVKHNAEE LQDFMRDLEH WEKDMKEKDL ELRRQGGVAE ENLPPIRNGN
61  FRKKKKKGKA KESSRRTKEE NTKNRIKSYD YDAMAKLDVD RILDELKDKE STHDSLSQES
121  ESDEDGIRVD SQKALVLKEK GNKYFKQGGY DEAI ECTYKG MDADPYNPVL PTNRASAYFR
181  LKKFAVAESD CNLAIALSRT YTKAYARRGA ARFALQKLED ARKDYEKVLE LEPDNFEATN
241  ELRKINQALT SKENSGPGAA AAASKPAAG ESKPTGGQGG RQKAIAEKDL GNGFFKEGKY
301  EQAIECYTRG IAADRTNALL PANRAMAYLK IQRYEAEARD CTQAIVLDGS YSKAFARRGT
361  ARTFLGKINE AKQDFETVLL LEPGNKQAAT ELSRIKKELI EKGHWDDVFL DSTQRHHVVK
421  AVDNPPRGSP KALKKVFIEE TGNLIETVDA PDSSATVPES DRATAAVGTG TKKNPSEGVG
481  LPAGDRPRAK VLKIEAVSDT SAPQAQVGVK QDARQPGSEK ASVRAEQMPG QLAAAGLPPV
541  PANSEQLQSD FRQLRSSPEM LYQYVKNI EP SLYPKLFQKN LDPDVFNQII KILHDFYIER
601  EKPALIFEVL ERLSQLRRFD MAVMFMSGPE RKL TNVLFNH LEKSDLKEDS VEELKKRYGG
661

```

Abb. 23 Die Aminosäuresequenz des RIKEN-Proteins der Maus (Erläuterung im Text).

(D) :

LOCUS XP_011690 911 aa PRI 09-FEB-2001
 DEFINITION **sperm associated antigen 1** [Homo sapiens].
 ACCESSION XP_011690
 PID gl2734290
 VERSION XP_011690.1 GI:12734290
 DBSOURCE REFSEQ: accession **XM_011690.1**
 KEYWORDS .
 SOURCE human.
 ORGANISM **Homo sapiens**
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 911)
 AUTHORS NCBI Annotation Project.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-FEB-2001) National Center for Biotechnology
 Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA
 COMMENT GENOME ANNOTATION **REFSEQ**: This reference sequence was derived by
 automated computational analysis of NCBI genomic sequence contig
 NT_008086 using gene prediction method: Acembly.
 Supporting evidence includes similarity to: 15 proteins, 1 mRNAs
 See details in **AceView**
 Method: conceptual translation supplied by author.
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..911
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="8"
 Protein 1..911
 /product="sperm associated antigen 1"
 CDS 1..911
 /gene="SPAG1"
 /db_xref="LocusID:6674"
 /db_xref="MIM:603395"
 /coded_by="TR00076804:1..2736"
 ORIGIN
 1 MTTKDYPPLW GFGTTKTFKI PIEHLDFKYI EKCSDEVKLE KILCVLRSGE EGYYPELTFE
 61 CEKHFQALAP ESRALRKDKP AATAASFTAE EWEKIDGDIK SWVSEIKKEE DKMPFHETET
 121 FPAMKDNLPP VRGSNSCLHV GKEKYSKRPT KKKTPRDYAE WDKFDVEKEC LKIDEDYKEK
 181 TVIDKSHLSK IETRIDTAGL TEKEKDFLAT REKEKGNEAF NSGDYEEAVM YYTRISALP
 241 TVVAYNNRAQ AEIKLQNWNS AFQDCEKVL EPGNVKALL RRATTYKHQN KLREATEDLS
 301 KVLDPVPDND LAKVXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX EPAEPAGAAR
 361 AAQPCVMGNI QKLTGKAE GKRPARGAPQ RGQTPEAGAD KRSPRRASAA AAAGGGATGH
 421 PGGGQGAENP AGLKSQGNEL FRSGQFAEAA GKYSAAIALL EPAGSEIADD LSILYSNRRA
 481 CYLKEGNC SG CIQDCNRAL LHPFSMKPLL RRAMAYETLE QYKAYVDYK TVLQIDCGILQ
 541 LANDSVNRLS RILMELDGNP WREKLSPIPA VPASVPLQAW HPAKEMISKQ AGDSSSHRQQ
 601 GITDEKTFKA LKEEGNQCVN DKNYKDALS YSECLKINNK ECALYTNRAL CYLKLQCFEE
 661 AKQDCDQALQ LADGNVKAFY RRALAHKGLK NYQKSLIDLN KVILLDPSII EAKMELEEV
 721 RLLNLKDKTA PFNKEKERK IEIQEVNEGK BEPGRPAGEV STGCLASEKG GKSSRSPEDP
 781 EKLPIAKPNN AYEFQIINA LSTRKDKEAC AHLLAITAPK DLPMLSNKL EGDFTLLLIQ
 841 SLKNNLIEKD PSLVYQHLLY LSKAERFKMM LTLISKGQKE LIEQLFEDLS DTPNNHFTLE
 901 DIQALKRQYE L

Abb. 24 Die Aminosäuresequenz des menschlichen sperm associated antigen 1-Proteins (Erläuterung im Text).

(E) :

```

LOCUS      NP_003105      926 aa      PRI      14-MAR-2001
DEFINITION sperm associated antigen 1 [Homo sapiens].
ACCESSION  NP_003105
PID        g11024639
VERSION    NP_003105.1  GI:11024639
DBSOURCE   REFSEQ: accession NM_003114.1
KEYWORDS   .
SOURCE     human.
  ORGANISM Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..926
                       /organism="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:9606"
                       /chromosome="8"
                       /map="8q22"
                       /clone="HSD3.8"
                       /tissue_type="testis"
     Protein           1..926
                       /product="sperm associated antigen 1"
     Region            490..518
                       /region_name="TPR Domain"
                       /db_xref="CDD:pfam00515"
                       /note="TPR"
     Region            659..690
                       /region_name="Tetratricopeptide repeats"
                       /db_xref="CDD:TPR"
                       /note="TPR"
     Region            659..686
                       /region_name="TPR Domain"
                       /db_xref="CDD:pfam00515"
                       /note="TPR"
     CDS               1..926
                       /gene="SPAG1"
                       /db_xref="LocusID:6674"
                       /db_xref="MIM:603395"
                       /db_xref="GeneID:SP75"
                       /coded_by="NM_003114.1:1..2781"

ORIGIN
1  MTTKDYPPLW  GFGTTTKFKI  PIEHLDFKYI  EKCSDEVKLE  KILCVLRSGE  EGYYPPELTF
61 CEKHLQALAP  ESRALRKDKP  AATAASFTAE  EWEKIDGDIK  SWVSEIKKEE  DKMHFHETET
121 FPAMKDNLPP  VRGSNSCLHV  GKEKYSKRPT  KKKTPRDYAE  WDKFDVEKEC  LKIDEDYKEK
181 TVIDKSRISK  IETRIDTAGL  TEKEKDFLAT  REKEKGNEAF  NSGDYEEAVM  YYTRISALP
241 TVVAYNNRAQ  AEIKLQNWNS  AFQDCEKYLE  LEPGNVKALL  RRATTYKHQN  KLRATEDLS
301 KVLDPDPDND  LAKKTLSEVE  RDLKNSEAAS  ETQTKGKRMV  IQEISENSED  EGKSGRKHED
361 GGGDKKPAEP  AGAARAAQPC  VMGNIQKKLT  GKAEQGRPA  RGAPQRGQTP  EAGADKRSR
421 RASAAAAAGG  GATGHPGGGQ  GAENPAGLKS  QGNELFRSGQ  FAEAAAGKYS  AIALLEPAGS
481 EIADDLSILY  SNRAACYLKE  GNCSGCIQDC  NRALELHPFS  MKPLLRAMA  YETLEQYGA
541 YVDYKTVLQI  DCGQLQAND  VNRLSRILME  LDGPNWREKL  SPIPAVPASV  PLQAWHPAKE
601 MISKQAGDSS  SHRQGGITDE  KTFKALKEEG  NQCVNDKNYK  DALSKYSECL  KINNTECAIY
661 TNRALCYLKL  CQFEAKQDC  DQALQLADGN  VKAFYRRALA  HKGLKNYQKS  LIDLNKVILL
721 DPSIIEAKME  LEEVTRLLNL  KDKTAPFNKE  KERRKIRIQE  VNEGKEEPGR  PAGEVSTGCL
781 ASEKGGKSSR  SPEDPEKLPI  AKPNNAYEFG  QIINALSTRK  DKEACAHLLA  ITAPKDLPMF
841 LSNKLEGGTF  LLLIQSLKNN  LIEKDPSLVY  QHLLYLSKAE  RFKMMLTLIS  KGQKELIEQL
901 FEDLSDTFNN  HFTLEDIQAL  KRQYEL

```

Abb. 25 Die Aminosäuresequenz des menschlichen sperm associated antigen1-Proteins (Erläuterung im Text).

(F) :

LOCUS NP_036161 901 aa ROD 01-NOV-2000

DEFINITION **sperm associated antigen 1**; TPR-containing protein involved in spermatogenesis [Mus musculus].

ACCESSION NP_036161

PID g6755616

VERSION NP_036161.1 GI:6755616

DBSOURCE REFSEQ: accession [NM_012031.1](#)

KEYWORDS .

SOURCE house mouse.

ORGANISM [Mus musculus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.

FEATURES

source 1..901
/organism="Mus musculus"
/strain="ICR"
/db_xref="taxon:10090"
/chromosome="15"
/map="18.1 cM"
/tissue_type="testis"

Protein 1..901
/product="sperm associated antigen 1"
/note="TPR-containing protein involved in spermatogenesis"

Region 246..279
/region_name="Tetratricopeptide repeats"
/db_xref="CDD:TPR"
/note="TPR"

Region 246..279
/region_name="TPR Domain"
/db_xref="CDD:pfam00515"
/note="TPR"

Region 642..673
/region_name="TPR Domain"
/db_xref="CDD:pfam00515"
/note="TPR"

Region 642..673
/region_name="Tetratricopeptide repeats"
/db_xref="CDD:TPR"
/note="TPR"

CDS 1..901
/gene="Spag1"
/db_xref="LocusID:26942"
/db_xref="MGD:MGI:1349387"
/db_xref="GeneID:tpis"
/coded_by="NM_012031.1:227..2932"

ORIGIN

1 MTAKAKDCPS LWGFGTTKTF KPIEHLDFK YIENCSDVKH LEKILYVLRS GEEGYYPFLT
61 EFCEKCLTNL APKSRLRKD KPAETASSFS AEEWEKIDSD LKSWVSEIKR EENTRHFHDP
121 ENHPGVEDPL PPVRGSTCCP HSGKETYSKS KTAKKRIPRD YAEWDKFDVE KESKIDEDY
181 KEKTVINNK A HLSKIEKIE TAGLTEKEKS FLANKREKKG NEAFYSGDYE EAVMYVTRSL
241 SALPTAIAYN NRAQAEIKLQ RWSSALEDCE KALELDPGNV KALLRRATTY KHQNKIQEAV
301 DDLRKVLQVE PDNDLAKKTL SEVERDLKNS EPVSELQTKG KRMVIEEVEN SGDEGKGSA
361 DERADGGSDE AAMGNIQKKL MVRSEGGRR SRRGRTPGPR AEQGGGLRET ATASTGDSYY
421 PEEPRADNPD SGLKRRGNEL FRGQQAFAEA AQYSVAIAQL EPTGSANADE LSILYSNRAA
481 CYLKEGNCRD CIQDCNRALE LHPFSVKPLL RRAMAYETLE QYRNAYVDYK TVLQIDCGIQ
541 LASDSANRIA RILTELDGSK WRERLPIPA VPTSEPLRVW LPAAETPDQD PCPNNCMPPI
601 TDEKMFQALK EENQLVKDK NYKDAISKYN ECLKINSKAC AIYTNRALCY LKLGQFEEAK
661 LDCDQALQID GENVKASHRL ALAQKGLENC RESGVDPSQV LLSPTSSEAA RHLDTKNDTA
721 PPSKGRERRR IQVQEVGSS DEEPERPAEA SATSAPARDG VEDGGSSEPA EKLDVSKPTN
781 AYEEGQVLST ISARKDEEAC AHLLAITAPK DLPLLLSNKL EGDTFLLLIQ SLKSHLVAKD
841 PSLVYEHLLY LSKAERFKTM LTLINKGQKE QMAQLFDGLS DTQSDGLTAE DVQALRRQYE
901 L

Abb. 26 Die Aminosäuresequenz des sperm associated antigen1-Proteins der Maus (Erläuterung im Text).

(G) :

LOCUS AF181253 1 529 aa ROD 07-NOV-1999
 DEFINITION **TPR-containing protein involved in spermatogenesis TPIS** [Mus musculus].
 ACCESSION AAF06161
 PID g6272682
 VERSION AAF06161.1 GI:6272682
 DBSOURCE locus AF181253 accession [AF181253.1](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE house mouse.
 ORGANISM [Mus musculus](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 529)
 AUTHORS Takaishi, M. and Huh, N.H.
 TITLE A tetratricopeptide repeat-containing protein gene, tpis, whose expression is induced with differentiation of spermatogenic cells
 JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 264 (1), 81-85 (1999)
 MEDLINE [99458625](#)
 PUBMED [10527845](#)
 REFERENCE 2 (residues 1 to 529)
 AUTHORS Takaishi, M. and Huh, N.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-AUG-1999) Biochemistry, Toyama Med. and Pharmaceu. Univ., Sugitani 2630, Toyama 9300194, Japan
 COMMENT Method: conceptual translation supplied by author.
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..529
 /organism="Mus musculus"
 /strain="ICR"
 /db_xref="taxon:10090"
 /chromosome="15"
 /map="18.1 cM"
 /tissue_type="skin"
 /dev_stage="embryo"
 Protein 1..529
 /product="TPR-containing protein involved in spermatogenesis TPIS"
 CDS 1..529
 /gene="Tpis"
 /coded_by="AF181253.1:35..1624"
 ORIGIN
 1 MGNIQKKLMV RRSEGGRRSR RGRTPGPRAE QGGGLRETAT ASTGDSYYPE EPRAADNPSEG
 61 LKRRGNELFR GGQFAEAAAQ YSVAIAQLEP TGSANADELS ILYSNRAACY LKEGNCRDCI
 121 QDCNRALHLH PFSVKPLLR AMAYETLEQY RNAYVDYKTV LQIDCGIQLA SDSANRIARI
 181 LTLDGSKWR ERLPPIPAVP TSEPLRWLP AAETPDQDPC PNNCMPSITD EKMFQALKEE
 241 GNQLVKDKNY KDAISKYNEC LKINSKACAI YTNRALCYLK LGQFEEAKLD CDQALQIDGE
 301 NVKASHRLAL AQKGLNCRE SGVDPSQVLL SPDSSEAAKH LDTKNDTAPP SKGRERRRIQ
 361 VQEVGSSDE EPERPAEASA TSAPARDGVE DGGSAEPAEK LDVSKPTNAY EFGQVLSTIS
 421 ARKDEEACAH LLAITAPKDL PLLLSNKLEG DTFLLLIQL KSHLVAKDPS LVYEHLLYLS
 481 KAERFKTMLT LINKGQKEQM AQLFDGLSDT QSDGLTAEDV QALRRQYEL

Abb. 27 Die Aminosäuresequenz des TPR-containing protein involved in spermatogenesis TPIS der Maus (Erklärung im Text).

!!AA_MULTIPLE_ALIGNMENT 1.0

April 4, 2001 21:26

(F) Name: NP_036161 Len: 1080 Check: 9096 Weight: 1.00
 (G) Name: TPIS Len: 1080 Check: 1369 Weight: 1.00
 (D) Name: XP_011690 Len: 1080 Check: 5285 Weight: 1.00
 (E) Name: NP_003105 Len: 1080 Check: 2656 Weight: 1.00
 (B) Name: FLJ21908 Len: 1080 Check: 2660 Weight: 1.00
 (C) Name: RIKEN Len: 1080 Check: 9476 Weight: 1.00
 (A) Name: Spaghetti Len: 1080 Check: 2366 Weight: 1.00

```

      501                                     550
NP_036161 HPFSVK PLLRRAMAYE TLEQYRNAYV
          TPIS HPFSVK PLLRRAMAYE TLEQYRNAYV
XP_011690 HPFSMK PLLRRAMAYE TLEQYGNAYV
NP_003105 HPFSMK PLLRRAMAYE TLEQYGNAYV
          FLJ21908 NRSYTK AYSRGGAARF ALQKLEAAKK
              RIKEN SRITYTK AYARRGAARF ALQKLEDARK
          Spaghetti MSACEK AFELQRQVRQ NAREYENSVK

      551                                     600
NP_036161 D...YKTVLQ IDCGLQLASD SANRIARILT ELDGSKWRER LPPIPAVPTS
          TPIS D...YKTVLQ IDCGLQLASD SANRIARILT ELDGSKWRER LPPIPAVPTS
XP_011690 D...YKTVLQ IDCGLQLAND SVNRLSRILM ELDGPNWREK LSPIPAVPAS
NP_003105 D...YKTVLQ IDCGLQLAND SVNRLSRILM ELDGPNWREK LSPIPAVPAS
          FLJ21908 D...YERVLL.....ELEPN NFEATNELRK ISQALASKEN SYPKEDIV.
              RIKEN D...YEKVL.....ELEPN NFEATNELRK INQALTSKEN SGFGAAAAAE
          Spaghetti DLYSWEQDIK .NKEKELQKS PLSAANKDLP VRSHVITDKS RKESPSSSAA

      601                                     650
NP_036161 EPLRVWLPAA E...TPDQDPC PNNCMPSITD EKMFOALKEE GNQLVKDKNY
          TPIS EPLRVWLPAA E...TPDQDPC PNNCMPSITD EKMFOALKEE GNQLVKDKNY
XP_011690 VPLQAWHPAK EMISKQAGDS SSHRQCGITD EKTFKALKEE GNQCVNDKNY
NP_003105 VPLQAWHPAK EMISKQAGDS SSHRQCGITD EKTFKALKEE GNQCVNDKNY
          FLJ21908 IK.....STE GERKQIE..A QQNKQQAISE .....KDR GNGFFKKGKY
              RIKEN SK.....PAA GESKPTG..G QQGRQKAIAE .....KDL GNGFFKKGKY
          Spaghetti SS.....PTE KQDLEVDPAV QQYK.KANDI .....KDR GNTYVKQGEY

      651                                     700
NP_036161 KDAISKYNEC LKINSKACAI YTNRALCYLK LGQFEEAKLD CDQALQIDGE
          TPIS KDAISKYNEC LKINSKACAI YTNRALCYLK LGQFEEAKLD CDQALQIDGE
XP_011690 KDALSKYSEC LKINNKECAI YTNRALCYLK LCQFEEAKQD CDQALQIADG
NP_003105 KDALSKYSEC LKINNTECAI YTNRALCYLK LCQFEEAKQD CDQALQIADG
          FLJ21908 ERAIECYTRG IAAADGANALL PANRAMAYLK IQKYEEAEKD CTQAILLDGS
              RIKEN EQAIECYTRG IAAARTNALL PANRAMAYLK IQRYEEAEKD CTQATVLDGS
          Spaghetti EKAIIVAYSTA IATYPHDPIY HINRALCYLK QESFEDQVED CEAAIALDLKL

      701                                     750
NP_036161 NVKASHRLAL AQKGLNCRE SGVDPSQV.L LSP..... LSSEAARHLD
          TPIS NVKASHRLAL AQKGLNCRE SGVDPSQV.L LSP..... LSSEAARHLD
XP_011690 NVKAFYRRAL AHKGLKNYQK SLIDLNKVIL LDPSIIEAKM ELEEVTELLN
NP_003105 NVKAFYRRAL AHKGLKNYQK SLIDLNKVIL LDPSIIEAKM ELEEVTELLN
          FLJ21908 YSKAFARRGT ARTFLGKLNE AKQDFETVLL LEPGNKQAVT ELSKIKKELI
              RIKEN YSKAFARRGT ARTFLGKINE AKQDFETVLL LEPGNKQAAAT ELSRIKKELI
          Spaghetti CVKAYYREMQ ANESLGNME ALKDCTTVLA LEPKNIEAKR SLARINDRLR

      751                                     800
NP_036161 TKNDTAPPS. KGRERRRIQV QEVDGSSDEE FERPA.EASA TSAPARDGVE
          TPIS TKNDTAPPS. KGRERRRIQV QEVDGSSDEE FERPA.EASA TSAPARDGVE
XP_011690 LKDKTAPFN. KEKERRKIEI QEVN.EGKEE EGRPAGEVST GCLASEKGGK
NP_003105 LKDKTAPFN. KEKERRKIEI QEVN.EGKEE EGRPAGEVST GCLASEKGGK
          FLJ21908 EKGHWDDV.F LESTQRQNVV KPI.....DN PPHGSGTKPL KKV.....
              RIKEN EKGHWDDV.F LESTQRHHVV KAV.....DN PPR.GSPKAL KKV.....
          Spaghetti KIATKSGPNF TPDRPGMIEI LPI.....EK PAKRSKKAM RSVPVVTVVS

```

Abb. 28 Multipler Vergleich der genannten Proteine mit den pyle-up Programm (HUSAR) (Erläuterung im Text).

	801				850
NP_036161	DGGSAPPAEK	LDVSKPTNAY	EFGQVLSTIS	ARKDEEACAH	LLAITAPKDL
TPIS	DGGSAPPAEK	LDVSKPTNAY	EFGQVLSTIS	ARKDEEACAH	LLAITAPKDL
XP_011690	SSRSPEDEPK	LPIAKENNAY	EFGQILINALS	TRKDKEACAH	LLAITAPKDL
NP_003105	SSRSPEDEPK	LPIAKENNAY	EFGQILINALS	TRKDKEACAH	LLAITAPKDL
FLJ21908	...IIIEETGN	L.....	IQ	TIDVPDSTTA	AAFENNPIINL
RIKEN	...FIEETGN	L.....	IE	TVDAPDS.SA	TVPEESD....
Spaghetti	PRATIDDSNQ	LRISDEDIDK	IFNSNOGIIE	EVKKTNPKPT	PMPDTSGPPK
	851				900
NP_036161	FLLLS.....	NKLEGDTFLL	LIQSLKSHLV	AKDPSLVYEH	LLYLSKAERF
TPIS	FLLLS.....	NKLEGDTFLL	LIQSLKSHLV	AKDPSLVYEH	LLYLSKAERF
XP_011690	PMFLS.....	NKLEGDTFLL	LIQSLKNNLI	EKDPSLVYQH	LLYLSKAERF
NP_003105	PMFLS.....	NKLEGDTFLL	LIQSLKNNLI	EKDPSLVYQH	LLYLSKAERF
FLJ21908	ANVIAATGTT	SKKNSSQDVL	F.PTSDTPR.	...AKVLKIE	ESDTS...
RIKEN	.RATEAVGTG	TKKNPSEGV	L.PAGDRPR.	...AKVLKIE	ASDTS...
Spaghetti	AETIAKTSKE	VKPTKOTAVK	VAPAVETPKE	TETRKDTKIV	PESDNEAKPS
	901				950
NP_036161	KTMLTLINKG	QKEQMAQLFD	GLSDTQSDGL	TAEDVQALRR	QYEL~~~~~
TPIS	KTMLTLINKG	QKEQMAQLFD	GLSDTQSDGL	TAEDVQALRR	QYEL~~~~~
XP_011690	KMMLTLISKG	QKELEQLFE	DLSDTPNNHF	TLEDIQALKR	QYEL~~~~~
NP_003105	KMMLTLISKG	QKELEQLFE	DLSDTPNNHF	TLEDIQALKR	QYEL~~~~~
FLJ21908		.LPQASLKQ	DVCQSYSEKM	PI...EIEQK	PAQFATT...
RIKEN		.PQAQVCVKQ	DARQEGSEKA	SV...PAEQM	PGQLAAA...
Spaghetti	APKKTAVEVP	KVCTQVSPPK	TTIERSEEVN	TVCTEKIECA	SSNNAMSPSP
	951				1000
NP_036161	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
TPIS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
XP_011690	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
NP_003105	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
FLJ21908	...VLPPIPA	NSFQLESDFR	QLKSSPDMLY	QYLKQIEPSL	YPKLFQKNLD
RIKEN	...GLPPVPA	NSFQLESDFR	QLRSSPEMLY	QYVKNIIEPSL	YPKLFQKNLD
Spaghetti	IERFLPPAPT	STAQFHVTKW	EL.SGPQK.Y	QYLKSIEVPN	LCKILGAGFD
	1001				1050
NP_036161	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
TPIS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
XP_011690	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
NP_003105	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
FLJ21908	PDVFNQIVKI	LHDFYIEKEK	PLIFEILQR	LSELKRFDMA	VMFMSETEKK
RIKEN	PDVFNQIIKI	LHDFYIEREK	PALIFEVLER	LSQLRRFDMA	VMFMMSGPERK
Spaghetti	SDTFADLLRT	IHDFVFPNKE	PNTAAVLLE.	ISKNDFTIL	AMLMSAEEKK
	1051		1080		
NP_036161	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
TPIS	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
XP_011690	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
NP_003105	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
FLJ21908	IARALFNHID	KSGLKDSSV.	EELKKRYGG~		
RIKEN	LTNVLFNHLE	KSDLKEDSV.	EELKKRYGG~		
Spaghetti	MVSSILNAIK	NWPSKNPAVL	DNLFKEYGVA		

Abb. 29 Fortsetzung von Abb. 28 (Erläuterung im Text).

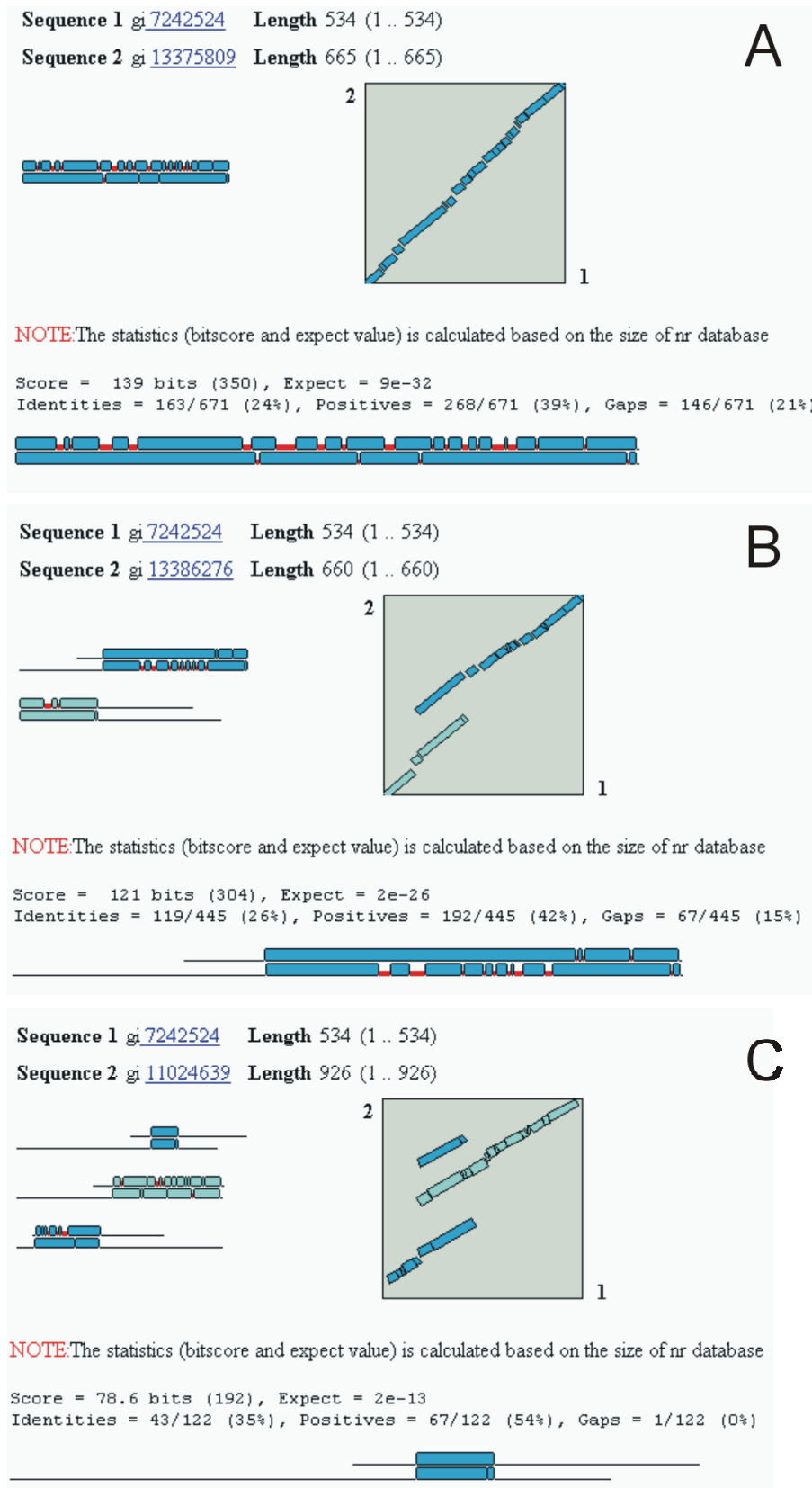


Abb. 30 Vergleich der Aminosäuresequenz des Spaghetti-Proteins (gi7242524) mit den oben erwähnten Proteinen mit Hilfe des BLAST 2-Programms (HUSAR) (Erläuterung im Text).

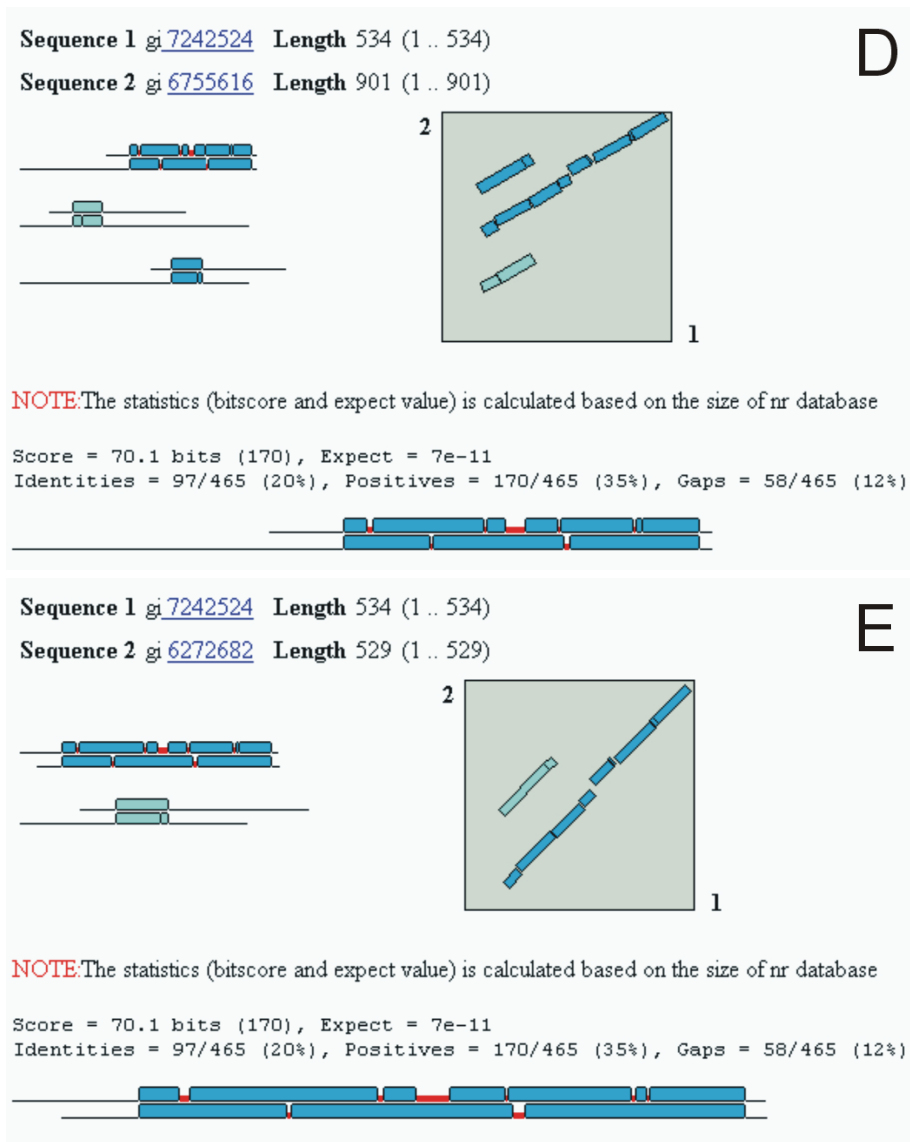


Abb. 31 Fortsetzung von Abbildung 3 (Erläuterung im Text).

Das *yeast two-hybrid* System

UAS und TATA Regionen sind die beiden wesentlichen Einheiten eines Hefe Promotors

Die Initiation der Gen-Transkription in Hefe wird von mehreren zusammenwirkenden Faktoren bestimmt. Allen Strukturgenen der Hefe vorangehend befindet sich eine mehr oder weniger konservierte Sequenz, die sogenannte TATA-Box, welche den Startpunkt der Transkription definiert. Viele Gene besitzen darüber hinaus noch sogenannte „cis-acting“- Elemente, DNA-Sequenzen, an denen Transkriptionsfaktoren und andere „trans-acting“- regulatorische Proteine binden, und so die Transkription kontrollieren können. Der Begriff Promotor wird üblicherweise für beide Einheiten, also TATA-Box und ihre cis-regulatorischen Elemente verwendet. Diese Terminologie ist vor allem üblich, wenn von Hefe Gen-Regulation gesprochen wird, weil hier die cis-regulatorischen Elemente relativ nahe der TATA-Box liegen; im Gegensatz zu multizellulären Eukaryoten, bei denen die cis-regulatorischen Elemente (wie z.B. „enhancer“) sehr weit stromaufwärts oder stromabwärts von dem Promotor liegen können, den sie kontrollieren. Um Verwirrungen zu vermeiden, wird im allgemeinen die TATA-Box ohne ihre cis-regulatorischen Elemente als Minimalpromotor bezeichnet. Dieser Minimalpromoter befindet sich in der Hefe typischerweise etwa 25 bp stromaufwärts der Transkriptions-Startstelle. Darüber hinaus besitzen einige Gene der Hefe gleich mehrere TATA-Boxen. So z.B. das Hefe *HIS3*-Gen, welches zwei TATA-Boxen besitzt: *TR*, welche reguliert werden kann und *TC*, welche konstitutiv exprimiert ist. Hefe TATA-Boxen können im Genom an neue Stellen nahe an andere cis-regulatorische Elemente verschoben werden und behalten dennoch ihre transkriptionellen Aktivität bei. Ein Typ dieser cis-regulatorischen Elemente der Hefe sind die sogenannten „upstream activating sequences“ (UAS), die von spezifischen transkriptionellen Aktivatoren erkannt werden und so die Transkription von stromabwärts liegenden TATA-Regionen verstärken können. Diese verstärkende Funktion der Hefe-UAS ist generell unabhängig von der Orientierung, solange sie sich nicht mehrere hundert bp von der TATA-Region entfernt befinden.

UAS und TATA-Regionen können zu neuen Promotoren verschaltet werden

Die modularen Eigenschaften der Hefe TATA-Boxen und UAS' haben letztlich das *yeast two-hybrid* System ermöglicht. In den meisten Fällen sind die *lacZ*-, *HIS3*-, *ADE2*- und *LEU2*-Reportergene unter der Kontrolle von künstlichen Promotorkonstrukten, die aus einer TATA- und einer UAS- (oder "Operator") Sequenz eines anderen Gens bestehen. Im auf GAL4 basierenden System, welches im Folgenden benutzt wurde, dient entweder eine native GAL-UAS oder eine synthetische UAS_{G17}-mer Konsensus-Sequenz zur Bindung der GAL4 DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD).

Reportergene unter der Kontrolle von GAL4-responsiven Elementen

Zwei Gene, die für den Galaktose-Metabolismus benötigt werden, werden in der Hefe von zwei regulatorischen Proteinen, dem GAL4- und dem GAL80-Protein sowie der Karbonquelle im Medium kontrolliert. Bei Anwesenheit von Galaktose bindet das GAL4-Protein an die GAL4-responsiven Elemente innerhalb der UAS, stromaufwärts der verschiedenen Gene, welche am Galaktose-Metabolismus beteiligt sind, und aktivieren so die Transkription. In der Abwesenheit von Galaktose bindet das GAL80-Protein an das GAL4-Protein und unterbindet so die Transkription. Bei Anwesenheit von Glukose wird die Transkription der Galaktose-Gene sofort reprimiert. Die kontrollierte Regulation der GAL-UAS' durch das GAL4-Protein ist der Schlüssel zum *yeast two-hybrid* System. Es wurden Hefestämme erzeugt, die Deletionen in ihren *gal4*- und *gal80*-Genen tragen, damit die endogenen Proteine nicht mit den ektopischen Proteinen, die von den Vektoren kodiert werden, interferieren. In diesen Stämmen konnte keine signifikante Reprimierung der Glukose beobachtet werden und es konnte auch keine Induktion beobachtet werden, die nicht von einer *yeast two-hybrid*-Interaktion herrührt.

Beim „screenen“ zweier verschiedener embryonaler cDNA -Bibliotheken von Drosophila melanogaster konnten sechs verschiedene Gene identifiziert werden, deren Produkte mit dem Spaghetti-Protein im yeast two-hybrid System interagieren

Das *yeast two-hybrid* System wurde benutzt, um potentielle, mit dem Spag-Protein interagierende Proteine zu isolieren. So wurde während meiner Diplomarbeit "Suche nach Proteinen, die mit dem vom *spaghetti*-Gen kodierten Protein im *yeast two-hybrid* System interagieren" das Hsp90-Protein isoliert (der Fakultät für Biologie, Heidelberg vorgelegt am 23 Juni, 1998). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde der pDNA-BD-Vektor durch die neuere Version dieses Vektors (Stratagene) ausgetauscht. Der Vorteil dieses Vektors ist ein anderes Selektionsverfahren, als das für den pAD-Vektor (Chloramphenicol anstelle von Ampicillin), was eine spätere Isolierung und Sequenzierung der gefundenen pAD-X Vektoren aus der Hefe enorm erleichtert. Hierzu wurde das mit *SaI* und *XhoI* geschnittene *spaghetti*-„insert“ in den mit *SaI* geschnittenen und dephosphorylierten pDNA-BD Vektor ligiert. Ebenso wurde ein *spaghetti*-„insert“ kloniert, dem die TPR-Domäne fehlt (im Weiteren pBD-*spaghetti*ΔTPR). Beide Konstrukte wurden anschließend in den Hefestamm YRG-2 transformiert. Die Expression des GAL4-Fusionsprotein wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analyse kontrolliert, ebenso wurde das Wachstumsverhalten sowie das Verhalten der Reportergene geprüft.

Das „screenen“ einer früh embryonalen cDNA-Bibliothek (E 0-5h) von Drosophila melanogaster mit dem DNA-BD-Spaghetti-Fusionsprotein ergab 20 potentielle Partner, das

„screenen“ einer älteren embryonalen cDNA Bibliothek (E 0-16h) ergab 37 potentielle Partner

Es wurden zwei verschiedene cDNA-Bibliotheken nach mit dem DNA-BD-Spaghetti-Fusionsprotein interagierenden Partnerproteinen durchsucht. Hierzu wurde erstmalig der neue pDNA-BD-*spaghetti*-Vektor benutzt, dessen antibiotische Resistenz verschieden von der der pAD-Bibliothek-cDNA-Vektoren ist. Abbildung 32 zeigt das Resultat der beiden „screens“.

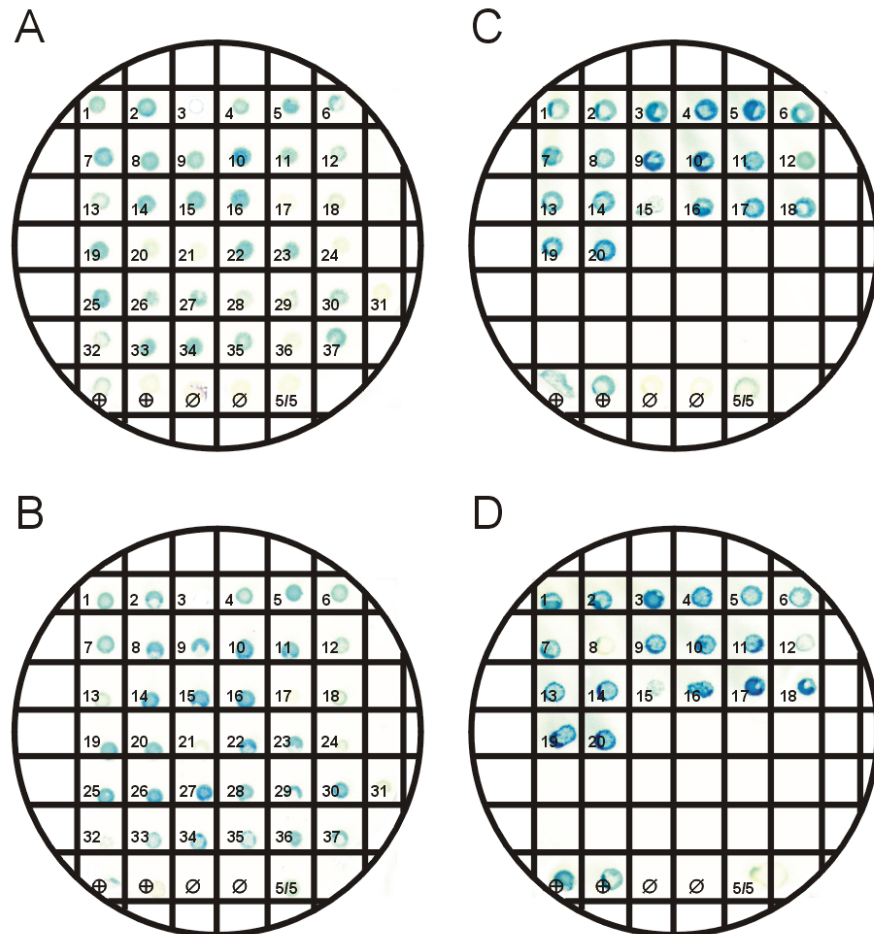


Abb. 32 Die lacZ-Färbung eines Filterabklatsches der „Masterplatten“ der beiden yeast two-hybrid screens einer frühen und späten embryonalen cDNA-Bibliothek. Die Hefekolonien, die auf SD-Leu/-Trp/-His wachsen konnten wurden auf (A) und (C) SD-Leu/-Trp bzw. (B) und (D) SD-Leu/-Trp/-His-Platten überführt. Von diesen Kolonien wurde ein Filterabklatsch gemacht und dieser mit X-Gal gefärbt. (+) und (5/5) sind Positivkontrollen. (0) sind Negativkontrollen (weitere Erklärungen im Text).

Abbildung 32B und 32D zeigen die sogenannten "Masterplatten" auf denen alle Hefekolonien aufgetropft wurden, die auf Medium wachsen können, dem drei Aminosäuren fehlt (SD-Leu/-Trp/-His). Diese Aminosäuren können aufgrund der verwendeten Vektoren (Der pDNA-BD-Vektor besitzt ein Tryptophan-Gen und der pAD-Vektor besitzt ein Leu-Gen.) und der Interaktion zwischen dem DNA-BD-Spaghetti-Fusionsprotein und dem Partner(AD)-Protein (Durch die Interaktion wird das His3-Gen exprimiert) synthetisiert werden. D.h. Hefekolonien,

welche den pDNA-BD-*spaghetti*-Vektor und einen beliebigen pAD-X Vektor tragen, können in Abwesenheit von Leucin und Tryptophan wachsen (Abb. 32B und 32C). Nur bei Interaktion von DNA-BD-Spaghetti-Protein und dem X-Protein der Bibliothek kann auch die dritte Aminosäure (Histidin) synthetisiert werden.

Die Gruppierungen der gefundenen Bibliotheks-cDNA zeigte zwei dominante Gruppen sowie vier seltenere Fälle von mit dem Spaghetti-Protein interagierenden Proteinen

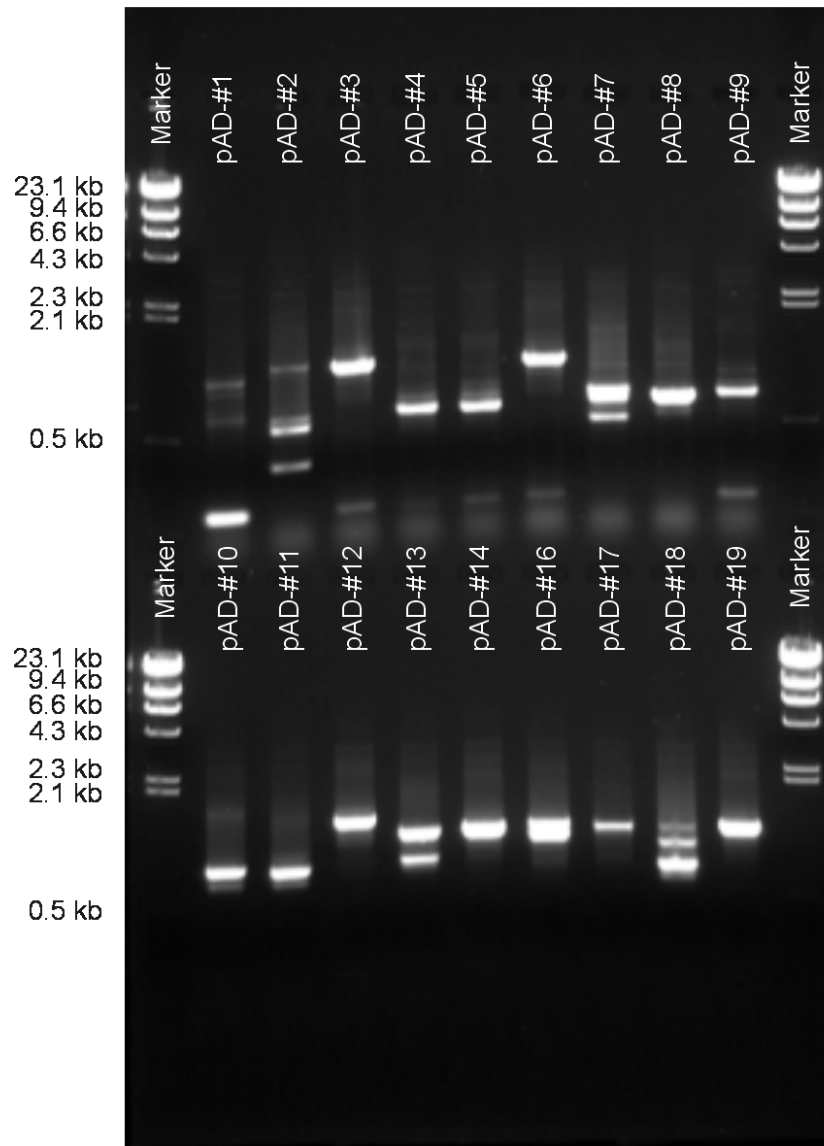


Abb. 33 Die PCR-Produkte von isolierten pAD-X-Vektoren der früh embryonalen cDNA-Bibliothek. Mit Hilfe spezifischer Primer wurde aus den pAD-X-Vektoren die inserts PCR-amplifiziert, auf einem 0,8% Agarosegel separiert und mit Ethidiumbromid gefärbt (weitere Erklärungen im Text).

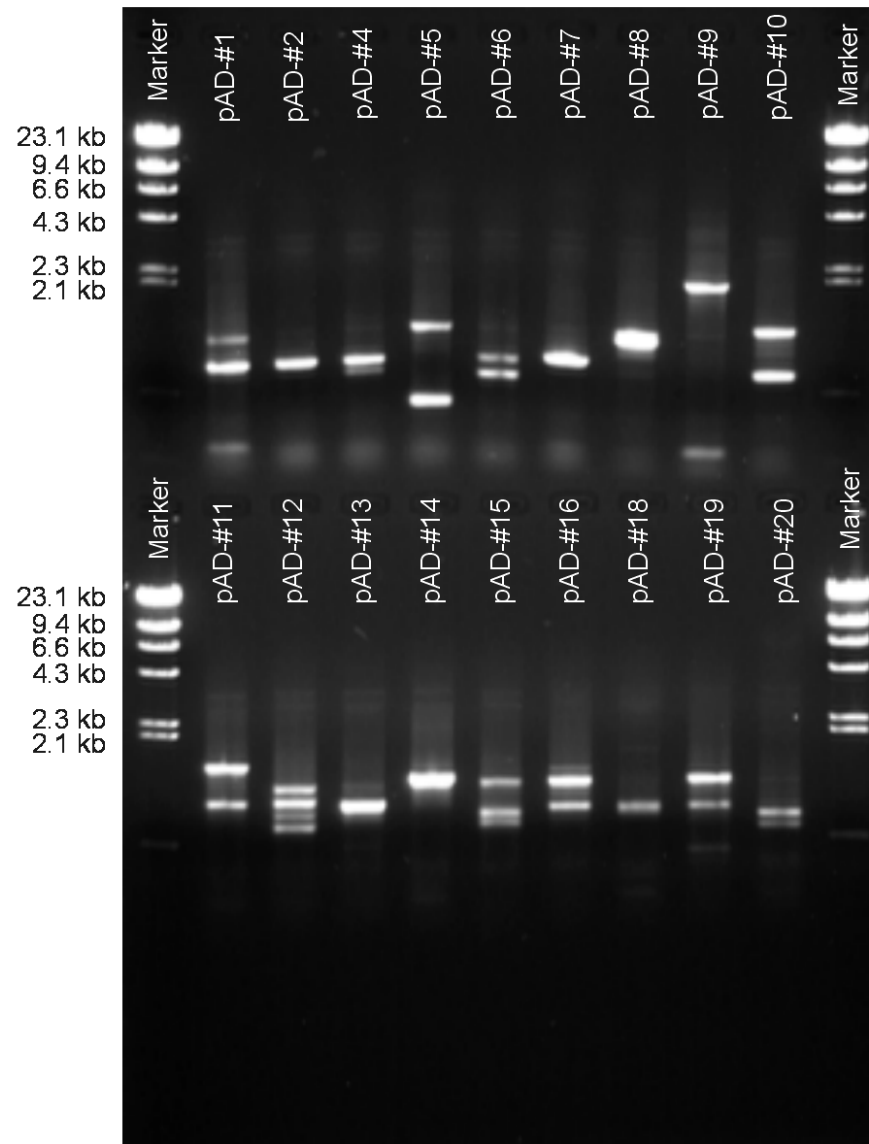


Abb. 34 Die PCR-Produkte von isolierten pAD-X-Vektoren der spät embryonalen cDNA-Bibliothek. Mit Hilfe spezifischer Primer wurde aus den pAD-X-Vektoren die inserts PCR-amplifiziert, auf einem 0,8% Agarosegel separiert und mit Ethidiumbromid gefärbt (weitere Erklärungen im Text).

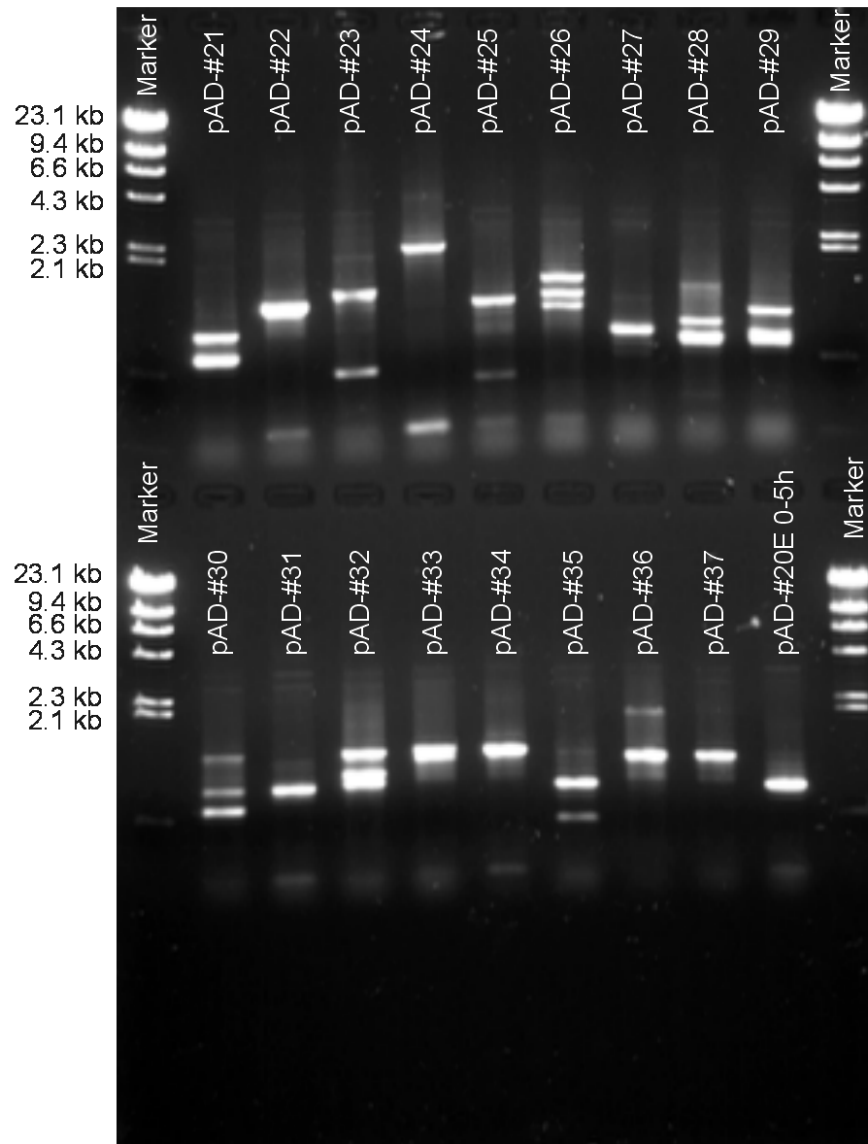


Abb. 35 Die PCR-Produkte von isolierten pAD-X-Vektoren der früh embryonalen cDNA-Bibliothek. Mit Hilfe spezifischer Primer wurde aus den pAD-X-Vektoren die inserts PCR-amplifiziert, auf einem 0,8% Agarosegel separiert und mit Ethidiumbromid gefärbt (weitere Erklärungen im Text).

Die Abbildungen 33 bis 35 zeigen die mit Hilfe der PCR amplifizierten *inserts* der isolierten pAD-X-Vektoren, welche aus den gefundenen Hefekolonien isoliert wurden. Die PCR-Produkte wurden auf 0,8%igen Agarosegelen separiert und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Anschließend wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt, um mit Hilfe radioaktiv markierter Sonden letztlich die Gruppierung durchführen zu können. Es wurden hierzu radioaktiv markierte Sonden von den interagierenden pAD-X-Vektoren verwendet, welche schon während meiner Diplomarbeit gefunden wurden (Sonde "28" (Hsp90), Sonde "27" und

Sonde "32", bis dahin unbekannte Gene). Die Abbildungen 36 bis 39 zeigen die Ergebnisse der radioaktiven Nachweismethode.

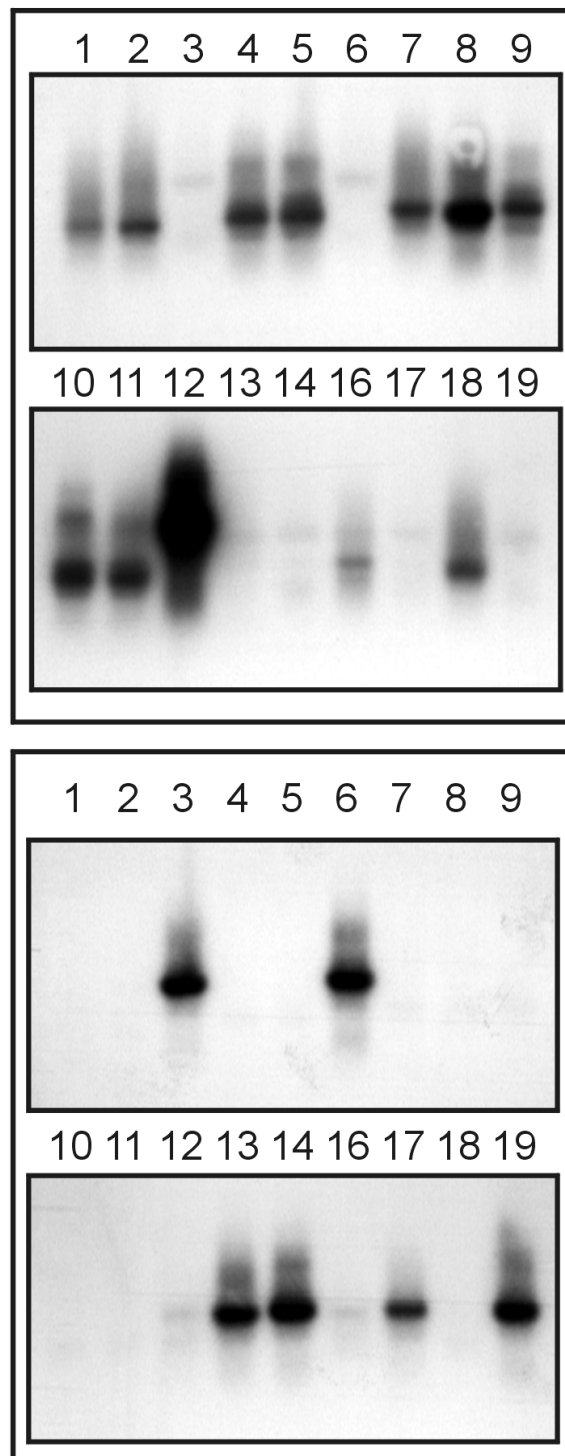


Abb. 36 Southern-Blot-Analyse der separierten PCR-Produkte der früh embryonalen Bibliothek. Mit Hilfe des in Abbildung 33 gezeigten Agarosegels wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Die Membran mit der gebundenen DNA wurde mit der radioaktiven Sonde „27“ (oben) und Hsp90 (unten) hybridisiert. Ein Röntgenfilm wurde anschließend mit der Membran exponiert (weitere Erklärungen im Text).

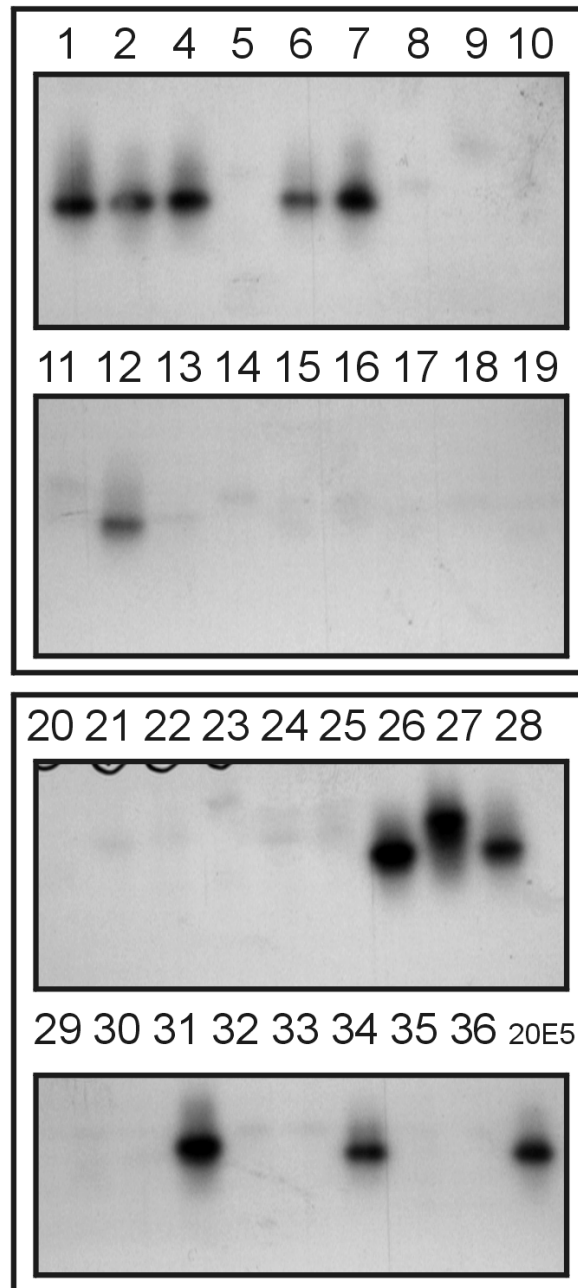


Abb. 37 Southern-Blot-Analyse der separierten PCR-Produkte der spät embryonalen Bibliothek. Mit Hilfe des in Abbildung 35 gezeigten Agarosegels wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Die Membran mit der gebundenen DNA wurde mit der radioaktiven Sonde „27“ hybridisiert. Ein Röntgenfilm wurde anschließend mit der Membran exponiert (weitere Erklärungen im Text).

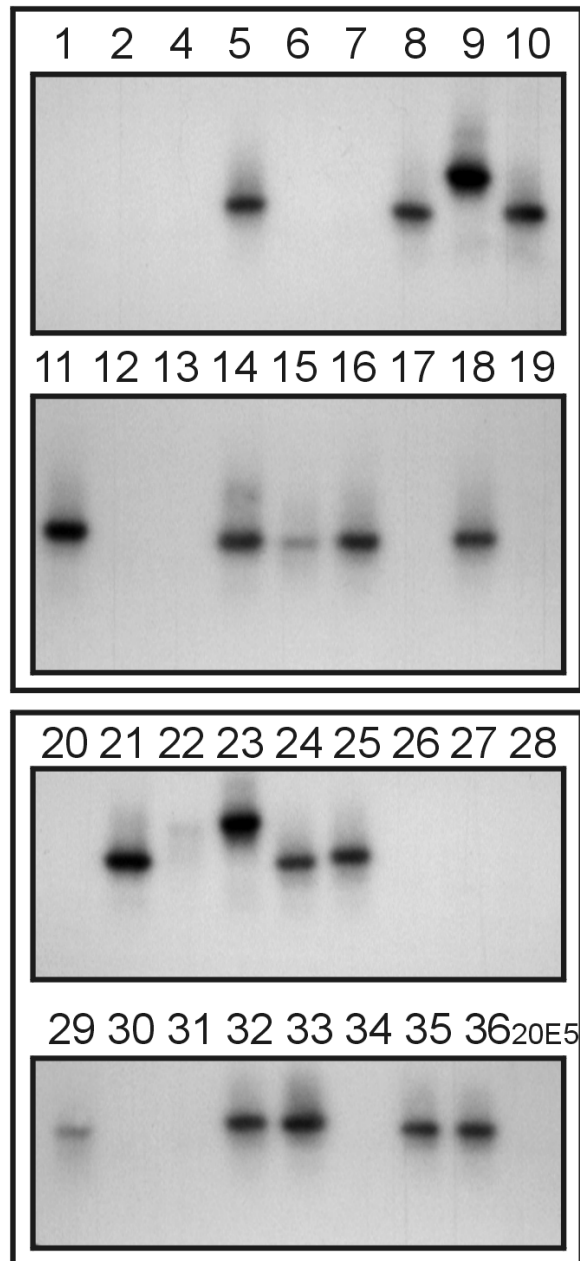


Abb. 38 Southern-Blot-Analyse der separierten PCR-Produkte der spät embryonalen Bibliothek. Mit Hilfe des in Abbildung 35 gezeigten Agarosegels wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Die Membran mit der gebundenen DNA wurde mit der radioaktiven Sonde Hsp90 hybridisiert. Ein Röntgenfilm wurde anschließend mit der Membran exponiert (weitere Erklärungen im Text).

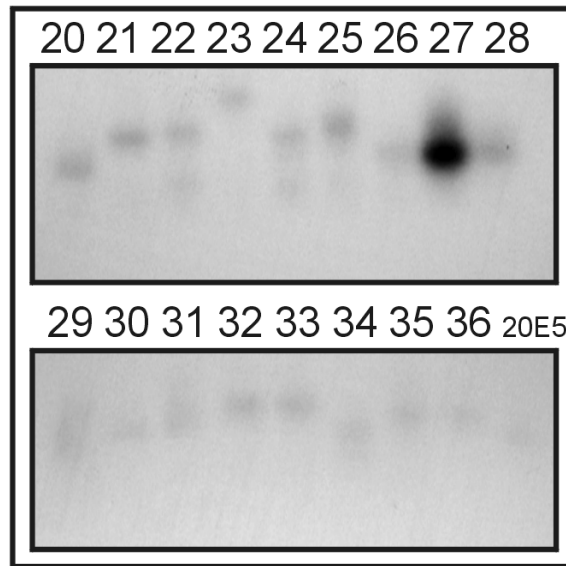


Abb. 39 Southern-Blot-Analyse der separierten PCR-Produkte der spät embryonalen Bibliothek. Mit Hilfe des in Abbildung 35 gezeigten Agarosegels wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Die Membran mit der gebundenen DNA wurde mit der radioaktiven Sonde „32“ hybridisiert. Ein Röntgenfilm wurde anschließend mit der Membran exponiert (weitere Erklärungen im Text).

Die zwanzig gefundenen pAD-X-Kandidaten der früh embryonalen cDNA-Bibliothek konnten vollständig in die Gruppen Hsp90 und "27" aufgeteilt werden. Die ältere embryonale cDNA-Bibliothek konnte in 18 Hsp90 Vertreter, 11 "27" Vertreter, einen "32" Vertreter und vier neue Mitglieder (13, 17, 20, 22) aufgeteilt werden.

Die Überprüfung der neu gefundenen interagierenden Partner ergab drei neue, mit dem Spaghetti-Protein interagierende Partnerproteine

Aufgrund der Tatsache, dass das *yeast two-hybrid* System bis zu 50% falsch positive Ergebnisse liefern kann, muss nach erfolgtem *screen* eine Überprüfung der gefundenen Partner erfolgen. Hierzu werden die gefundenen pAD-X-Vektoren in kompetente Hefezellen transformiert und anschließend mit Kontrollen und dem pDNA-BD-*spaghetti*-Vektor übertransformiert. So kann eine systemeigene oder Gen-unspezifische Interaktion ausgeschlossen werden. Die Abbildungen 40 und 41 zeigen die Ergebnisse dieser Verifizierung.

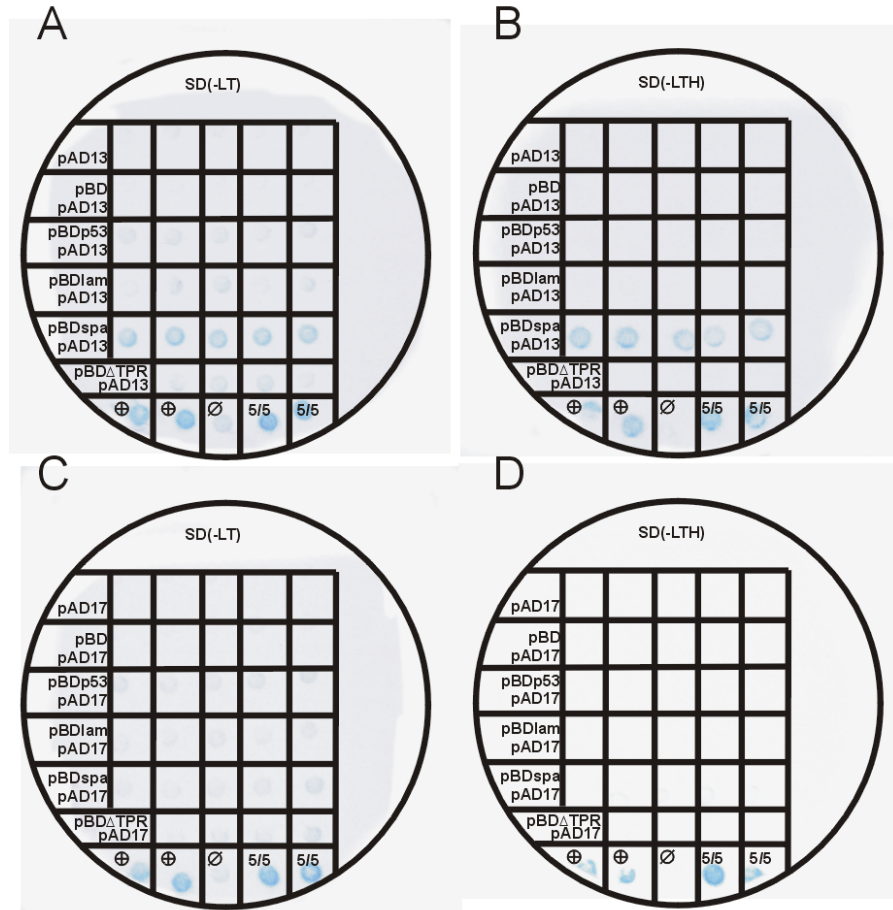


Abb. 40 Verifizierung der mit dem Spaghetti-Protein interagierenden Kandidaten „13“ und „17“. Die im yeast two-hybrid System isolierten pAD-13- und pAD-17-Vektoren wurden, zusammen mit Kontrollen und dem pDNA-BD-spaghetti-Vektor, in kompetente Hefezellen transformiert. Die Hefe wurde anschließend auf SD-Leu/-Trp- und SD-Leu/-Trp/-His-Platten getropft. Hefe, mit den pAD-13 bzw. pAD-17-Vektoren transformiert, kann auf keiner der beiden Platten wachsen. Hefe, mit den pAD-13 bzw. pAD-17-Vektoren und dem „leeren“ pDNA-BD-Vektor transformiert, kann auf SD-Leu/-Trp-Platten wachsen, jedoch nicht auf SD-Leu/-Trp/-His-Platten. Das gleiche gilt für die Kombinationen mit den pDNA-BD-p53- bzw. pDNA-BD-lamin-Vektoren (Negativkontrolle) und den pAD-13 bzw. pAD-17-Vektoren. Nur die Kombination von pAD-13 Vektor mit dem pDNA-BD-spaghetti-Vektor zeigte ein Wachstum auf SD-Leu/-Trp/-His-Platten. Diese Kolonie zeigte darüber hinaus auch eine Blaufärbung nach Färbung mit X-Gal. Der pAD-17-Vektor kodiert offenbar für ein falsch positiv interagierendes Protein. Die Kombination pAD-13- bzw. pAD-17-Vektoren mit dem pDNA-BD-spaghettiΔTPR-Vektor zeigte kein Wachstum. Die TPR-Domäne scheint für die Interaktion notwendig zu sein. (+) Positivkontrolle. (0) Negativkontrolle. (5/5) Positivkontrolle.

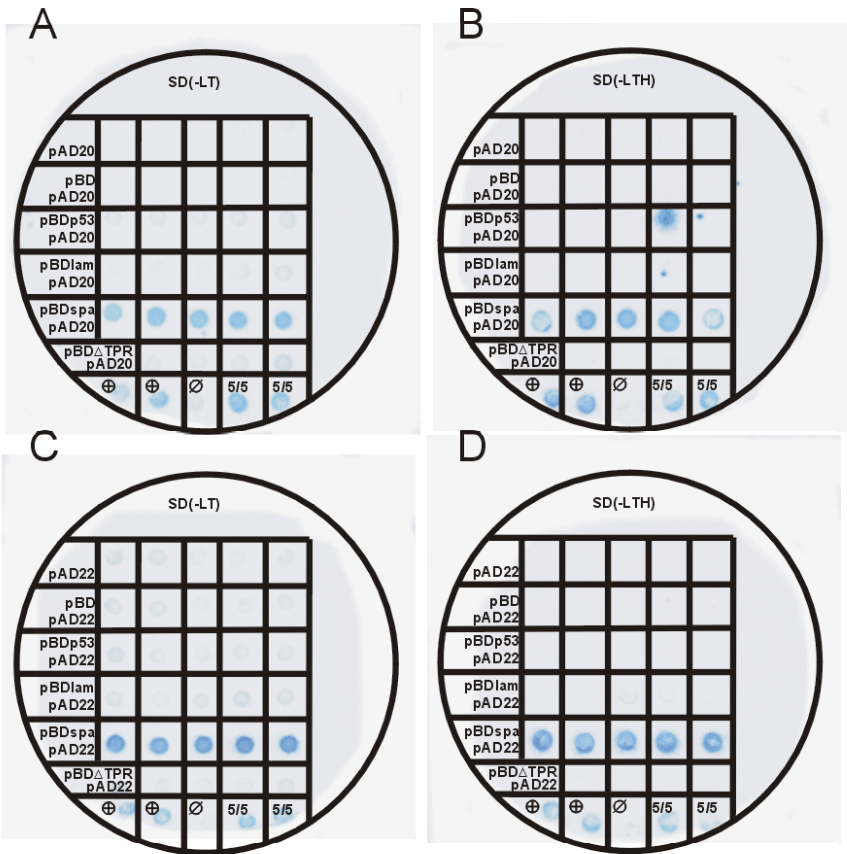


Abb. 41 Verifizierung der mit dem Spaghetti-Protein interagierenden Kandidaten „20“ und „22“ (siehe Abbildung 40).

Nach der Überprüfung blieben die drei Kandidaten, „13“, „20“ und „22“, übrig. Kandidat „17“ erwies sich als ein falsch positiver. Tabelle 3 zeigt zusammenfassend die verschiedenen, mit dem Spaghetti-Protein interagierenden Partner, sowie deren Anzahl in den beiden *screens*.

Tabelle 3 Die verschiedenen Gruppen der gefundenen mit dem Spaghetti-Protein interagierenden Proteine.

Anzahl Klone in Bibliothek	Hsp90	Gruppe"27"	Gruppe"32"	"13"	"20"	"22"
E 0-5h ($\Sigma=20$)	6	13	-	-	-	-
E 0-16h (E=35)	18	11	1	1	1	1

Es wurden vier (Klone „4“, „5“, „19“ und „12“) unterschiedliche Vertreter der Gruppe "27" komplett sequenziert und ihre Sequenz zur Datenbanksuche verwendet. Die Nukleotidsequenz dieser Klone ist identisch mit dem 3'-Bereich des Gens *CG5792* von *Drosophila melanogaster* (Abb. 42).

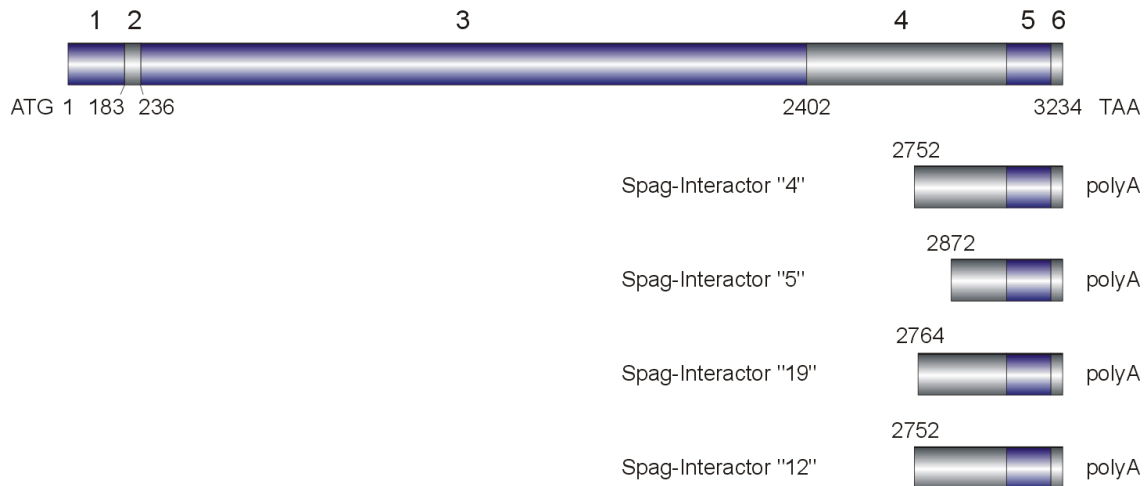


Abb. 42 Sequenzübereinstimmung von vier Mitgliedern der Gruppe „27“ mit dem CG5792-Gen von *Drosophila melanogaster*. Von vier willkürlich gewählten Mitgliedern der zweiten großen Gruppe von mit dem Spag-Protein interagierenden Proteinen wurde die Nukleotidsequenz bestimmt und diese für eine Datenbanksuche verwendet. Alle vier Mitglieder zeigen Sequenzübereinstimmung mit dem Exonen 6, 5 und Bereichen des vierten Exons des Gens CG5792. Die Sequenzübereinstimmung von Klon „4“ beginnt ab Basenpaar 2752 des kodierenden Bereichs des Gens und erstreckt sich über das TAA-Codon hinaus. Klon „5“ beginnt ab Basenpaar 2872, Klon „19“ ab Basenpaar 2764 und der Klon „12“ ab Basenpaar 2752. Obwohl die Klone „4“ und „12“ ab dem gleichem Basenpaar ihre Sequenzübereinstimmung zeigen, zeigen sie Unterschiede im poly-A Bereich.

Das Gen *CG5792* besitzt sechs Exone. Alle untersuchten Sequenzen sind identisch mit den Exonen 6 und 5 und mit Teilen von Exon 4. Die Sequenzübereinstimmung von Klon „4“ beginnt ab Basenpaar 2752 des kodierenden Bereichs des Gens und erstreckt sich über das TAA-Codon hinaus. Klon „5“ beginnt ab Basenpaar 2872, Klon „19“ ab Basenpaar 2764 und der Klon „12“ ab Basenpaar 2752. Obwohl die Klone „4“ und „12“ ab dem gleichem Basenpaar ihre Sequenzübereinstimmung zeigen, zeigen sie Unterschiede im poly-A-Bereich. Die Tatsache, dass nur der 3'-Bereich des Gens gefunden wurde, lässt sich mit der Herstellung der Bibliothek erklären. Hier wurde mittels der Oligo-dT-Methode die mRNA von den Embryonen (0-5h und 0-16h) isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Da die Größe der cDNA aufgrund der Methode auf etwa 1,5kb limitiert ist, wird man selten komplette cDNA isolieren, welche auch für den 5'-Bereich der Gene kodiert.

Das Gen *CG5792* von *Drosophila melanogaster* befindet sich auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms, in der chromosomalen Region 33F2-F3. Ähnliche Sequenzen wurden auch in anderen Organismen gefunden, wie *Caenorhabditis elegans*: K303A1.3-gene-product, *Dictyostelium discoideum*: SNF1/AMP-activated kinase, *Saccharomyces cerevisiae*: probable membrane-protein-YDL035c.

Das Produkt des Gens *CG5792* existiert in den Datenbanken in zwei splicosomalen Isoformen (Datenbanknummer: AAF53222.1 und AAF53221.1). Die kürzere dieser Formen kodiert für ein Peptid mit einer Länge von 335 Aminosäuren. Die längere Isoform kodiert für ein Protein mit

einer Länge von 1056 Aminosäuren. Der Unterschied zwischen den beiden Isoformen liegt im Fehlen des großen dritten Exons. Beide Protein-Isoformen besitzen eine sog. „TonB-dependent-receptor-protein“ Signatur. In *E. coli* interagiert das TonB-Protein mit äußeren Membran-Rezeptor-Proteinen, welche am Transport von Substraten in den periplasmatischen Raum verantwortlich sind. In Abwesenheit des TonB-Proteins können die äußeren Membran-Rezeptor-Proteine zwar ihr Substrat binden, jedoch nicht ins Innere transportieren. Zu den Proteinen, die ebenfalls eine „TonB-dependent-receptor-protein“ Signatur besitzen, gehören unter anderem: Hsp23 (*Drosophila melanogaster*), Hsp26 (*Drosophila melanogaster*) sowie Hsp27 (*Drosophila melanogaster*).

FlyBase Report

Gene *CG5792*

D. melanogaster gene *CG5792* is reported here . It encodes a transcription factor involved in transcription which is a component of the nucleus . [Similar sequences](#) have been identified in *Caenorhabditis elegans* , *Dictyostelium discoideum* and *Saccharomyces cerevisiae* . It has been [sequenced](#) and its [amino acid sequence](#) is also available. It has been mapped cytologically to [33F2--3](#) . There are no recorded mutant alleles. *CG5792* is discussed in one [reference](#) , dating from 1999.

Symbol	CG5792
Cytogenetic map	33F2--3 Limits inferred from genome sequence
Available reports	Full report See also Synopsis GadFly Alleles (1) References (1) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (1)
Genomic sequence analysis	FBan0005792

Similar genes	<i>Caenorhabditis elegans</i> 'K03A1.3 gene product' EMBL:U41625 gi:1118126 <i>Dictyostelium discoideum</i> 'SNF1/AMP-activated kinase' EMBL:AF118151 protein_id:AAD30963 gi:4982468 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'probable membrane protein YDL035c' PIR:S67568 gi:2132416
Rep. DNA sequence	AE003637 , 223646 bp, DNA, 2000
Rep. protein sequence	SPTREMBL:Q9VK57 , 335 aa, 2000
DNA/RNA sequences	<i>Accession, length, kind, year</i> AE003637 , 223646 bp, DNA, 2000 protein:AAF53221 , protein:AAF53222
Protein sequences	<i>Accession, length, year</i> SPTREMBL:Q9VK58 , 1056 aa, 2000 SPTREMBL:Q9VK57 , 335 aa, 2000
FlyBase ID	FBgn0032455
Date	10 Nov 00
Useful aneuploid aberrations	Deficiency: Df(2L)prdl.7 (inferred from cytology), Duplication: Dp(2;2)169 (inferred from cytology)

Attributed data	Information attributed to particular references.
Cellular location	<i>FamiliarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: nucleus ; GO:0005634 ; score = 800.8 inferred from electronic annotation
Process	<i>FamiliarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: transcription ; GO:0006350 ; score = 397.3 inferred from electronic annotation
Function	<i>FamiliarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: transcription factor ; GO:0003700 ; score = 683.9 inferred from electronic annotation
Alleles	±
Allele	
Symbol	CG5792 ⁺
Class of gene	wild-type generic
FlyBase ID	FBal0108286
References	

Das Spaghetti-Protein interagiert mit einem Produkt des Gens CG3168 von Drosophila melanogaster im yeast two-hybrid System, welches vermutlich Transporter-Eigenschaften besitzt

Die Sequenz der Vertreter der Gruppe "32" ist identisch mit der Sequenz des Gens *CG3168* von *Drosophila melanogaster*. Dieses Gen kodiert für einen möglichen Transporter, der eine Komponente der Plasmamembran sein könnte.

FlyBase Report

Gene *CG3168*

D. melanogaster gene *CG3168* is reported here. It encodes a transporter involved in transport which is a component of the plasma membrane. [Similar sequences](#) have been identified in *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *rat*. It has been [sequenced](#) and its [amino acid sequence](#) is also available. It has been mapped cytologically to [6C9-10](#). There are no recorded mutant alleles. *CG3168* is discussed in 3 [references](#), dated between 1999 and 2000.

Symbol	CG3168				
Cytogenetic map	6C9-10 Limits computationally determined from genome sequence between swa and cm				
Available reports	<table> <tr> <td>Full report</td><td>See also Synopsis GadFly</td></tr> <tr> <td>Alleles (1) References (3) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (2)</td><td></td></tr> </table>	Full report	See also Synopsis GadFly	Alleles (1) References (3) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (2)	
Full report	See also Synopsis GadFly				
Alleles (1) References (3) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (2)					
Gene product	organic cation transporter				
Function	transporter ; GO:0005215 inferred from sequence similarity				
Genomic sequence analysis	FBan0003168				
Similar genes	<i>Caenorhabditis elegans</i> ZK637.1 WP:CE06638 <i>Homo sapiens</i> 'KIAA0736 protein' EMBL:AB018279 protein_id:BAA34456 gi:3882193 <i>Mus musculus</i> 'reduced in osteosclerosis transporter' EMBL:AF078869 protein_id:AAC61265 gi:3511277 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HXT3 SGDID:L0000837 <i>rat</i> 'synaptic vesicle protein 2 form B' PIR:S34961 gi:420291				
Rep. DNA sequence	AE003438 , 299537 bp, DNA, 2000				
Rep. protein sequence	SPTREMBL:Q9W3W9 , 709 aa, 2000				
DNA/RNA sequences	Accession, length, kind, year AE003438 , 299537 bp, DNA, 2000 protein:AAF46193				
Protein sequences	Accession, length, year SPTREMBL:Q9W3W9 , 709 aa, 2000				
FlyBase ID	FBgn0029896				

Date	20 Dec 00
Useful aneuploid aberrations	Duplication: Dp(1.1)GH65 (inferred from cytology)
Attributed data	Information attributed to particular references.
Cellular location	<i>FamiliarityBreedsContempt</i> , 1999.11 *: plasma membrane ; GO:0005886 ; score == 277.6 inferred from electronic annotation
Process	<i>FamiliarityBreedsContempt</i> , 1999.11 *: transport ; GO:0006810 ; score == 277.6 inferred from electronic annotation
Function	<i>Ketchum</i> , 1999.11 *: transporter ; GO:0005215 inferred from sequence similarity <i>FamiliarityBreedsContempt</i> , 1999.11 *: transporter ; GO:0005215 ; score == 517 inferred from electronic annotation
Alleles	±
Allele	
Symbol	CG3168-
Class of gene	wild-type generic
FlyBase ID	FBaJ0105788
References	
Other	
<i>FamiliarityBreedsContempt</i> , 1999.11 [Annotations performed at the Celera Jamboree.] [FBrf0126705] <i>Ketchum</i> , 1999.11 [Annotations performed at the Celera Jamboree.] [FBrf0126677] <i>Verstreken and Bellen</i> , 2000.9.4 Archived. [FBrf0131218]	

Das Spaghetti-Protein interagiert im yeast two-hybrid System mit einer Reihe von Komponenten, die an der Biosynthese in den Ribosomen beteiligt sind

Die Sequenzen der interagierenden Partner "20", "13" und "22" sind identisch mit den Genen *CG13849*, *CG8615* und *CG2957* von *Drosophila melanogaster*. Die Produkte dieser Gene spielen eine Rolle in der Biosynthese der Ribosomen. So kodiert das Gen *CG13849* für ein Protein, das Ähnlichkeit mit nucleolären Proteinen von *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Schizosacchar* besitzt.

FlyBase Report

Gene *CG13849*

D. melanogaster gene *CG1379* is reported here . It encodes a transcription factor which is a component of the nucleus . [Similar sequences](#) have been identified in *Caenorhabditis elegans* , *Gallus gallus* , *Homo sapiens* and *Mus musculus* . It has been [sequenced](#) and its [amino acid sequence](#) is also available. It has been mapped cytologically to [19E1--2](#) . There are no recorded mutant alleles. *CG1379* is discussed in 3 [references](#) , dated between 1999

Symbol	CG13849
Cytogenetic map	94B1--2 Limits inferred from genome sequence
Available reports	Full report See also Synopsis GadFly Alleles (1) References (1) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (1)
Genomic sequence analysis	FBaJ0013849
Similar genes	<i>Caenorhabditis elegans</i> K07C5.4 WP_C06114 <i>Homo sapiens</i> 'nucleolar protein (KKE/D repeat)' gi:5453794 <i>Mus musculus</i> 'SIK similar protein' EMBL:AF053232 gi:2996194 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SIK1 SGDID:L0002982 <i>Schizosacchar</i> 'nucleolar protein involved in pre-rRNA processing' EMBL:AL035216 protein_id:CAA22814 gi:4160346
Rep. DNA sequence	AE003738 , 226159 bp, DNA, 2000
Rep. protein sequence	SPTREMBL:Q9VD11 , 470 aa, 2000
DNA/RNA sequences	Accession, length, kind, year AE003738 , 226159 bp, DNA, 2000 protein:AAF55992
Protein sequences	Accession, length, year SPTREMBL:Q9VD11 , 470 aa, 2000
FlyBase ID	FBgn0038964
Date	10 Nov 00

Useful aneuploid aberrations	Deficiency: Df(3R)hh (inferred from cytology), Duplication: Dp(3.3)M95A+13 (inferred from cytology)
Attributed data	Information attributed to particular references.
Cellular location	<i>FamilarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: cytoskeleton ; GO:0005856 ; score == 303 inferred from electronic annotation
Process	<i>FamilarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: transcription ; GO:0006350 ; score == 303 inferred from electronic annotation
Alleles	±
Allele	
Symbol	CG13849*
Class of gene	wild-type generic
FlyBase ID	FBa0114625
References	
Other	
FamilarityBreedsContempt, 1999.11 [Annotations performed at the Celera Jamboree.] [FBref0126705]	

FlyBase Report

Gene *CG8615*

D. melanogaster gene *CG8591* is reported here. It has been [sequenced](#) and its [amino acid sequence](#) is also available. It has been mapped cytologically to [49A1-2](#). There are no recorded mutant alleles.

Symbol	CG8615				
Cytogenetic map	65E9-10 Limits inferred from genome sequence				
Available reports	<table> <tr> <td>Full report</td><td>See also Synopsis GadFly</td></tr> <tr> <td>Alleles (1) References (2) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (2)</td><td></td></tr> </table>	Full report	See also Synopsis GadFly	Alleles (1) References (2) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (2)	
Full report	See also Synopsis GadFly				
Alleles (1) References (2) Similar genes & Sequences (9) Attributed data (2)					
Gene product	ribosomal protein L18				
Function	structural protein of ribosome ; GO:0003735 inferred from sequence similarity				
Genomic sequence analysis	FBan0008615				
Similar genes	<i>Caenorhabditis elegans</i> 'similar to Eukaryotic ribosomal protein L18' EMBL-T0038 EMBL-A1021492 protein_idCAA16387 gi3881000 <i>Homo sapiens</i> 'ribosomal protein L18' gi4506607 <i>Mus musculus</i> Rpl18 MGI98003 <i>Rattus</i> '60S RIBOSOMAL PROTEIN L18' SWP-P12001 gi132733 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RPL18A SGDID-L0001668				
Rep. DNA sequence	AB003559 , 269525 bp, DNA, 2000				
Rep. protein sequence	SPTREMBL-Q9V534 , 188 aa, 2000				
DNA/RNA sequences	Accession, length, kind, year AB003559, 269525 bp, DNA, 2000 protein.AAF50596				
Protein sequences	Accession, length, year SPTREMBL-Q9V534, 188 aa, 2000				
FlyBase ID	FBgn0035753				

Date	10 Nov 00
Useful aneuploid aberrations	Deficiency: Df(3L)Hn⁰⁸⁸ (inferred from cytology), Duplication: Dp(3.3)h⁴⁰ (inferred from cytology)
Attributed data	Information attributed to particular references.
Cellular location	<i>FamilarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: cytosol ; GO:0005829 ; score == 254 inferred from electronic annotation, ribosome ; GO:0005840 ; score == 412 inferred from electronic annotation
Process	<i>FamilarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: organelle organization and biogenesis ; GO:0006996 ; score == 254 inferred from electronic annotation, protein biosynthesis ; GO:0006412 ; score == 412 inferred from electronic annotation
Function	<i>Ashburner, 1999.11</i> *: structural protein of ribosome ; GO:0003735 inferred from sequence similarity <i>FamilarityBreedsContempt, 1999.11</i> *: structural protein of ribosome ; GO:0003735 ; score == 666 inferred from electronic annotation
Alleles	±
Allele	
Symbol	CG8615*
Class of gene	wild-type generic
FlyBase ID	FBa0111467
References	
Other	
Ashburner, 1999.11 [Annotations performed at the Celera Jamboree.] [FBref0126651]	
FamilarityBreedsContempt, 1999.11 [Annotations performed at the Celera Jamboree.] [FBref0126705]	

FlyBase Report

Gene *CG2957*

D. melanogaster gene *CG2957* is reported here. It encodes a structural protein of ribosome involved in protein biosynthesis which is a component of the ribosome. [Similar sequences](#) have been identified in *Caenorhabditis elegans*. It has been [sequenced](#) and its [amino acid sequence](#) is also available. It has been mapped cytologically to [84E1](#). There are no recorded mutant alleles. *CG2957* is discussed in one [reference](#), dating from 1999.

Symbol	CG2957
Cytogenetic map	84E1 Limits computationally determined from genome sequence between ftz and dsx
Available reports	Full report See also Synopsis GadFly Alleles (1) References (1) Similar genes & Sequences (5) Attributed data (1)
Genomic sequence analysis	FBan0002957
Similar genes	<i>Caenorhabditis elegans</i> F09G8.3 WP:CE00138
Rep. DNA sequence	AE003676 , 257394 bp, DNA, 2000
Rep. protein sequence	SPTREMBL:Q9VHY9 , 322 aa, 2001
DNA/RNA sequences	Accession, length, kind, year AE003676 , 257394 bp, DNA, 2000 protein:AAF54137
Protein sequences	Accession, length, year SPTREMBL:Q9VHY9 , 322 aa, 2001
FlyBase ID	FBgn0037529
Date	20 Dec 00
Useful aneuploid aberrations	Deficiency: Df(3R)D7 (inferred from cytology), Duplication: Dp(3;3)D1 (inferred from cytology)
Attributed data	Information attributed to particular references.
Cellular location	FamiliarityBreedsContempt, 1999.11 + mitochondrion ; GO:0005739 ; score == 89.7 inferred from electronic annotation, ribosome ; GO:0005840 ; score == 113.2 inferred from electronic annotation

Process	FamiliarityBreedsContempt, 1999.11 + protein biosynthesis ; GO:0006412 ; score == 202.9 inferred from electronic annotation
Function	FamiliarityBreedsContempt, 1999.11 + structural protein of ribosome ; GO:0003735 ; score == 256.4 inferred from electronic annotation
Alleles	+
Allele	
Symbol	CG2957 ⁻
Class of gene	wild-type generic
FlyBase ID	FBa0113217
References	
Other	
FamiliarityBreedsContempt, 1999.11 [Annotations performed at the Celera Jamboree.] [FBRef0126705]	

Zwei ähnliche Gene in der Fliege sind bereits bekannt: *minifly* und *Dnop5*, welche beide an der Prozessierung von rRNA beteiligt sind. Ein Verlust der Genfunktion im Falle von *minifly* führt zu Apoptose und Sterilität. Das Gen *CG8615* kodiert für das ribosomale Protein L18, einem Strukturprotein der 60S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen. Das Gen *CG2957* kodiert ebenfalls für ein Strukturprotein der Ribosomen.

Das Spaghetti-Protein benötigt zur Interaktion im yeast two-hybrid System seine TPR-Domäne für die Produkte der Gene *hsp83*, *CG8615*, *CG2957* und *CG13849*, es benötigt diese Domäne jedoch nicht für die Gene *CG5792*, *CG3168* und *emc*

Die im *yeast two-hybrid* System gefundenen pAD-X-Vektoren wurden nicht nur mit dem pDNA-BD-*spaghetti*-Vektor auf Interaktion hin geprüft, es wurde ebenfalls der pDNA-BD-*spaghetti*ΔTPR-Vektor verwendet. Die Abbildungen 43 zeigt, dass zur Interaktion zwischen Hsp90 und Spaghetti-Protein die TPR-Domäne benötigt wird. Für die Interaktion mit dem Produkt des Gens *CG5792* wird diese Domäne jedoch nicht benötigt.

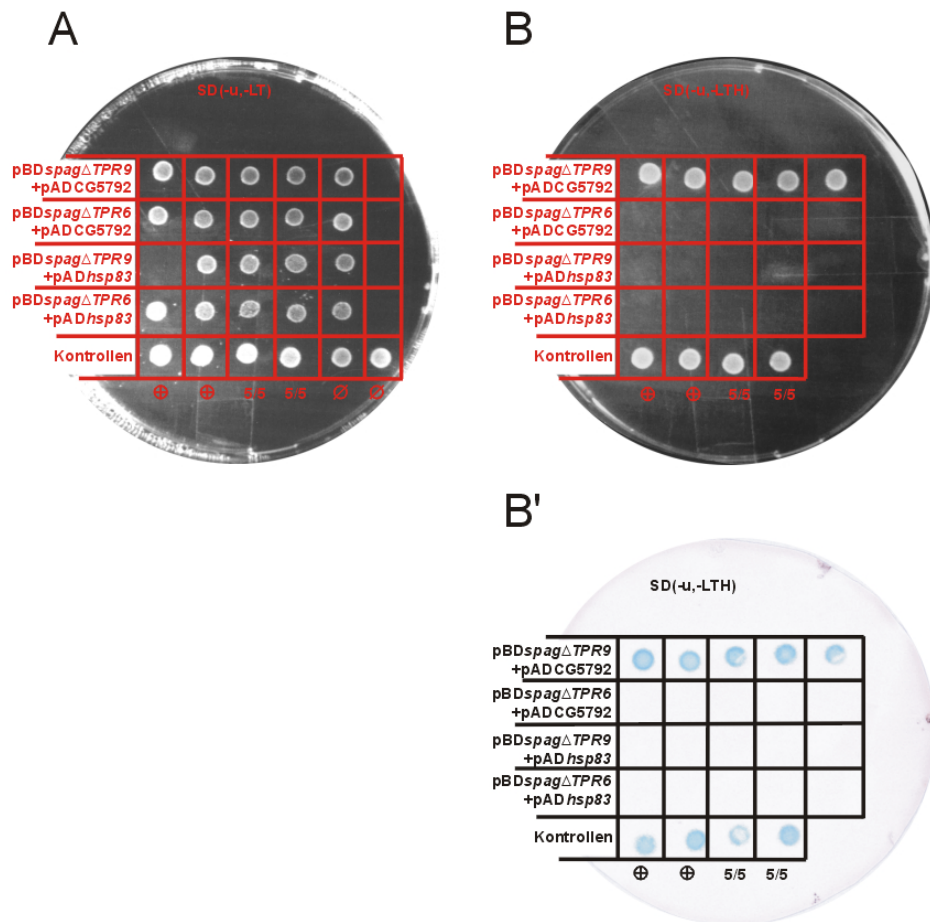


Abb. 43 Das Hsp90-Protein benötigt zur Interaktion im yeast two-hybrid System die TPR-Domäne des Spaghetti-Proteins. Das Produkt des Gens 5792 benötigt diese Domänen hingegen nicht. Hefe wurde mit den folgenden Kombination transformiert: pAD-CG5792-Vektor und pDNA-BD-spaghettiΔTPR6 bzw. pDNA-BD-spaghettiΔTPR9; pAD-hsp83-Vektor und pDNA-BD-spaghettiΔTPR6 bzw. pDNA-BD-spaghettiΔTPR9. Die Kolonien wurden auf SD-Leu/-Trp- und SD-Leu/-Trp/-His-Platten getropft. Nur die Kombination pAD-CG5792-Vektor und pDNA-BD-spaghettiΔTPR9, transformiert in Hefe, konnte auf SD-Leu/-Trp/-His-Platten wachsen. Diese Kolonien zeigten ebenfalls eine Blaufärbung nach einem Filterabklatsch mit anschließender X-Gal-Färbung. (+) Positivkontrollen. (5/5) Positivkontrollen. (0) Negativkontrollen. Das Konstrukt pDNA-BD-spaghettiΔTPR6 funktionierte nicht.

Abbildung 44 zeigt, dass für die Interaktion des Spaghetti-Proteins mit den Produkten der Gene CG8615 und emc die TPR-Domäne nicht benötigt wird.

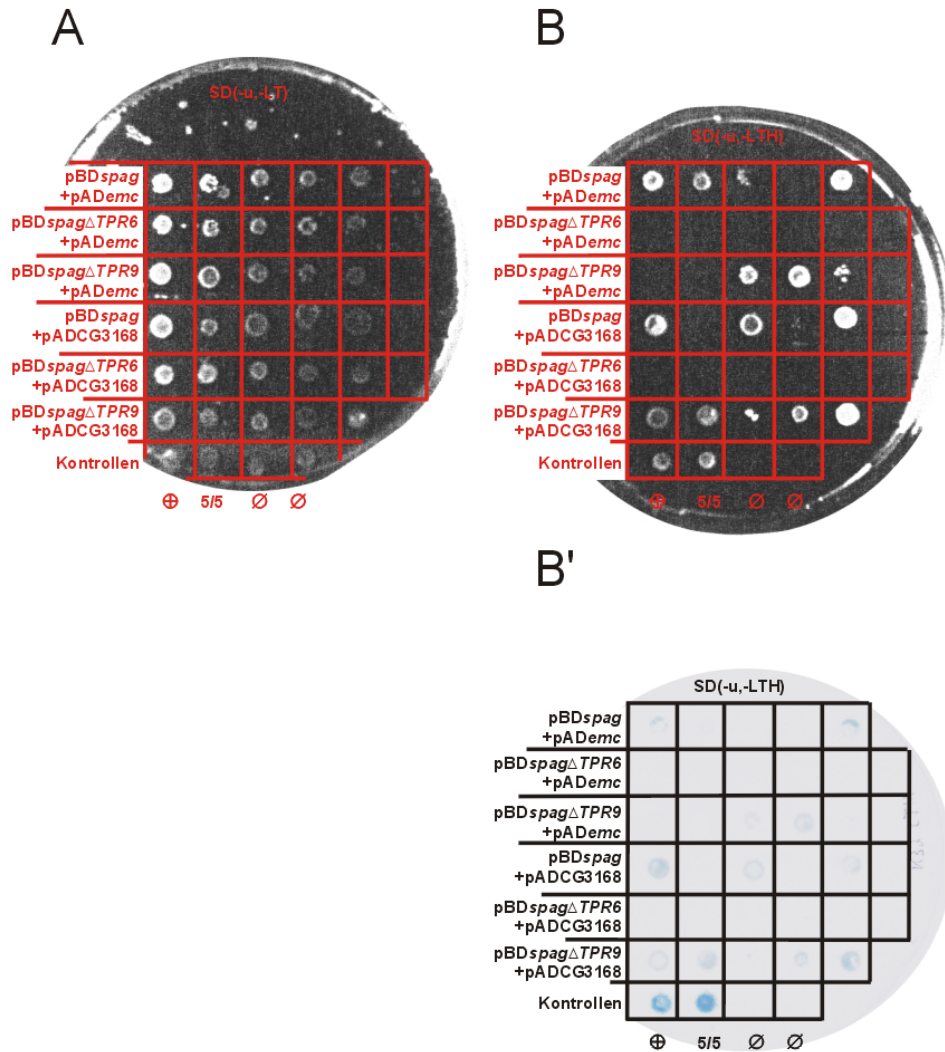


Abb. 44 Das Emc-Protein, wie auch das Produkt des GensCG3168 benötigen zur Interaktion im yeast two-hybrid System nicht die TPR-Domäne des Spaghetti-Proteins (Erläuterungen in Abbildung 43 und im Text).

Ebenfalls kann eine sehr geringe Interaktionsstärke nach der X-Gal-Färbung des Filters beobachtet werden. Das *emc*-Gen wurde in keinem *yeast two-hybrid screen* als interagierender Partner gefunden. Eine persönliche Mitteilung von Garcia-Bellido und der von ihm geäußerten Vermutung einer möglichen genetische Interaktion von *l(2)k12101*- und *emc*- Mutanten veranlassten mich zu diesen Nachforschungen. Aufgrund der geringen Blaufärbung des Filterabklatschs wurde ein sensitiverer Flüssigtest durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abbildung 45 zu sehen sind.

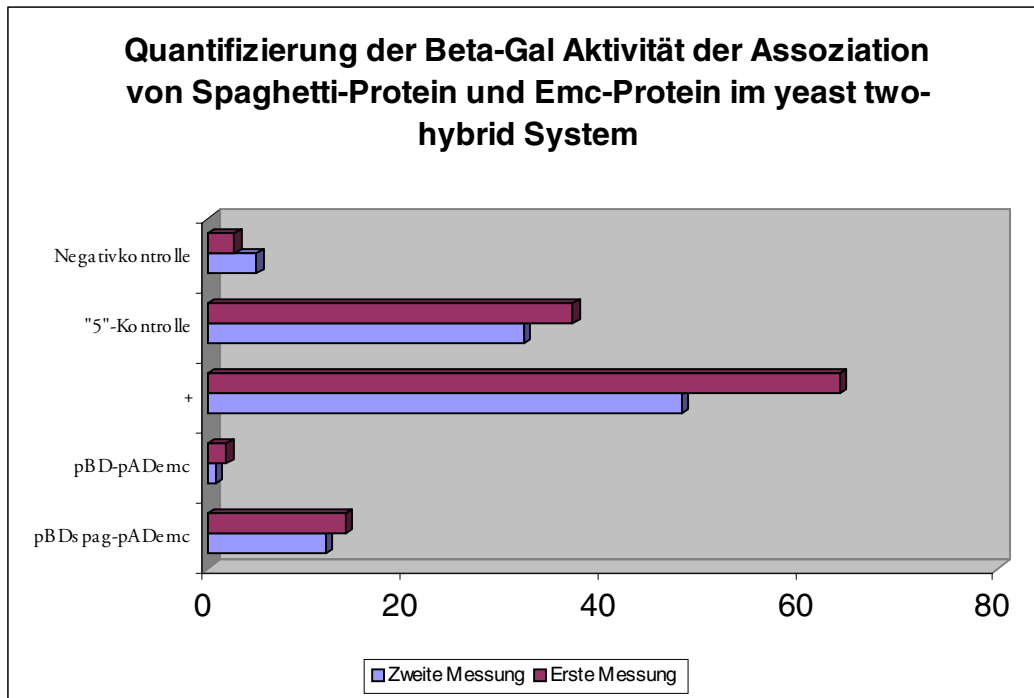


Abb. 45 Messung der relativen Assoziationsstärke zwischen dem Spaghetti-Protein und dem Emc-Protein. Es wurden Hefekulturen kultiviert, die die Kombination pDNA-BD-spaghetti-Vektor und pAD-emc tragen. Die Proteine dieser Kulturen, sowie Proteine von Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden anschließend einem Flüssigkultur-Test mit ONPG als Substrat unterzogen. Die anschließende Farbreaktion wurde mit Hilfe eines Spektrometers gemessen und grafisch dargestellt. („5“-Kontrolle) ist Positivkontrolle. (+) ist stärkere Positivkontrolle. (pBD-pADemc) ist der „leere“ pDNA-BD-Vektor in Kombination mit pAD-emc. (pBDspag-pADemc) ist der pDNA-BD-spaghetti-Vektor in Kombination mit dem pAD-emc-Vektor.

Hier wurde mit Hilfe mehrerer Messreihen die relative Assoziationsstärke von Negativkontrollen, Positivkontrollen und der Interaktion des Spag-Proteins mit dem EMC-Protein aufgenommen. Die relative Assoziationsstärke liegt über der der Negativkontrolle, ist jedoch deutlich geringer als die der Positivkontrollen.

Nachweis der Interaktion des Spaghetti-Proteins mit dem Hsp90-Protein, dem EMC-Protein und dem CG5792-Protein mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase Gen-Fusionssystems

Die Ergebnisse, die durch das *yeast two-hybrid* Systems *in vivo* gewonnen worden sind, wurden mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase Gen-Fusionssystems biochemisch *in vitro* geprüft. Dieses System beruht auf dem Glutathion-S-Transferase-Gen (GST) von *Schistosoma japonicum*, welches als Gen bzw. als Genfragment in spezielle Vektoren kloniert wurde. Diese sogenannten pGEX-Plasmide (Pharmacia) sind so konstruiert, dass das GST-Gen mit dem angehängten Gen mit Hilfe von IPTG (Lactose-Analog: *isopropyl β -thiogalactosid*) induziert werden kann. Dadurch können Fusionsproteine in speziellen *E. coli* Zellen (BL21, Stratagene) in sehr hohen Mengen hergestellt werden.

Es wurden die Fragmente der im *yeast two-hybrid* System gefundenen pAD-*hsp83*⁵³⁵⁻⁷¹⁷, pAD-*CG5792* sowie das *insert* von pBluescript-*emc* (mit freundlicher Genehmigung von Garcia-Bellido) mit Hilfe einer Restriktionsdoppelverdauung (*EcoRI* / *XhoI*) isoliert und anschließend in den gleichermaßen geschnittenen und dephosphorylierten pGEX4T1-Vektor kloniert. Abbildung 46A zeigt ein 1%iges Agarosegel, auf dem DNA der jeweiligen Konstrukte nach einer Restriktionsdoppelverdauung mit *EcoRI* / *XhoI* separiert und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde.

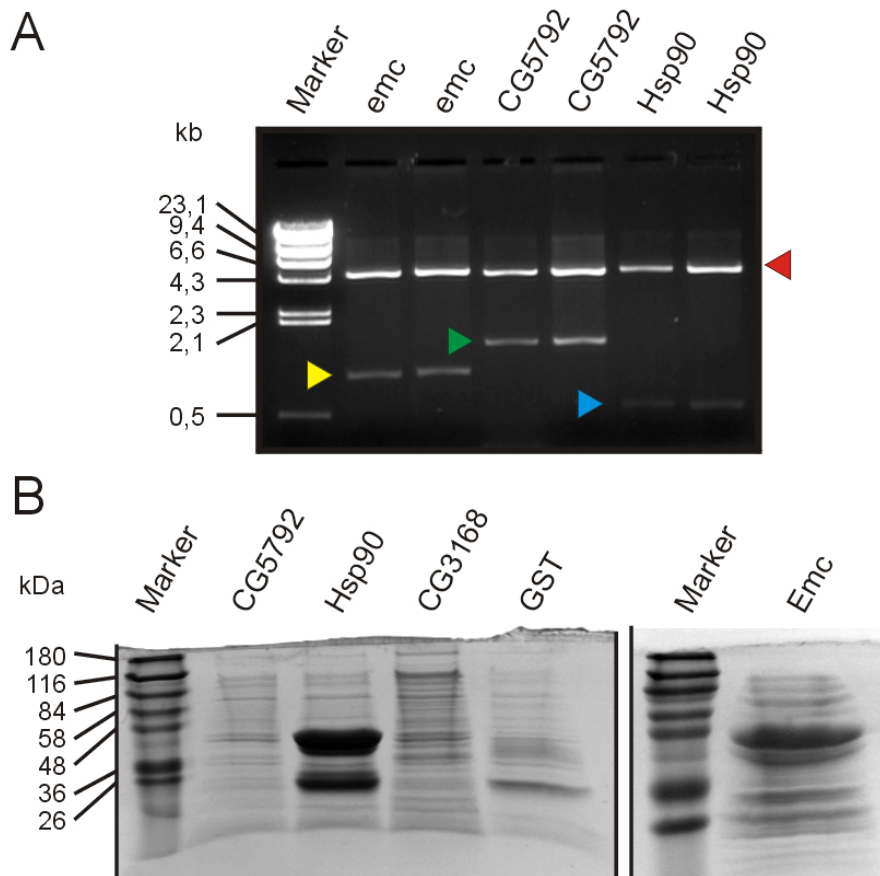


Abb. 46 Die Herstellung der GST-Hsp90- und GST-emc-Fusionsproteine für den Glutathion-*in vitro* Bindungstest. (A) zeigt ein 1% Agarosegel, auf dem die inserts der verschiedenen pGEX4T1-Vektoren zu sehen sind. Mit Hilfe einer Restriktionsdoppelverdauung mit EcoRI und XhoI wurden die inserts von (gelbes Dreieck) *emc*, (grünes Dreieck) CG5792 und (blaues Dreieck) Hsp90 herausgeschnitten und auf dem Gel aufgetrennt. Das rote Dreieck markiert die Bande des pGEX4T1-Vektors. Die DNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid gefärbt. Marker ist λ -DNA, geschnitten mit HindIII. (B) zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes Polyacrylamidgel auf dem die Fusionsproteine (Hsp90) GST-Hsp90 und (Emc) GST-EMC zu sehen sind (weitere Erläuterungen im Text).

Das rote Dreieck markiert die Bande für den ca. 4,9kb großen pGEX4T1-Vektor, das gelbe Dreieck zeigt die korrekt große *emc*-Bande, das gelbe Dreieck zeigt eine Bande mit der korrekten Größe für CG5792 und das blaue Dreieck die Bande mit der erwarteten Größe für das Teilstück der *hsp83*-DNA.

Abbildung 46B zeigt SDS-Polyacrylamidgele, die mit Coomassie-Blau gefärbt wurden. Auf dem linken Gel kann in der Spur "Hsp90" das GST-HSP90⁵³⁵⁻⁷¹⁷-Fusionsprotein erkannt werden, das durch Induktion des pGEX4T1-*hsp83*⁵³⁵⁻⁷¹⁷-Vektors in BL21-Zellen mit IPTG induziert wurde. Es besitzt eine Größe von ca. 40kDa. In der Spur "GST" ist die Negativkontrolle, nämlich nur das GST-Protein mit einer Größe von ca. 26kDa zu sehen. Die anderen Spuren, "CG5792" und "CG3168", zeigen kein Fusionsprotein. Das rechte Gel zeigt das ca. 45kDa große GST-Emc-Fusionsprotein in der "Emc"-Spur.

Abbildung 47A zeigt eine schematische Übersicht über die in Abb. 47B bis 47E verwendeten Proteine: das 534 Aminosäuren große Spaghetti-Protein mit seinen drei TPR-Motiven (schwarze Balken), das 432 (534-3x34) Aminosäuren große Spaghetti Δ TPR-Deletionsprotein, das 717 Aminosäuren große Hsp90-Protein von *Drosophila melanogaster*, das GST-Hsp90⁵³⁵⁻⁷¹⁷ Fusionsprotein, welches ein Fusionsprotein aus GST und dem im *yeast two-hybrid* System gefundenen C-terminalen Bereich des Hsp90-Proteins darstellt, sowie das GST-Emc-Fusionsprotein.

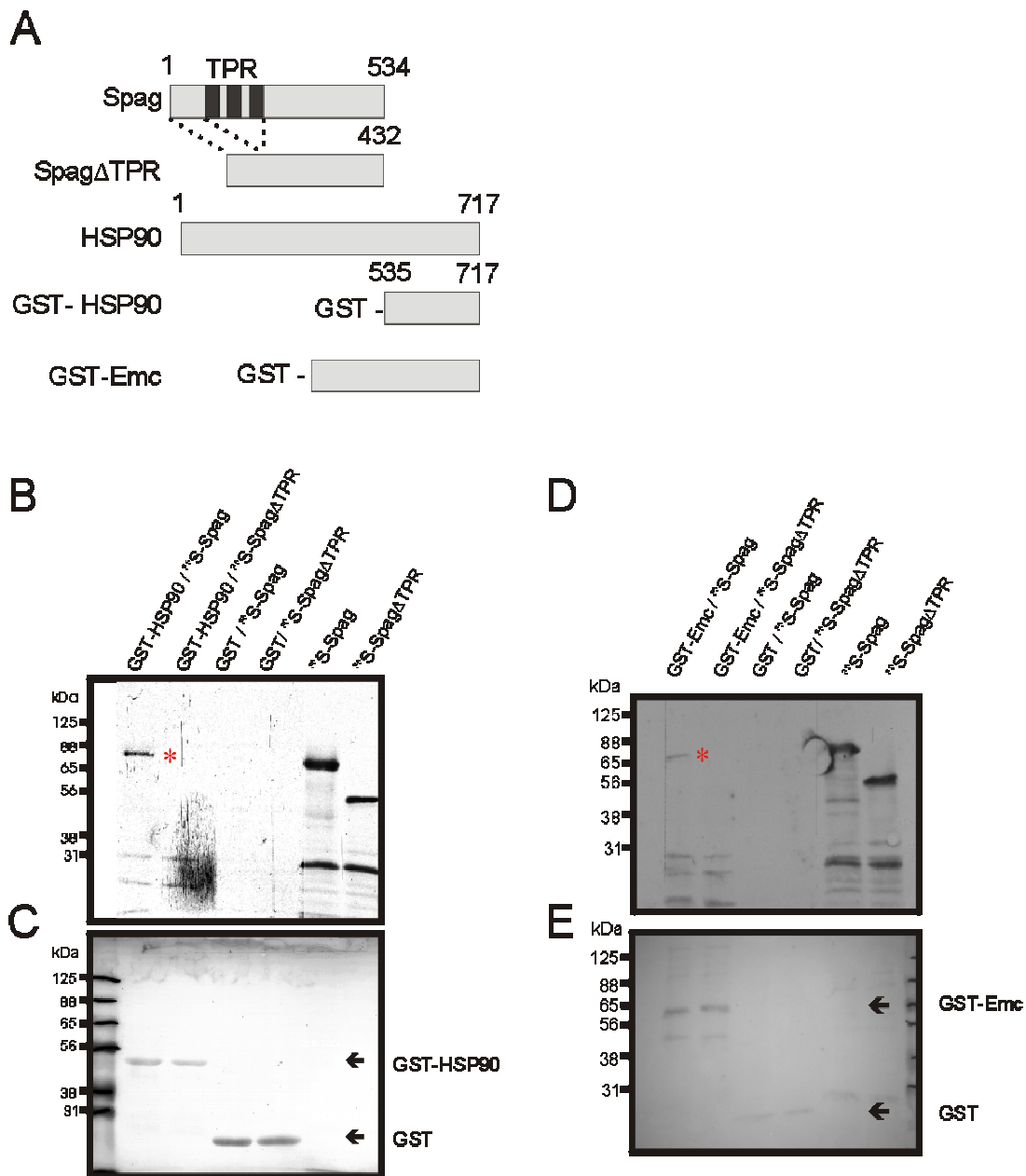


Abb. 47 Die GST-Hsp90- und GST-Emc-Fusionsproteine binden an das vollständige Spaghetti-Protein. (A) zeigt die für diesen Test verwendeten Proteine (Erläuterung im Text). (B) und (D) zeigen Autoradiogramme von den (C) und (E) Ponceau S gefärbten Polyacrylamidgelen. Radioaktiv markierte Spaghetti- bzw. Spaghetti Δ TPR-Proteine wurden mit den GST-Hsp90- bzw. GST-Emc-Proteinen inkubiert. Nach intensiven Waschen dieses Ansatzes, wurde das Proteingemisch auf einem Polyacrylamidgel separiert. Die

radioaktiven Spaghetti-Proteine sind nur dann nachzuweisen, wenn sie an den GST-Fusionsproteinen gebunden werden. Nur das vollständige Spaghetti-Protein kann mit den GST-Fusionsproteinen interagieren (Spuren mit dem roten Stern), nicht jedoch mit dem GST-Protein. Das Spaghetti Δ TPR-Protein kann weder mit den GST-Fusionsproteinen noch mit dem GST-Protein interagieren (weitere Erläuterungen im Text).

Abbildung 47B zeigt einen exponierten Röntgenfilm, auf dem das radioaktiv markierte Spaghetti-Protein an das GST-Hsp90⁵³⁵⁻⁷¹⁷-Fusionsprotein gebunden hat (Spur: GST-HSP90 / ³⁵S-Spag, roter Stern), das TPR-Domäne lose radioaktive Spaghetti Δ TPR-Protein band jedoch nicht (GST-HSP90 / ³⁵S-Spag Δ TPR). Die beiden nächsten Spuren sollen demonstrieren, dass weder das Spaghetti-Protein, noch das TPR-lose Spaghetti-Protein an das GST-Protein selbst binden kann (Spuren: GST / ³⁵S-Spag bzw. GST / ³⁵S-Spag Δ TPR). Die letzten beiden Spuren zeigen die beiden radioaktiv markierten Spaghetti-Protein-Varianten (Spaghetti: ca. 70kDa; Spaghetti Δ TPR ca. 55kDa). Abbildung 47C zeigt die Membran, mit der der Röntgenfilm von (B) exponiert wurde, gefärbt mit Ponceau-S Rot. Die Spuren GST-HSP90 / ³⁵S-Spag und GST-HSP90 / ³⁵S-Spag Δ TPR zeigen das GST-HSP90 Fusionsprotein, die Spuren GST / ³⁵S-Spag und GST / ³⁵S-Spag Δ TPR zeigen das GST-Protein selbst. Die radioaktiv markierten Spaghetti-Protein-Varianten sind in ihrer Konzentration zu gering, um als Protein sichtbar zu sein.

Die Abbildungen 47D und 47E stellen den gleichen Sachverhalt für das Emc-Protein dar, auch hier benötigt das GST-Emc-Fusionsprotein das komplette Spaghetti-Protein. HSP90 / ³⁵S-Spag und GST-HSP90 / ³⁵S-Spag Δ TPR zeigen das GST-HSP90 Fusionsprotein, die Spuren GST / ³⁵S-Spag und GST / ³⁵S-Spag Δ TPR zeigen das GST-Protein selbst.

Abbildung 48A zeigt eine *in vitro*-Translation des im *yeast two-hybrid* System gefundenen Gens CG5792.

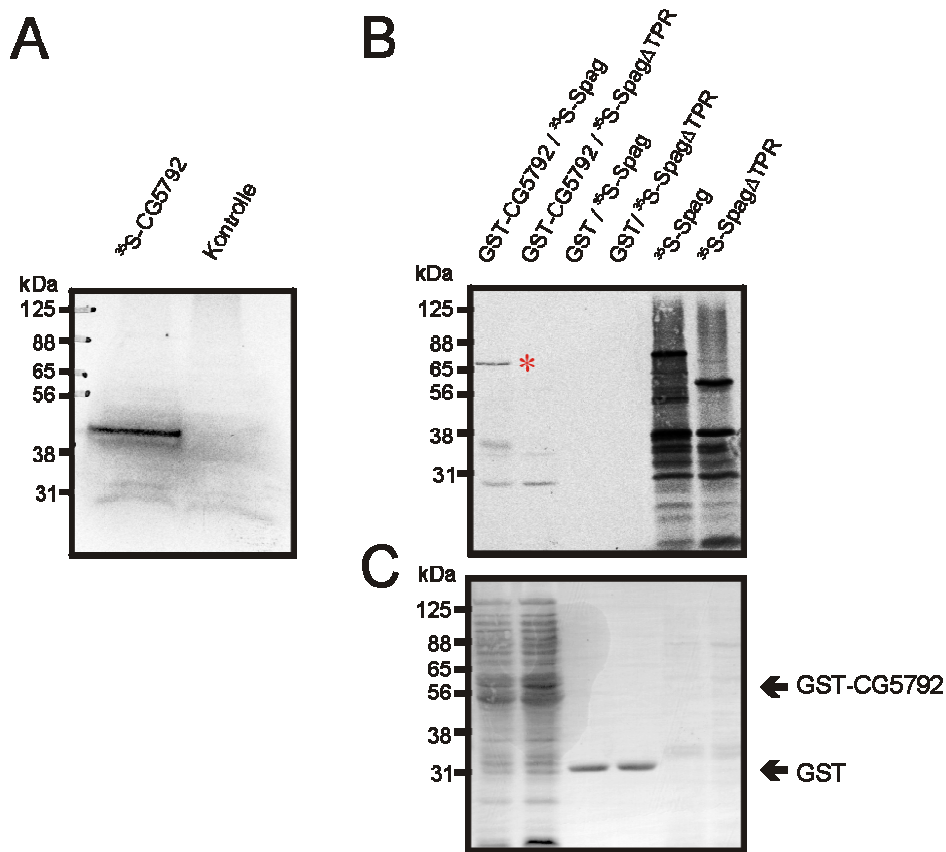


Abb. 48 Das GST-CG5792-Fusionsprotein bindet nur an das komplette Spagheti-Protein. (A) zeigt das radioaktiv markierte CG5792-Protein, das mit Hilfe einer *in vitro* Translation erzeugt wurde (weiter Erläuterungen im Text). Zu (B) und (C) siehe Erklärung in Abbildung 47 und im Text.

Sinn und Zweck dieses Versuchs war sicher zu gehen, ob die gefundene DNA tatsächlich ein offenes Leseraster (ORF) hat. Hierzu wurde die im *yeast two-hybrid* System isolierte DNA aus dem pAD-Vektor herausgeschnitten und in einen pBluescript-Vektor subkloniert. Dieser Vektor besitzt zwei Promotoren zur *in vitro*-Transkription oder *in vitro*-Translation (T7 bzw. T3). Die Spur ^{35}S -CG5792 zeigt deutlich eine Bande in der zu erwartenden Höhe von ca. 45 kDa, die durch *in vitro*-Translation mit Hilfe des T7-Promotors erzeugt und anschließend auf einem 12%igen SDS-Gel separiert wurde. Die Negativkontrolle, mit dem T3-Promoter erzeugt, zeigte keine Bande (Spur: Kontrolle).

Die Abbildung 48B und 48C demonstrieren, wie schon für Abbildung 47C bis 47E erläutert, die Bindung des Spagheti-Proteins mit der TPR-Domäne an das GST-CG5792-Fusionsprotein (Spur: GST-CG5792 / ^{35}S -Spag, roter Stern). Dieses Ergebnis entspricht nicht den *in vivo* im *yeast two-hybrid* System gefundenen Ergebnissen. Dort waren beide Spagheti-Varianten in der Lage, mit dem von CG5792 kodierten Protein zu interagieren. Hierfür gibt es zwei mögliche

Erklärungen: (1) das zusätzliche GST-Protein verändert die Konformation des GST-CG5792-Fusionsproteins in einer solchen Weise, dass zwar das Spaghetti-Protein mit der TPR-Domäne noch binden kann, die TPR-lose Variante jedoch nicht; (2) die TPR-lose Variante erfährt im *yeast two-hybrid* System einen bestimmten Faltungszustand, da es sich hierbei um ein *in vivo*-System handelt, welche es im *in vitro* GST-Bindungssystem nicht erhalten kann. Das Spaghetti-Protein mit der TPR-Domäne scheint auch *in vitro* noch in der Lage zu sein, an die Partnerproteine zu binden.

DISKUSSION

Diskussion

Die homozygoten *l(2)k12101*-Larven sterben als überalterte Drittlarvenstadien und zeigen atrophische Imaginalscheiben und melanotische (Pseudo-) Tumore

Der Fliegenstamm *l(2)k12101* wurde im Zuge eines *P*-Element-Mutagenese-Experiments isoliert. Dieses Experiment wurde 1993 in Ungarn von der Arbeitsgruppe Kiss mit dem Ziel durchgeführt, Tumorsuppressorgene zu mutieren, den Phänotyp zu analysieren und das betroffene Gen zu identifizieren (Török *et al.*, 1993). Der Fliegenstamm *l(2)k12101* wurde daraufhin in die folgenden, von den Autoren definierten Phänotypklassen eingeordnet: (1) in die "small-disc"-Klasse, aufgrund der sehr kleinen Imaginalscheiben und (2) in die "aberrant immune response (air)"-Klasse, aufgrund der melanotischen (Pseudo-) Tumore, welche die Autoren mit einer Autoimmunreaktion gegen körpereigenes abnormales Gewebe erklären.

Der Fliegenstock *l(2)k12101* wurde zunächst isogenisiert, um sekundäre Mutationen, welche die *P*-Element induzierte Mutation modifizieren könnten, zu eliminieren. Diese *P*-Element induzierte Mutation wurde auf FRT-Chromosomen zur Herstellung von genetischen Mosaiken rekombiniert. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Phänotyp homozygoter Larven des Ursprungsstamms von 1993 als auch der des nach Isogenisierung des zweiten Chromosoms hergestellten *FRT-P{lacW},spag[k12101]*-Stamms analysiert. In den mutierten Tieren wurde die Morphologie der winzigen Imaginalscheiben analysiert. Es konnte in den Imaginalscheiben ein nach wie vor einschichtiges Zellepithel erkannt werden, das jedoch eine abnormale Form besitzt. Dieses Zellepithel zeigt weder die normale Größe, noch ist es in den normalen palisadenartigen Strukturen organisiert. Die Zellen scheinen sich partiell zu überlappen. Mit Hilfe einer Kernfärbung konnten derbe basale Schichten von F-Aktin erkannt werden. Die Struktur der Imaginalscheiben ist nicht mehr vorhanden, so dass eine individuelle Identifizierung der unterschiedlichen Imaginalscheiben sehr schwierig ist. Mit Hilfe von *in situ*-Färbungen ganzer Larven mit Hilfe des *headcase*^{B5}-*lacZ* Allels konnten die einzelnen Imaginalscheiben identifiziert werden. Nach erfolgter Präparation dieser Imaginalscheiben ist eine Zuordnung jedoch kaum noch möglich.

Die Imaginalscheiben der homozygoten Larven von *l(2)k12101* zeigen Apoptose und anschließend eine partielle Kompensation der durch Apoptose eliminierten Zellen

Im Vergleich zu Imaginalscheiben des Wildtyps zeigen die Imaginalscheiben der Mutante eine deutlich höhere Anzahl von Acridinorange-positiven Zellen, was ein Hinweis auf übermäßigen Zelltod sein könnte. Diese Zellen sind im TUNEL-„assay“ ebenfalls positiv, woraus die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass es sich hierbei um Apoptose handelt. In den

Imaginalscheiben des Wildtyps konnten so gut wie keine TUNEL-positiven Zellen gefunden werden. Erstaunlicherweise werden die apoptotischen Imaginalscheiben der Mutante nicht durch Hämocyten (Makrophagen) eliminiert. Daher müsste es einen Mechanismus zur Kompensation der durch Zelltod eliminierten Zellen geben, der durch vermehrte Zellteilungen versucht, die Größe der Imaginalscheiben aufrecht zu erhalten. In nicht zu alten homozygoten Larven der Mutante konnten in der Tat Zeichen einer vermehrten Zellteilung gefunden werden, was Färbungen mit dem Mitosemarker Phospho-Histon3 belegen. In sehr alten Mutantenlarven scheinen die Imaginalscheiben aus entkernten Zellen zu bestehen („ghostcells“). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Imaginalscheiben nicht komplett apoptotisch sind, da sie sonst von den Hämocyten phagozytiert werden und daher abwesend sein müssten. Diese Beobachtung könnte ebenfalls einen Defekt in den hämatopoietischen Organen der Mutante reflektieren, in denen die Hämocyten hergestellt werden.

Die ektopische Expression des antiapoptotischen Proteins p35 kann die Apoptose nur zu einen geringen Teil verhindern.

Die Analyse der genetischen Mosaik von *l(2)k12101* zeigt, dass die Zellen innerhalb einer bestimmten Periode ihrer Entwicklung das Spag-Protein benötigen. Die Induktion von *spag*-Klonen innerhalb einer bestimmten Zeit führt zum Zelltod, der sich durch den Verlust von Regionen in der Kutikula der adulten Mosaikfliegen bemerkbar macht. Die FLP/ FRT-Technik besitzt den Nachteil, dass innerhalb einer Imaginalscheibe mehrere Klone zugleich generiert werden. Die frühe Expression der FLP-Rekombinase während der Entwicklung der Fliege bewirkt, dass die Entwicklung der Mosaiktiere nicht beendet werden kann. Sie sterben als Puppen mit multiplen Defekten in Kopf, Thorax und Flügeln. Die Induktion von *spag*-Klonen zu einem späteren Zeitpunkt erzeugt große Defekte mit fehlenden Regionen der Kutikula oder der Flügel. Jedoch können mutierte (markierte) *spag*-Zellen an den Grenzen der (fehlenden) *spag*-Klone gefunden werden. Schließlich erlaubt die Induktion von *spag*-Klonen zu einem noch späteren Zeitpunkt eine nahezu normale Entwicklung der Klone. Mit Hilfe dieser Analyse konnte ein Zeitfenster bestimmt werden, in dem das *spagbetti*-Gen während der Entwicklung benötigt wird (0-96h).

Die Inaktivierung von anderen Genen (z.B. *vestigial*) bewirkt eine partielle oder komplette Deletion ganzer Organen, insbesondere der Flügel (van de Bor *et al.*, 2000). Dieses Verhalten konnte bei *spag*-Klonen niemals beobachtet werden. Das bedeutet, dass es einen Mechanismus zur Kompensation durch Zellproliferation geben könnte. Die Vermutung der Kompensation durch Zellproliferation wurde überprüft, und in der Tat konnte an den Flanken der fehlenden

Regionen von *spag*⁻-Klonen eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen gefunden werden. Jedoch konnte niemals eine solch hohe Rate der Zellproliferation beobachtet werden, die die fehlenden Zellen der *spag*⁻-Klone kompensieren könnte. In spät induzierten *spag*⁻-Klonen konnte keine erhöhte Zellproliferation festgestellt werden, da die *spag*⁻-Klone ab diesem Zeitpunkt überleben können. Die Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass die Rate des Zelltods in keinem Fall durch die erhöhte Zellproliferation kompensiert werden kann. Im Vergleich zum Verhalten von genetischen Mosaiken anderer mutierter Gene würde das bedeuten, dass die *spag*⁻-Klone sich zunächst normal teilen können. Wenn jedoch eine kritische Konzentrationsschwelle des Proteins (durch die Verdünnung des noch vorhandenen Proteins während der ersten Zellteilungen der induzierten Klone) unterschritten wird, sterben diese Zellen, wobei das benachbarte (Wildtyp)-Gewebe nicht in der Lage ist diesen Verlust zu kompensieren. In den genetischen Mosaiken sind die Hämocyten überwiegend vom Wildtyp (heterozygot) und können daher die *spag*⁻-sterbenden Zellen eliminieren. In *spag*⁻-Mutanten hingegen sind die Hämocyten ebenfalls mutiert und daher möglicherweise nicht in der Lage, die *spag*⁻-Klone zu eliminieren. Dies könnte erklären, warum in alten mutierten Larven kernlose Imaginalscheiben gefunden werden können, hingegen in den genetischen Mosaiken nicht einmal in großen Arealen von *spag*⁻-sterbenden Zellen *spag*⁻-Zellen gefunden werden können. Diese *spag*⁻-sterbenden Zellen werden offensichtlich sofort von den heterozygoten Hämocyten eliminiert.

In einer Arbeit von Milan *et al.*, 1997, konnte nach Induktion von Zelltod in den Expressionsmustern von *en* und *stg* ein starker Anstieg von Zellteilungen beobachtet werden. Doch nicht nur die Induktion von Zelltod zeigt einen anschließenden kompensatorischen Effekt durch vermehrte Zellproliferationen. Bestimmte Mutationen der Gene *en* (*en*^l), *dpp* (*dpp*^{d5}), *Cbx* (*Cbx*^{M1}) und *bx* (*bx*^{34e}) verursachen ebenso einen vermehrten Zelltod (Milan *et al.*, 1997), dem eine anschließende Kompensation folgt. Diese Aktivität kann dadurch erklärt werden, dass der Verlust von Zellen durch Apoptose auch einen Verlust von inhibitorischen Zell- zu Zellkontakten darstellt.

Das Spag-Protein liegt in Embryonen phosphoryliert vor, was durch Dephosphorylierungsexperimente gezeigt werden konnte. Die Funktion dieser Phosphorylierung ist bislang unklar. Vergleichende Untersuchungen an Proteinextrakten von S2-Zellen (*Drosophila melanogaster*-Zellkultur), Embryonen und Larven zeigte, dass das Spag-Protein während der Embryonalentwicklung eine Modifikation erfährt, da es in der SDS-PAGE eine andere Mobilität im Gel besitzt. Analyse der Aminosäuresequenz mit dem ISREC-Programm (<http://www.expasy.com>) ergab 31 putative Phosphorylierungsstellen, und in der Tat konnte die Mobilität des Proteins durch Behandlung mit konzentrierter alkalischer

Phosphatase verändert werden. Ob das Spag-Protein ausschließlich durch Phosphorylierung modifiziert wird, kann hiermit jedoch nicht nachgewiesen werden.

Das Spaghetti-Protein ist auch im Zellkern nachweisbar

Es wurden zwei Analysen durchgeführt, um die Funktion des Spag-Proteins biochemisch zu untersuchen. Die erste Analyse beschäftigt sich mit der interzellularen Lokalisierung des Spag-Proteins. Hierzu wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Embryonen für das Spag-Protein, für DNA und für Lamin durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Spag-Protein sowohl im Zytoplasma, als auch in den Kernen nachweisbar ist. Interessanterweise akkumuliert das Spag-Protein an der Kernlamina während der Interphase der syncytialen Kernteilungen. Ab der vierzehnten Zellteilung jedoch ist das Spag-Protein gleichmäßig im Zytoplasma wie auch im Kern verteilt. Während der Gastrulation kann eine deutliche Akkumulierung des Spag-Proteins in den Kernen der posterioren Rudimente des Mitteldarms beobachtet werden, wo hingegen in den anderen Geweben das Spag-Protein überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Lokalisierung des Spag-Proteins im Kern kann durch die Beobachtung von Koloalisierungen des Spag-Proteins mit Teilen des Chromatins wie auch mit Lamin in der konfokalen Laserscanningmikroskopie bestätigt werden. Ebenso konnten biochemische Untersuchungen von embryonalen Kernextrakten zeigen, dass auch hier das Spag-Protein im Kern gefunden werden kann.

Während der Oogenese und der Spermatogenese kann das Spag-Protein in den somatischen Zellen gefunden werden. Es konnte keine Expression des Proteins in den Zellen der Keimbahn gefunden werden. Der zweite interessante Aspekt der Expression des Spag-Proteins zeigt sich in den Follikelzellen. Während der frühen Oogenese kann im Germarium und in etwas älteren Eikammern das Spag-Protein in nahezu allen Follikelzellen nachgewiesen werden. In den späteren Eikammern ist das Protein nur noch in einem geringen Teil dieser Zellen und letztendlich nur noch in den Follikelzellen über der Oocyte nachweisbar. Interessanterweise kann das Spag-Protein nur auf einer Seite der Follikelzellen erkannt werden, vorzugsweise auf der anterioren Seite. Die Funktion dieser Verteilung ist bisher unbekannt. Üblicherweise sind die Proteine, welche in den Follikelzellen exprimiert werden, ubiquitär verteilt. Es gibt einige Beispiele von Proteinen, die in nur einer bestimmten Untergruppe von Follikelzellen, „border“-Zellen und posterioren Zellen exprimiert sind. Jedoch konnte nur für das NAP-1 Protein ein solches stochastisches Verteilungsmuster gefunden werden, das dem des Spag-Proteins ähnelt. Im Unterschied zur apikolateralen Lokalisierung des Spag-Proteins auf einer Seite der Plasmamembran zeigt das NAP-1 Protein eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma bestimmter Follikelzellen. Was könnte die Funktion dieser polarisierten und auf bestimmte

Follikelzellen beschränkten Expression des Spag-Proteins sein? Hierüber können nur spekulative Interpretationen gemacht werden. Die Art der Verteilung des Proteins könnte mit einer möglichen Chaperon-Aktivität in nur bestimmten Zellen verbunden sein. Das Spag-Protein könnte in diesen bestimmten Zellen an dem Zusammenbau von Rezeptoren, welche für Signaltransduktionsvorgänge benötigt werden, beteiligt sein.

Ektopische Expression des Spaghetti-Proteins mit Hilfe der UAS/ GAL4-Methode zeigt einen geringen Effekt auf die Entwicklung der Taufliege

Es wurden transgene Fliegen hergestellt, die ein UAS-FLAG-Spaghetti-Konstrukt tragen. Dieses Konstrukt wurde mit Hilfe verschiedener GAL4-Quellen exprimiert und der Effekt auf die Entwicklung der Fliege beobachtet. Es konnte das ektopische, FLAG-markierte Protein im Proteinextrakt der entsprechenden Tiere nachgewiesen werden. Ebenso wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem anti-FLAG-Antikörper durchgeführt. Das ektopische Protein verhielt sich hierbei wie sein endogenes Gegenstück: es ist in den Imaginalscheiben im Zytoplasma exprimiert und, im Falle von polyploidem Gewebe, im Kern nachweisbar.

Trotz der relativ hohen Menge des ektopischen Proteins sind die Auswirkungen auf die Entwicklung der Fliege minimal. Die Imagines zeigten Abnormalitäten der scutellaren Makrochaeten auf dem Thorax sowie Extravenen auf den Flügeln. Dieser Effekt konnte durch die Verwendung verschiedener GAL4-Quellen intensiviert oder abgeschwächt werden, je nach dem durch die GAL4-Quelle definierten Zeitpunkt der GAL4-Protein-Translation. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Effekte tatsächlich durch die ektopische Expression des FLAG-Spaghetti-Proteins hervorgerufen wurden und nicht unspezifische Effekte sind. Über die Funktionsweise des Spaghetti-Proteins kann nur insofern eine Aussage gemacht werden, als dass die ektopische Expression des Proteins (1) keine Letalität hervorruft und (2) eine Veränderung der Organisation des Zytoskeletts bestimmter Zellen verursacht. Diese Aussage ist durch die Ergebnisse der genetischen Mosaik, in denen ebenfalls deutliche Veränderungen in Zellform und Zelldifferenzierung gefunden wurden, bestätigt.

Das Spaghetti-Protein interagiert im yeast two-hybrid System mit dem Hsp90-Protein und den Produkten der Gene CG5792, CG3168, CG13849, CG8615 und CG2957

Das Spag-Protein interagiert mit dem Hsp90-Protein im *yeast two-hybrid* System (nachzulesen in meiner Diplomarbeit von 1998). Das Hsp90-Protein ist an nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. Protein-Transport, Signal-Transduktion, DNA-Replikation und Protein-Synthese (Hartl *et al.*, 1996).

Diese Analyse des Spag-Proteins wurde mit neueren Systemen fortgesetzt. Im Zuge dieser Forschung konnten zwei große Gruppen von mit dem Spag-Protein interagierenden Proteinen identifiziert werden. Das Hsp90-Protein und eine neues Protein mit bislang unbekannter Funktion. Das ihm zugehörige Gen (*CG5792*) ist auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms lokalisiert (33F2-3) und besitzt Homologe in anderen Spezies (*Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum* und *Saccharomyces cerevisiae*). Es kodiert für zwei splicosomale Isoformen (355AA und 1056AA), welche eine sog. „TonB-dependend-receptor“-Domäne (in beiden Proteinen von Aminosäure 52 bis 59) besitzen. In *E. coli* interagiert das TonB-Protein mit äußeren Membran-Rezeptor-Proteinen, welche am Transport von Substraten in den periplasmatischen Raum verantwortlich sind. In Abwesenheit des TonB-Proteins können die äußeren Membran-Rezeptor-Proteine zwar ihr Substrat binden, es jedoch nicht ins Innere transportieren. Weitere bekannte Proteine in *Drosophila*, welche ebenfalls diese Domäne besitzen, sind die kleinen Hitzeschockproteine Hsp23, Hsp26 und Hsp27 und weitere Proteine, die an „chaperoning“-Prozessen beteiligt sind (*CG7409*, *Ogf*).

Mit Hilfe des *yeast two-hybrid* Systems sowie des GST-*in vitro*-Bindungssystems konnte gezeigt werden, dass das Spag-Protein zur Bindung des Hsp90-Proteins die TPR-Domäne benötigt. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da in vielen Publikationen bereits die TPR-Domänen abhängige Bindung von Hsp90 an TPR-Proteine beschrieben wurde (Scheufler *et al.*, 2000). Das neu gefundene TonB-Protein benötigt zur Bindung an das Spag-Protein die TPR-Domäne hingegen im *yeast two-hybrid* System nicht. Im GST-*in vitro*-Bindungssystems konnte diese Ergebnis nicht bestätigt werden, was auf unzureichende Faltung des TPR-losen Spag-Proteins im *in vitro*-System zurückgeführt wurde.

Im *yeast two-hybrid* System konnten vier weitere, neue mit dem Spag-Protein interagierende, Proteine isoliert werden, jedoch nur in geringer Anzahl. Das könnte bedeuten, dass diese Protein relativ selten vorkommen. Die mögliche Funktion eines dieser Proteine könnte der Transport von Substrat von der Plasmamembran zum Kern sein. Die verbliebenen drei Proteine scheinen alle eine Rolle in der ribosomalen Biosynthese zu spielen.

Zu den seltenen, mit dem Spag-Protein interagierenden Partner-Proteinen gehört das Produkt des Gens *CG3168*, einem vermutlichen Transporter, der in der Plasmamembran sitzt. Auch hier konnten Homologe in anderen Spezies (*C. elegans*, *Homo sapiens*, *M. musculus*, *S. cerevisiae* und *R. norvegicus*) gefunden werden. Das Gen ist in der chromosomalen Region 6C9-10 auf dem X-Chromosom lokalisiert. Ein weiterer, mit dem Spag-Protein interagierender Partner wurde als Produkt des Gens *CG13849* identifiziert, einem vermutlichen Transkriptionsfaktor, der an dem

Prozessieren von prä-rRNA beteiligt zu sein scheint. Auch hier konnten Homologe in anderen Spezies gefunden werden (*C. elegans*, *G. gallus*, *H. sapiens* und *M. musculus*). Das Gen kartiert auf dem dritten Chromosom an Position 94B1-2. Ein weiterer, mit dem Spag-Protein interagierenden Partner wurde als Produkt des Gens *CG8615* identifiziert, ein ribosomales Protein (L18), welches ebenfalls in *C. elegans*, *H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus* und *S. cerevisiae* als Homolog existiert. Den Abschluss der mit dem Spag-Protein interagierenden Proteine bildet das Produkt des Gens *CG2957*, welches wahrscheinlich ein Strukturprotein der Ribosomen ist. Hier konnte ein Homolog in *C. elegans* identifiziert werden. Das Gen kartiert auf dem dritten Chromosom an der Position 84E1. Interessanterweise sind die letzten drei genannten Gene an der Biogenese der Ribosomen beteiligt. In einer Arbeit von Giordano *et al.*, 1999, wird über eine Mutation in einem Gen namens *minifly* berichtet, welches eine zentrale Rolle an der ribosomalen RNA-Prozessierung spielt. Ein Verlust der Genfunktion führt hierbei, wenn kein *minifly*-Protein translatiert wird, zur Letalität und wenn Protein in nur geringer Menge vorhanden ist, zur Apoptose (Giordano *et al.*, 1999). Es wurden Kreuzungen zwischen den Mutanten dieser Fliegen und *l(2)k12101*-Mutante angesetzt, um eine genetische Interaktion aufzuzeigen. Eine signifikante Interaktion konnte jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Um die im *yeast two-hybrid* System gefundene, und im GST-Bindungstest bestätigte, Interaktion zwischen dem Spag-Protein und dem Hsp90-Protein in der Fliege näher zu untersuchen, wurden umfangreiche Kreuzungen zwischen Fliegen mit einem mutierten *hsp83*-Allel und Fliegen mit einem mutierten *spaghetti*-Allel verpaart. Es können so dosisabhängige Effekte analysiert werden. Obwohl in einigen Kreuzungen ein deutlicher abnormaler Phänotyp zu sehen war, der dem glich, der in den genetischen Mosaiken zu sehen war, waren diese Ergebnisse nicht reproduzierbar. Der Grund hierfür liegt mutmaßlich an dem Phänotyp der *hsp83*-Parentalstämme an sich. Wie in einer Arbeit von Rutherford *et al.*, 1998, beschrieben, zeigen Fliegen mit verschiedenen mutierten *hsp83*-Allelen selbst in heterozygoten Bedingungen spontane abnormale Phänotypen in den Imagines, die sogar genetisch stabilisiert werden konnten. Aufgrund dessen kann nicht bestimmt werden, ob der Phänotyp der transheterozygoten (*spag*-defizient / +; *hsp83*-defizient / +)-Fliegen tatsächlich durch Reduktion der Menge der beiden Proteine zustande kommt oder lediglich durch spontane Ereignisse, die durch das mutierte *hsp83*-Allel alleine verursacht werden.

Ein Modell zur Erklärung der Funktion des Spagheti-Proteins in der Entwicklung von Drosophila melanogaster

Das Spag-Protein könnte Teil eines Chaperon-Komplexes sein. Es interagiert sowohl im *yeast two-hybrid* System als auch im GST-Bindungstest mit dem Hsp90-Protein. Ebenso scheint das Spag-Protein an Proteine zu binden, welche eine „TonB-dependend-receptor“-Domäne besitzen. Diese Domäne besitzen unter anderem die kleinen Hitzeschockproteine (Hsp23, Hsp26 und Hsp27). Kürzliche Untersuchungen von I. Török *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass das Spag-Protein sich in einem hochmolekularen Proteinkomplex befindet, in dem neben Hsp90 auch noch das Hitzeschockprotein Hsc70 und wiederum die kleinen Hitzeschockproteine identifiziert werden konnten (Török, persönliche Mitteilung). Die Funktionen der Chaperone sind unter anderem neu translatierten Proteinen den Transport durch Kanäle, wie z.B. die Kernporen, zu erleichtern oder Proteine das Erreichen einer bestimmten dreidimensionalen Konformation zu ermöglichen. Diese Konformation könnte bestimmte Proteine aktivieren oder gegen den Abbau durch das Proteasom-System schützen.

Unter diesem Aspekt betrachtet, könnte die interzelluläre Verteilung des Spag-Proteins während der Embryogenese die vermutete Chaperon-Funktion bestätigen. Das Spag-Protein ist während der Interphase sich schnell teilender Zellen zunächst an der Kernlamina konzentriert. Diese Lokalisierung kann auch erwartet werden, da zum einen unzählige maternal synthetisierte Proteine in den Kern transportiert werden müssen, um dort an das Chromatin zu binden, und zum anderen viele Enzyme, die an der DNA-Replikation beteiligt sind, ebenfalls in den Kern transportiert werden müssen. Bis zum Zellzyklus 13 werden, mit Ausnahme in den Polzellen, in den Embryonen von *Drosophila* keine Proteine synthetisiert. Dann jedoch beginnt eine intensive Proteinsynthese in der unter anderem sehr wichtige Proteine synthetisiert werden, die an Musterbildungsprozessen beteiligt sind. Im Zuge dieses Prozesses können Proteine gefunden werden, die nur im Zytoplasma lokalisiert sind, als auch Proteine, die im Kern lokalisiert sind wie z.B. Transkriptionsfaktoren. Die Beobachtung, dass das Spag-Protein zu diesem Zeitpunkt sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nachweisbar ist, könnte diese Theorie unterstützen. Während der späteren Entwicklungsstadien kann das Spag-Protein, mit einigen Ausnahmen, nur noch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Das würde bedeuten, dass der größte Teil der Proteine, welche an der Morphogenese beteiligt sind, im Zytoplasma lokalisiert sind.

Während der larvalen Entwicklung ist die Expression des Spag-Proteins deutlich geringer als während der Embryogenese. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen kann beobachtet werden, dass das Spag-Protein zum einen sehr wenig vorhanden und zum anderen auf bestimmte Organe, wie z.B. die Imaginalscheiben der Larve beschränkt ist. Die Gesamtheit der

Zellen der Imaginalscheiben ist zunächst sehr viel geringer als die Zellen eines Embryos, und darüber hinaus teilen sich die Zellen der Imaginalscheiben viel langsamer als die Zellen des Embryos. Diese beiden Aspekte könnten die geringe Menge an Spag-Protein während der larvalen Entwicklung erklären - es wird weniger Spag-Protein benötigt. Die Abwesenheit des Spag-Proteins jedoch hat einen dramatischen Effekt auf diese Zellen. Ein Programm zum Zelltod wird aktiviert, das das Resultat einer stetigen Zunahme an ungefalteten Proteinen sein könnte. Die Imaginalscheiben der *spag*-mutierten Larven sterben, werden jedoch von den Hämocyten nicht so effizient phagozytiert wie in den genetischen Mosaiken. Die Erklärung hierfür könnte ein Defekt in den Hämocyten der Mutante sein, die die sterbenden Zellen nicht mehr erkennen und eliminieren können. In alten *spag*-mutierten Larven konnten kernlose Imaginalscheiben gefunden werden, hingegen werden alle *spag*-Zellen in den Mosaiken sofort eliminiert.

In *Drosophila* ist das Überleben der Zellen mehr von inneren Faktoren abhängig als von positiven oder negativen äußeren Faktoren. In den *spag*-Zellen könnte sich aufgrund der Menge an fehlerhaft gefalteten Proteinen ein Mechanismus des programmierten Zelltods aktivieren.

Die ungewöhnliche Verteilung des Spag-Proteins in den Follikelzellen ist relativ schwer zu erklären. Falls die Verteilung diese Proteins Regionen mit intensiver Chaperon-Aktivität widerspiegelt, würde dies bedeuten, dass es spezielle Regionen in den Follikelzellen geben müsste, in denen eine hohe Chaperon-Aktivität benötigt wird. Bis zu diesem Zeitpunkt ist nur eine Interpretation dieser Beobachtung denkbar. Dieses spezifische Verteilungsmuster könnte auf einem Transport von bestimmten Dotterproteinen aus der Hämolymphe in die Eikammer beruhen. Dieses Gebiet ist jedoch zur Zeit noch völlig unerforscht. Da das Spag-Protein vor allem in den Follikelzellen exprimiert ist, die über der Oocyte liegen, könnte das Spag-Protein an einem Prozess der Endo- und Exozytose beteiligt sein, welcher in den Follikelzellen abläuft. Es ist jedoch schwer zu begreifen, warum dieser Prozess nur in bestimmten Follikelzellen ablaufen sollte. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass in einigen Zellen eine Protein(um)faltung benötigt wird, die an der Strukturbildung von Epithelzellen beteiligt ist.

Für zukünftige Untersuchungen sollte die Frage beantwortet werden, warum die Hämocyten der Mutante nicht in der Lage sind, die sterbenden Zellen zu phagozytieren. Hierzu könnte das folgende Experiment durchgeführt werden: *E93*, ein Ecdyson induziertes Gen, kodiert für einen Transkriptionsfaktor und wird zur Eliminierung von sterbenden Zellen benötigt. *E93* scheint die Synthese von Proteinen zu aktivieren, welche für die Markierung der sterbenden Zellen für die Hämocyten zuständig sind; sogar dann, wenn diese sterbenden Zellen nicht die Killergene

reaper, *hid* oder *grim* exprimieren. Mit Hilfe von ektopischer Expression von *E93* könnte getestet werden, ob Zellen, die *E93* exprimieren, in einer *spag*-Umgebung überleben können. Im Wildtyp müssten diese Zellen hingegen sterben.

MATERIAL UND METHODEN

Färbungen mit X-Gal („headcase-BJ-Färbungen“)

1M Zitronensäure

210,4g der Zitronensäure [Fluka] wurde auf 1l in destillierten Wasser gelöst.

Phosphat-Citrat Puffer

Es wurden 1,78g Na_2HPO_4 [Fluka] • $2\text{H}_2\text{O}$ in 50ml destilliertem Wasser gelöst. Hiervon wurden 27ml genommen und zu 3ml einer 0,1M Zitronensäure gegeben und auf 60ml mit Wasser eingestellt.

Inkubations Puffer

Zu 20ml des Phosphat-Citrat Puffers wurden 33mg Potassium Ferricyanid [ICN] und 42mg Potassium Ferrocyanid [ICN] und 0,2 ml einer 2% Triton X-100 [Merck] Lösung gegeben.

Fixierungspuffer

Der Puffer wurde frisch durch Zugabe von 4ml einer 37% Formaldehydlösung [Merck] zu 46ml Phosphat-Citrat Puffer hergestellt.

Einbettmittel

Zur letztendlichen Montage der Gewebe für die Mikroskopie wurde eine 50% Inkubationspuffer- und 50% Glycerol- [Merck] Lösung hergestellt.

X-Gal [AppliChem]

Das Gewebe wurde in 1xPBS auf Eis in einem kleinen Glasblöckchen präpariert und anschließend für 20min, bei RT, im Fixierungspuffer fixiert. Das fixierte Gewebe wurde drei mal mit Phosphat-Citrat Puffer gewaschen. Der Phosphat-Citrat Puffer wurde durch den Inkubations-Puffer ersetzt. Mit Hilfe eines Zahnstochers wurde eine Spitze voll X-Gal zugegeben. Das Glasschälchen wurde anschließend mit Aluminiumfolie lichtdicht versiegelt und mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Das Gewebe wurde im Einbettmittel abschließend auf einem Objektträger präpariert und mit einem Deckglas versehen. Mit Hilfe von Nagellack wurde das Deckglas versiegelt. Diese Präparate sind mehrere Monate im Dunkeln haltbar. Die Präparate wurden mit Hilfe eines Mikroskops [LeicaDMR] mit Videokamera [Spot] mit Normallicht mikroskopiert.

Immunfluoreszenzdoppelfärbung für die konfokale Laserscanningmikroskopie zur Darstellung von Aktin und DNA in den Imaginalscheiben im gleichen Farbkanal

Fixierungspuffer

Der Puffer wurde frisch durch Zugabe von 4ml einer 37% Formaldehydlösung [Merck] zu 46ml 1xPBS hergestellt.

Phalloidin-Rhodamin [Sigma]

Propidium-Jodid [Sigma]

Einbettmittel

Zur letztendlichen Montage der Gewebe für die Mikroskopie wurde entweder Vectashield [Vector] oder das slow antifade Kit [Biomol] verwendet.

Das Gewebe wurde in 1xPBS auf Eis in einem kleinen Glasblöckchen präpariert und anschließend für 20min bei RT im Fixierungspuffer fixiert. Das fixierte Gewebe wurde drei mal mit 1xPBS gewaschen. Es wurden 1ml der Färbelösung zugegeben (10µl des Phalloidin-Rhodamin Stocks [Endkonzentration 1µg/ml] sowie 5µl des Propidium-Jodid Stocks und 50µl RNaseH [Stockkonzentration 10mg/ml] add 1ml mit 1xPBS). Es wurde im Dunkeln für 2h bei RT inkubiert. Es wurde anschließend drei mal mit 1xPBS gewaschen. Das Gewebe wurde in Vectashield oder slow antifade abschließend auf einem Objektträger präpariert und mit einem Deckglas versehen. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt. Diese Präparate sind nur kurze Zeit im Dunkeln bei 4°C haltbar. Die Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops [Zeiss LSM410] in verschiedenen Ebenen gescannt und anschließend mit einer Bildbearbeitungssoftware [Adobe Photoshop4] prozessiert.

Immunfluoreszenzdoppelfärbung für konfokale Laserscanningmikroskopie zur Darstellung von Aktin und DNA in den Imaginalscheiben in zwei Farbkanälen

Fixierungspuffer

Der Puffer wurde frisch durch Zugabe von 4ml einer 37% Formaldehydlösung [Merck] zu 46ml 1xPBS hergestellt.

Phalloidin-Alexa488 [Biomol]

To-Pro3 Jodid [Biomol]

Einbettmittel

Zur letztendlichen Montage der Gewebe für die Mikroskopie wurde entweder Vectashield [Vector] oder das slow antifade Kit [Biomol] verwendet.

Das Gewebe wurde in 1xPBS auf Eis in einem kleinen Glasblöckchen präpariert und anschließend für 20min bei RT im Fixierungspuffer fixiert. Das fixierte Gewebe wurde drei mal mit 1xPBS gewaschen. Es wurden 1ml der Färbelösung zugegeben (25µl des Phalloidin-Alexa488 Stocks [Endkonzentration 1µg/ml] sowie 1µl des To-Pro3 Jodid Stocks und 50µl RNaseH [Stockkonzentration 10mg/ml] add 1ml mit 1xPBS). Es wurde im Dunkeln für 2h bei RT inkubiert. Es wurde anschließend drei mal mit 1xPBS gewaschen. Das Gewebe wurde in Vectashield oder slow antifade abschließend auf einem Objektträger präpariert und mit einem Deckglas versehen. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt. Diese Präparationen sind nur kurze Zeit im Dunkeln bei 4°C haltbar. Die Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops [Zeiss LSM410] in verschiedenen Ebenen gescannt und anschließend mit einer Bildbearbeitungssoftware [CorelPhotoPaint9] prozessiert.

Darstellung von Imaginalscheiben im Phasenkontrast.

Fixierungspuffer

Der Puffer wurde frisch durch Zugabe von 4ml einer 37% Formaldehydlösung [Merck] zu 46ml 1xPBS hergestellt.

Einbettmittel

Zur letztendlichen Montage der Gewebe für die Mikroskopie wurde Elvanol (Fluka) verwendet.

Das Gewebe wurde in 1xPBS auf Eis in einem kleinen Glasblöckchen präpariert und anschließend für 20min bei RT im Fixierungspuffer fixiert. Das fixierte Gewebe wurde drei mal mit 1xPBS gewaschen. Das Gewebe wurde in Elvanol abschließend auf einem Objektträger präpariert und mit einem Deckglas versehen. Diese Präparationen sind lange Zeit bei 4°C haltbar. Die Präparate wurden mit Hilfe eines Mikroskops [LeicaDMR] mit Videokamera [Spot] im Phasenkontrast mikroskopiert.

***Isolation von genomischer DNA aus einzelnen Drosophila melanogaster Fliegen:
"squishing" Methode von W.R. Engel's Labor***

Squishing Puffer

10mM Tris- (Fluka) HCl (Merck) pH8,2; 1 mM EDTA (Fluka); 25mM NaCl (Fluka);
Proteinase K (Roche) 200µg/µl

Eppendorfreaktionsgefäße 1,5ml (Eppendorf)

Heizblock (Eppendorf)

Zentrifuge (Eppendorf)

Zahnstocher (Aldi)

Es wurde unmittelbar vor der Benutzung der "squishing" Puffer hergestellt: 1,5ml von 1M Tris HCl pH8,2; 0,3ml von 0,5M EDTA; 0,75ml von 5M NaCl und 147,45ml Wasser. Zu je 1ml "squishing" Puffer wurde 16µl Proteinase K (200µg/µl) gegeben. Diese Lösung wird im folgenden als "squishing solution" bezeichnet. Eine Fliege wurde mit Hilfe eines Zahnstochers in 50µl der "squishing solution" in einem sterilen Eppendorfreaktionsgefäß zerdrückt. Die Lösung wurde 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 5min auf 85°C erhitzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 2min bei RT zentrifugiert. Das Reaktionsgefäß wurde in dieser Form bei 4°C bis zur Benutzung verwahrt. Ein Öffnen des Gefäßes sollte vor der Benutzung aufgrund möglicher Kontamination mit DNasen vermieden werden.

Isolation von genomischer DNA aus Larven von Drosophila melanogaster: G. Rubins Labor

Lösung A

0,1M Tris-(Fluka) HCl (Merck) pH 9,0; 0,1M EDTA (Fluka); 1% SDS (Merck); 1% DEPC (Sigma)

3M Kaliumacetate (Fluka)

Isopropanol (Merck)

Ethanol (Merck)

Homogenisator 5ml (altes Laborinventar)

Eppendorfreaktionsgefäße 1,5ml (Eppendorf)

Heizblock (Eppendorf)

Zentrifuge (Eppendorf)

Es wurden 20 bis 30 Larven in einem gekühlten 5ml Homogenisator gesammelt. Es wurden hierzu 500µl der Lösung A (0,5ml 1M Tris-HCl, pH 9,0; 1ml 0,5M EDTA; 250µl 20%SDS; 50µl DEPC; 3,225 ml Wasser) gegeben. Die Larven wurden auf Eis für etwa 2min homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurde die Lösung für 25 min auf 70°C erhitzt. Es wurde 150µl 3M Kaliumacetat zugegeben. Es wurde für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 15min, 4°C, 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß transferiert und mit 0,5 Volumen Isopropanol, bei RT, präzipitiert. Es wurde für 5min, bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 50µl Wasser gelöst.

PCR (Polymerase-chain-reaction) von genomischer DNA zur Amplifizierung der Exone und Introne des spaghetti-Gens

Genomische DNA von homozygoten *l(2)k12101* Larven, homozygoten Larven der Konvertante *Rev1*, und Wildtyp OregonR Larven.

Taq-Polymerase [Promega]
dNTPs [Promega]
10xReaktionspuffer [Promega]
MgCl₂ [Promega]
PCR-Öl [Merck]
Eppendorfreaktionsgefäße 0,5ml [Eppendorf]
PCR-Maschine "Robocycler" [Stratagene]

Gelelektrophorese-Apparatur mit Transformator [Biozyme]
Agarose "high grade" [Biozyme]
Geldokumentationssystem [LFT]
Ethidiumbromid [Sigma]
DNA-Größenmarker "GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus" [MWG]
DNA-Ladepuffer 6x [MWG]

Primer [MWG]:

spaghetti-Gen spezifische:

```
4      5' -CTG GAT TGG GAT CGT AGT TGG GCC-3'
1      5' -GCT CTG TTC GAT GAA ACA GCA ACT C-3'
Ex1r   5' -CTA ACC TTA TTG GCG GCA GAA AGC-3'
Ex2f   5' -CAA GTA AAG CTC ACA CTT TCA ATG-3'
Ex2r   5' -CGA GAA CAT TCT AAA CAG TCC TAC-3'
Ex3f   5' -CCT TAC ATG CAT ATT TAT CCT TGC-3'
Ex3r   5' -CTA GGT AAT CAA AAT TAT ATT TAC-3'
Ex4f   5' -GGC TTT TCA TTG GCA TCC TTA CA-3'
Ex4r   5' -CAG CTT TGA TCT TAA GCG AAC CTA C-3'
"2"    5' -ACG GTC GTT GAT TCT GGC C-3'
"1"    5' -AAC AAA TCC AAA GCC GAC GC-3'
Ex5f   5' -CCA ATT CTC TAT GAT TT-3'
Ex5r   5' -CGA AAT TAT GCA AGA AAA GTT TTG TCA CCT AC-3'
Ex6f   5' -GTA CTT TCC CCT TTT CAC AG-3'
```

pLacW spezifische (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dirk Henner Lankenau):

3819
10290 siehe Ergebnisteil
2231

Es wurde der folgende Ansatz auf Eis in 0,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert:

6,0µl H₂O
2,24µl dNTPs (je 2,5mM Stockkonzentration)
1,40µl MgCl₂ (25mM Stockkonzentration)
0,10µl der Primer (je 130ng/µl Stockkonzentration)
1,40µl der genomischen DNA (aus 50µl squash Präparation)
0,11µl Taq-Polymerase (10Units)
Ein Tropfen PCR-Öl als Überschichtung

Der Ansatz wurde in die vorgeheizte PCR-Maschine gestellt und mit dem folgenden Programm gefahren:

2,00min 94°C (1 Zyklus)	
0,10min 94°C (Denaturierung)	
0,50min 65°C (Annealing)	10 Zyklen
4,00min 72°C (Elongation)	
0,25min 94°C (Denaturierung)	
0,50min 65°C (Annealing)	20 Zyklen
4,00min 72°C (Elongation)	
7,00min 72°C (Elongation)	

Dem Reaktionsgemisch wurde anschließend 5µl DNA-Ladepuffer zugegeben und 14µl der Produkte wurden auf einem 0,8% ethidiumbromidhaltigen Agarosegel mit 80V separiert. Das Agarosegel wurde anschließend mit einem Geldokumentationssystem analysiert.

Verpaarung und Kontrolle verschiedener Drosophila melanogaster Stämme.

Fliegenstämme
Futterröhrchen groß und klein
25°C Inkubatoren (Neolab)

Binokular (Zeiss, Leica)

Anästhesierplatte mit CO₂ (Eigenkonstruktion)

Pinzel

Nach Erhalt der Fliegenstämme von den diversen Quellen (Bloomington Stock Center, Umea Stock Center, Szeged Stock Center, G. Rubin's Lab, S. Cohen's Lab, B. M. Mechler's Lab) müssen die Fliegen auf Milben untersucht werden. Anschließend wurden alle Fliegenstämme auf das Vorhandensein der korrekten "marker" und "balancer" untersucht. Dabei werden die Fliegen mittels CO₂ anästhesiert und auf einer Anästhesierplatte unter dem Binokular untersucht. Es wurden Jungfrauen der jeweiligen Stämme gesammelt und diese mit den jeweiligen Männchen der zugehörigen Stämme verpaart. Jungfrauen wurden durch das morgendliche Entfernen sämtlicher über Nacht geschlüpften Fliegen und das anschließende sammeln aller geschlüpften weiblicher Fliegen in einem Intervall von etwa zwei Stunden erhalten. Die verpaarten Fliegen wurden bei 25°C gehalten und aller drei Tage auf neues Futter gesetzt, um ein zu dichte Population zu vermeiden. Wurde ein larvaler "marker" (z.B. tubby oder CyTb) verwendet so wurden die entsprechenden Larven isoliert und in einem eigenen Futterröhrchen weiter bebrütet. Anderenfalls wurde nach dem Schlüpfen der F0-Generation die jeweiligen Fliegen als Jungfrauen gesammelt falls diese weiter verpaart werden müssen.

Apoptose-Nachweis in Imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* mit Acridinorange oder Nilblau

Acridinorange (Sigma)

Nilblau A (Sigma)

1M Phosphatpuffer pH7,2

Heptan (Fluka)

Die zu untersuchenden Larven wurden in 1xPBS präpariert und anschließend für 5min in 0,1M Phosphatpuffer inkubiert. Die Imaginalscheiben wurden anschließend auf einem Objektträger präpariert und ein Tropfen der Vitalfarbstoff-Lösung (Acridinorange 5µg/ml bzw. Nilblau A 100µg/ml in 0,1M Phosphatpuffer mit gleichen Volumen Heptan) zugegeben. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas versehen und anschließend sofort mit Immunfluoreszenz (FITC-Kanal) bzw. konfokalen Laserscanningmikroskop (Laser 488, BP-Filter 515-565nm) ausgewertet. Aufgrund der schnellen Penetration des Farbstoffes in die Zellen muss die Auswertung sehr schnell geschehen (maximal 10min).

Apoptose-Nachweis in Imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* mit dem in situ Cell Death Detection Kit (Roche)

In Situ Cell Death Detection Kit (Roche)

Paraformaldehyd (Fluka)

Proteinase K (Roche)

Glycin (Sigma)

To-Pro3-Jodid (Molecular Probes)

Phalloidin-Rhodamin (Sigma)

Einbettmittel slow anti fade (Molecular Probes)

37°C Inkubator (LFT)

Von den homozygoten *l(2)/k12101*-Larven wurden die winzigen Imaginalscheiben präpariert. Anschließend wurden diese für 15min bei RT in 4% Paraformaldehyd fixiert. Es wurde dreimal je 5min mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe für 20min mit Proteinase K (20µg/ml) behandelt. Die Proteinase K wurde mit 0,2% Glycin in PBT (1xPBS to 0,1% Tween20) inaktiviert. Es wurde wieder dreimal je 5min mit 1xPBS gewaschen. Nun wurde 50µl von Flasche 1 des Kits zu 450µl der Flasche 2 gegeben und gemischt. Diese Lösung wurde zu dem Gewebe gegeben und das Ganze bei 37°C, für eine Stunde, im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde einmal mit 1xPBS gewaschen. Es wurde 1ml der Färbe Lösung (10µl Phalloidin-Rhodamin, 1µl To-Pro3-Jodid, 50µl RNaseA (50mg/ml Stockkonzentration) für weiter zwei Stunden, bei RT, im Dunkeln zugegeben. Das Gewebe wurde dreimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend auf Objektträgern montiert, mit Deckgläsern versehen und diese mit Nagellack abgedichtet. Die Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (Zeiss LSM410) ausgewertet (TUNEL: FITC-Kanal, F-Aktin: Cy3-Kanal, DNA: Cy5-Kanal).

Ektopische Expression des antiapoptotischen p35 Proteins von Baculovirus

Fliegenstämme *l(2)k12101*, p35; BcGl/CyO

Formaldehyd (Fluka)

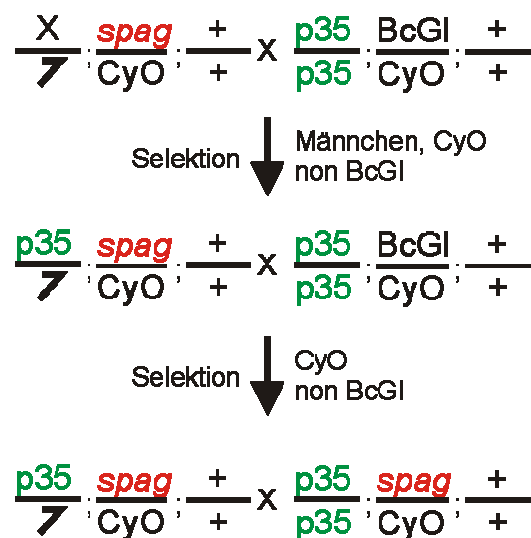
Phalloidin-FITC (Sigma)

To-Pro3-Jodid (Molecular Probes)

Einbettmittel slow anti fade (Molecular Probes)

37°C Wasserbad (LFT)

Es wurde die folgende Kreuzung durchgeführt:



Der erhaltende Stamm legte für zwei Tage Eier ab. Die Eier wurden für einen weiteren Tag bei 25°C bebrütet. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 1Stunde 15min, bei 37°C durchgeführt. Beim Erreichen des dritten Larvenstadiums wurden die Imaginalscheiben präpariert, mit Phalloidin-FITC und TO-PRO3-Jodid gefärbt (siehe oben) und mit denen des Wildtyps und der Mutante *l(2)k12101* verglichen. Die Präparate wurden mit Normallicht (Leica) oder konfokalen Laserscanningmikroskop (Zeiss LSM410) analysiert.

Immunfluoreszenzfärbung von homozygoten $l(2)k12101$ Imaginalscheiben mit anti-Phospho-Histon3 als Proliferationsmarker

Fliegenstämme $l(2)k12101$, Wildtyp OregonR

BBT (PBS+1%BSA+0,1%Tween20)

Formaldehyd (Fluka)

DAPI (Molecular Probes)

anti-Phospho-Histon3 (Biomol)

anti-Maus-Cy3 sekundär Antikörper (Sigma)

Einbettmittel slow anti fade (Molecular Probes)

Das Gewebe wurde in 1xPBS auf Eis in einem kleinen Glasblöckchen präpariert und anschließend für 20min bei RT im Fixierungspuffer fixiert. Das fixierte Gewebe wurde drei mal mit 1xPBS gewaschen. Das Gewebe wurde 1h in BBT bei RT inkubiert. Es wurden 1ml der Färbelösung zugegeben (10µg/ml anti-Phospho-Histon3 Antikörper in 1xPBS+1%BSA). Es wurde über Nacht bei 4°C, mit leichten schütteln inkubiert. Es wurde anschließend zwei mal mit 1xPBS, je 5min gewaschen. Anschließend wurde eine 1 zu 200 Verdünnung des goat anti-rabbit-Cy3 sekundären Antikörpers, sowie eine 1 zu 1000 Verdünnung der DAPI-Stocklösung (1mg/ml) zugegeben. Diese Lösung wurde für 2h im Dunkeln inkubiert. Es wurde drei mal je 5min mit 1xPBS gewaschen. Das Gewebe wurde in Vectashield oder slow antifade abschließend auf einem Objektträger präpariert und mit einem Deckglas versehen. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt. Diese Präparationen sind nur kurze Zeit im Dunkeln bei 4°C haltbar. Die Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops [Zeiss LSM410] in verschiedenen Ebenen gescannt und anschließend mit einer Bildbearbeitungssoftware [CorelPhotoPaint9] prozessiert.

In situ Hybridisierung von Embryonen von Drosophila melanogaster (modifiziert nach Tautz und Pfeifle 1989)

Fliegenstämme Wildtyp OregonR
Siebe zur Sammlung der Embryonen

DIG-DNA labeling Kit (Boehringer)
cDNA von *spaghetti*

Chlorbleiche (12%, Thomas Chemikalien)
Triton X-100 (Fluka)
Pipes (Fluka)
Formaldehyd (Fluka)
MgSO₄ (Merck)
EGTA (Fluka)

Heptane (Merck)

Methanol (Merck)

Diethylpyrocarbonat (Sigma)

Proteinase K (Roche)
Glycin (Sigma)

Formamid (Boehringer)
5XSSC (Fluka)
Denaturierte Herings sperm DNA (Sigma)

Heparin (Roche)
Tween 20 (Fluka)

3M NaAcetat (Fluka)
Ethanol (Merck)

Tris (Fluka)

Canada Balsam (Sigma)
Methylsalicylat (Sigma)

Pasteurpipetten (Neolab)
Falcon Röhrchen (50ml und 15ml)
Vortex (Neolab)
Wasserbad (LFT)
Zentrifuge (Eppendorf)

Die Embryonen wurden auf Futterplatten über Nacht (0-18h) gesammelt. Mit Hilfe eines Systems von Sieben verschiedener Größe wurden die Embryonen unter fließendem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen (ca. 4g im feuchten Zustand) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit einem Verschluss verschlossen, der ein Sieb in sich trägt. Die Embryonen wurden mit Chlorbleiche für 1-2min dechorionisiert. Der Grad der Dechorionisierung kann durch das Festkleben der dechorionisierten Embryonen an der Wand des Falcon-Röhrchens ermittelt werden. Anschließend wurde mit 0,1% Triton X-100 in Wasser solange gespült bis kein Chlorgeruch mehr zu riechen war. Die Embryonen wurden anschließend für 20min, RT, in 4% Formaldehyd plus 90mM Pipes pH6,9 fixiert. Die Devitalanisierung wurde mit der folgenden Lösung für 20min, RT, mit heftigen schütteln durchgeführt: 1,4ml 10% Formaldehyd; 2ml 180mM Pipes; 4mM MgSO₄; 2mM EGTA pH 6,9 und 5ml Heptan. Die meisten Embryonen werden sich nun an der Interphase sammeln. Anschließend wurden 10ml Methanol zugegeben und die Lösung für 20sec gevortext. Die meisten Embryonen werden nun sinken. Die Heptanphase wurde anschließend entfernt. Nach Zugabe von weiteren 5ml Methanol wurde erneut geschüttelt. Es wurde drei mal je 5min mit 95% Methanol, 5% 0,5M EGTA pH 8,0 (im weiteren ME genannt) gewaschen. Es wurde drei mal je 5min mit 1xPBS gewaschen. Mittels der folgenden Waschreihe (frisch angesetzt) wurden die Embryonen rehydratisiert: ME:4% Formaldehyd in 1xPBS, 0,1% Tween20 0,1 Diethylpyrocarbonat (frisch ansetzen, im weiteren DEPBT genannt), je 5min 7:3; 1:1; 3:7. Es schloss sich eine zweite Fixierung in 4% Formaldehyd in DEPBT, 20min, RT an. Es wurde drei mal je 5min mit DEPBT gewaschen. Die Embryonen wurden mit einer Lösung aus 10µl einer 4mg/ml konzentrierten Proteinase K in DEPBT für 5min, RT, permeabilisiert. Anschließend wurde die Proteinase K mit 2mg/ml Glycin in DEPBT inaktiviert. Es schlossen sich zwei Waschschrte je 5min mit DEPBT an. Die Postfixierung wurde mit 4%Formaldehyd in DEPBT, für 20min, RT durchgeführt.Es wurde fünf mal je 5min, RT mit DEPBT gewaschen. Anschließend wurde mit einer 1:1 Mischung aus DEPBT und Hybridisierungsmix für 10min preinkubiert (50% Formamid, 5xSSC, 100µg/ml denaturierte Herings sperm DNA, 50µg/ml Heparin und 0,1% Tween 20). Anschließend wurde für 4h bei 45°C prehybridisiert. Die Probe zur Hybridisierung wurde mit der random priming Methode hergestellt: gereinigte DNA wurde durch 10minütiges kochen denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Ein µg linearisierten DNA (*spaghetti*-DNA) wurde in einem Endvolumen von 20µl markiert, mit den folgenden Zutaten: 2µl Hexanukleotidmix [10X Stock: 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0,65mM dTTP, 0,35mM DIG-11-dUTP: pH 7,5 in Tris; es wurde 1x verwendet], 2µl random primers (62,5 Units/ml, 10x Stock, es wurde 1x verwendet) und 1µl Klenow Enzyme (2Units). Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 12h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion

durch Zugabe von EDTA (20mM Endkonzentration) gestoppt. Die markierte DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAcetat und 2,5 Volumen Ethanol, bei -80°C, für 2h präzipitiert und anschließend 15min; 13000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in TE (10 mM Tris pH8,0; 1mM EDTA) gelöst, zu einer Endkonzentration von 10µg/ml. Die Probe wurde für 10min gekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurde kurz zentrifugiert. Es wurden 20µl der Probe zu 4ml Hybridisierungsmix gegeben und diese mit den Embryonen über Nacht bei 45°C hybridisiert. Es folgten die folgenden Schritte: Zugabe von 1ml vorgewärmter Hybridisierungsmix für 10min, Austausch der Lösung mit Hybridisierungsmix für 10min, 45°C, 10min in 4:1 Hybridisierungsmix: DEPBT für 20min, RT; 3:2 für 20min, RT; 2:3 für 20min, RT, 1:4 für 20min, RT und letztlich 4mal je 5min in DEPBT. Anschließend wurden die Embryonen für 1h in preabsorbierten anti-DIG Antikörper inkubiert (1:2000 in DEPBT; Preabsorbtion: 1:200 mit fixierten Embryonen in DEPBT für 4h; die Lösung kann oft wiederbenutzt werden). Es wurde sechs mal je 10min mit DEPBT gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation zwei mal je 5min, RT in Alkalischer Phosphatase-Puffer (AP). Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 4,5µl Nitroblue-Tetrazolium Salz pro ml AP-Puffer (337,5µg/ml) und 3,5µl X-Phosphat pro ml AP-Puffer (175µg/ml) für ca. eine Stunde, RT, im Dunkeln durchgeführt. Die Färbung wurde durch das Binokular beobachtet. Die Embryonen wurden abschließend in einer Ethanolreihe (je 10min 70%, 90% und 100%) dehydatisiert und anschließend in Garys magic mount (1,5g Canada Balsam pro ml Methylsalicylat) unter einem Deckgläschen montiert. Die Embryonen wurden mit Hilfe eines Leica (DMR) Mikroskops mit Digitalkamera (Spot) im Hellfeld aufgenommen und mit Photoshop4 prozessiert.

Proteinextraktion von Drittlarvenstadien von *Drosophila melanogaster*

Fliegenstämme *l(2)k12101*, Wildtyp OregonR, Larven der ektopischen Linien

Lysispuffer (50mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1%NP-40 [Sigma])

Pepstatin A (Sigma)
Leupeptin (Sigma)
Aprotinin (Sigma)
PMSF (Sigma)
Proteaseninhibitormix (Biomol)

Homogenisator (5ml)

Pasteurpipetten (lang)

Eppendorfreaktionsgefäß (1,5ml)

Ultrazentrifuge (Beckman)

ca. 30 Larven von Wildtyp, der ektopischen Linien oder *l(2)k12101* wurden in 1xPBS in einem Glasblöckchen gesammelt und mehrmals gewaschen. Die Larven wurden direkt in einen gekühlten kleinen Homogenisator gegeben und anschließend mit 1ml der Homogenisierungslösung (Lysispuffer+1µl PepstatinA+1µl Leupeptin+1µl Aprotinin+50µl Proteaseninhibitormix+100µl PMSF) überschichtet. Die Larven wurden auf Eis für etwa 2min homogenisiert. Mit Hilfe einer langen Pasteurpipette wurde das Homogenisat in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 4°C bei 100000g für 30min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder bei -80°C eingefroren oder sofort mit Proteinladepuffer versehen, für 10min gekocht und anschließend für die SDS-PAGE verwendet.

Proteinextraktion von S2-Zellen

S2-ZellenLysispuffer (50mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1%NP-40 [Sigma])

Pepstatin A (Sigma)
Leupeptin (Sigma)
Aprotinin (Sigma)
PMSF (Sigma)
Proteaseninhibitormix (Biomol)

Eppendorfreaktionsgefäß (1,5ml)

Ultrazentrifuge (Beckman)

20ml einer S2-Kultur wurden für 3min bei 4°C bei 2500 Upm abzentrifugiert. Das Sediment wurde zwei mal mit 1xPBS gewaschen. Zum Sediment wurden 1ml der Homogenisierungslösung (Lysispuffer+1µl PepstatinA+1µl Leupeptin+1µl Aprotinin+50µl Proteaseninhibitormix+100µl PMSF) gegeben. Es wurde auf Eis für 20min inkubiert. Das Homogenisat wurde bei 4°C bei 100000g für 30min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder bei -80°C eingefroren oder sofort mit Proteinladepuffer versehen, für 10min gekocht und anschließend für die SDS-PAGE verwendet.

Proteinextraktion von Embryonen von Drosophila melanogaster

Embryonen von Drosophila melanogaster

Eiablageplatten
Siebsystem

Lysispuffer (50mM Hepes pH 7,4; 100mM NaCl; 0,05%NP-40 [Sigma]; 0,5mM EDTA [Merck])

Homogenisator (5ml)

Pepstatin A (Sigma)
Leupeptin (Sigma)
Aprotinin (Sigma)
PMSF (Sigma)
Proteaseninhibitormix (Biomol)

Eppendorfreaktionsgefäß (1,5ml)

Pasteurpipetten (lang)

Ultrazentrifuge (Beckman)

ca.5g Embryonen wurden über Nacht auf Eiablageplatten gesammelt und anschließend durch ein System verschiedener Siebe gewaschen und isoliert. Die Embryonen wurden in einen gekühlten Homogenisator, auf Eis gegeben. Zu den Embryonen wurden 2ml des Homogenisierungspuffers (2ml Lysispuffer+2µl Pepstatin A+ 2µl Leupeptin+1µl Aprotinin+200µl PMSF+100µl Proteinaseinhibitormix) gegeben. Es wurde auf Eis für 3min homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit einer langen Pasteurpipette in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Das Homogenisat wurde bei 4°C bei 100000g für 30min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder bei -80°C eingefroren oder sofort mit Proteinladepuffer versehen, für 10min gekocht und anschließend für die SDS-PAGE verwendet.

Dephosphorylierung von embryonalen Proteinextrakt von Drosophila melanogaster

Embryonaler Extrakt von Drosophila melanogaster

Alkalische Phosphatase (20Units/ μ l Boehringer, 40Units/ μ l Sigma)

Eppendorfreaktionsgefäß (1,5ml)

Wasserbad

Zu je 3 μ l des zytoplasmatischen Extrakts (siehe oben) wurden 20 μ l der Dephosphorylierungslösungen (18 μ l Wasser, 2 μ l Dephosphorylierungs-Puffer, 5 μ l Alkalische Phosphatase) von Boehringer und Sigma gegeben. Die Ansätze wurden für 1,5h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zu diesen Ansätzen 6x Proteinlade-Puffer gegeben und die Ansätze zusammen mit unbehandeltem embryonalen Proteinextrakt in Ladepuffer für 10min gekocht. Die Proteine der Ansätze wurden mit SDS-PAGE separiert und mit Hilfe des anti-Spaghetti Antikörpers mit Western-Blot Technik detektiert.

Herstellung von Kernextrakt und zytoplasmatischen Extrakt von Embryonen von Drosophila melanogaster

Embryonen von Drosophila melanogaster

Eiablageplatten
Siebsystem

Homogenisator (40ml) mit Bohrmaschine

Pepstatin A (Sigma)
Leupeptin (Sigma)
Aprotinin (Sigma)
PMSF (Sigma)
Proteaseninhibitormix (Biomol)
Phosphatase-Inhibitor (Sigma)

Eppendorfreaktionsgefäß (1,5ml)

Pasteurpipetten (lang)

Zentrifuge (Sorvall) mit Röhrchen

ca.40g Embryonen wurden über Nacht auf Eiablageplatten gesammelt und anschließend durch ein System verschiedener Siebe gewaschen und isoliert. Die Embryonen wurden in einen gekühlten Homogenisator, auf Eis gegeben. Zu den Embryonen wurden 10ml des Homogenisierungspuffers (10ml 1xPBS+10µl Pepstatin A+ 10µl Leupeptin+10µl Aprotinin+500µl PMSF+100µl Proteinaseinhibitormix+10µl Phosphatase-Inhibitor) gegeben. Es wurde auf Eis, im Kühlhaus für 3min mit einer Bohrmaschine homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein Zentrifugenröhrchen (30ml) gegeben. Das Homogenisat wurde bei 4°C bei 600g für 1min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1% NP-40 für 20sec behandelt. Anschließend wurde der Überstand bei 4°C, für 2min bei 10000g zentrifugiert. Zu dem Überstand (zytoplasmatischer Proteinextrakt) wurde 6xProteinlade Puffer gegeben und dieses dann bei -80°C eingefroren. Das Sediment wurde zwei mal mit Homogenisierungspuffer (siehe oben) gewaschen. Anschließend wurde bei 4°C, für 1min bei 10000g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2x Proteinlade-Puffer aufgenommen und bei -80°C tiefgefroren. Die Qualität der Proteinextrakte wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließender Färbung des Gels mit Coomassie-Blue überprüft.

Immunodetektion von Proteinen mit der Western-Blot Methode (Lämmli und Abdrews)

Proteinextrakte Wildtyp-Embryonen 0-3h, 3-6h, 6-9h, 9-12h, 12-24h, Larven (1-3 Stadium), Puppen, Männchen und Weibchen, Ovarien, *l(2)k12101*-Larven, S2-Zellen, embryonaler Kernextrakt und Zytoplasma, larvale Extrakte der ektopisch exprimierenden Fliegenstämme

Gießstände (Hoefer)

Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Sigma)
Tris-HCl (1,8M; pH 8,8)
Tris-HCl (0,6M; pH 6,8)
10% Sodiumdodecylsulfat (Merck)
10% Ammoniumpersulfat (Bio Rad)
TEMED (Bio Rad)

GPS 200/400 Power Supply (Pharmacia)
Multiphor II-Kammer (LKB)
Immobilon-P Transfer Membran (Millipore)

Methanol (Merck)
Puffer I (Tris-HCl, 300mM, pH 10,4)
Puffer II (Tris-HCl, 25mM, pH 10,4)
Puffer III (6-Amino-n-Hexansäure, 40mM [Merck])
Waschpuffer (1xPBS+0,1% Tween20)
Blocking Puffer (1xPBS+0,1% Tween20+0,2% I-BlockTM-Reagenz [Tropix])
Assay Puffer (0,1M Diethanolamin [Tropix]+1mM MgCl₂, pH 10,0)
Nitro-Block (Assay Puffer+Nitro Block-Reagenz [Tropix] (1:20)
Chemolumineszenz-Substrat (Assay Puffer+CSPD [Tropix], 0,24mM)

6xProteinladepuffer (0,35M Tris-HCl, pH 6,8; 10,28% SDS; 36% Glycerol; 5% β -Mercaptoethanol; 0,012% Bromphenolblau)

Wasserbad (Kühner)

Protein Marker (Diverse)
Primäre Antikörper (siehe Text)
Sekundär Antikörper (anti-rabbit Fab-Fragment gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase [Sigma])
Klarsichtfolie
Folienschweißgerät
Röntgenfilm (Kodak, RX-Medical)
Belichtungskammer (Rego)
Entwicklungsmaschine (Agfa, EOS)
Zentrifuge (Hereus)
Whatmann 3MM Papier

SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden mit Hilfe von Gießständen SDS-Gele in verschiedenen Größen (8x10cm, bzw. 8x15cm) und Konzentrationen (7-15%) gegossen:

Trenngel	7%	8%	10%	12%	15%
Acryl/Bisacry	28ml	32ml	40ml	50ml	60ml
Tris1,8M, pH8,8	24ml	24ml	24ml	24ml	24ml
Wasser	67ml	63ml	55ml	45ml	35ml
10%SDS	1,2ml	1,2ml	1,2ml	1,2ml	1,2ml
10%APS	600µl	600µl	600µl	600µl	600µl
TEMED	60µl	60µl	60µl	60µl	60µl
mit Buthanol überschichten und polymerisieren lassen (ca. 45min).					
Sammelgel					
Acryl/Bisacry	9ml				
Tris0,6M, pH6,8	12ml				
Wasser	38ml				
10%SDS	600µl				
10%APS	300µl				
TEMED	30µl				
Kämme vorsichtig montieren und polymerisieren lassen (ca. 45min).					

Die Proben wurden vor dem Auftragen in 6xProtein-Ladepuffer aufgenommen und für ca. 10min gekocht (in Eppendorfreaktionsgefäße mit Verschluss oder Klammer). Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden bis zu maximal 50µl auf die Gele aufgetragen. Zusätzlich wurde noch 10µl eines Proteinmarker (z.B. Rainbow-Marker, BOA-Marker oder Sigma Full-Range) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 30mA solange separiert, bis die Bromphenolbande des Ladepuffers gerade das Gel verlässt.

Proteintransfer auf Immobilon-P Transfermembran (Semi-dry Verfahren)

Der Proteintransfer erfolgte nach dem "Semi-dry"-Verfahren auf Immobilon-P Transfermembran in einer Multiphor II-Kammer nach Angaben des Herstellers. Es wurde ein "Sandwich" aus Filterpapier, PVDF-Membran und Polyacrylamidgel wie folgt aufgebaut: Anode

/ drei Lagen Filterpapier in Puffer1 / drei Lagen Filterpapier in Puffer2 / PVDF-Membran (aktiviert in Methanol dann einige Minuten in Puffer2 inkubiert) / Polyacrylamidgel in Puffer2 / sechs Lagen Filterpapier in Puffer3 / Kathode. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0,8mA pro cm² Gelfläche bei RT für 2h.

Immunodetektion

Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran getrocknet und auf den korrekten Transfer hin per Auge überprüft. Anschließend wurde die Membran mit Methanol aktiviert. Das Methanol wurde abgegossen und durch Tropix-blocking Puffer ersetzt. Es wurde die Membran für mindestens 1h hierin inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper (anti-Spaghetti 1:5000, anti-p127 1:10000, anti-NAP1 1:20000, anti-Phospho-Histon3 5µg/10ml, anti-Rab11 1:20000) in einer 1:1 Mischung aus washing-Puffer und Tropix-blocking Puffer bei 4°C, über Nacht, auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten vier Waschschrte je 15min in Tropix-blocking Puffer. Anschließend wurde eine 1:20000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (anti-rabbit IgG Fab-Fragment gekoppelt mit Alkaline Phosphatase) in einer 1:1 Mischung aus washing-Puffer und Tropix-blocking Puffer bei RT, für 1h, auf dem Schüttler inkubiert. Erneut wurde vier mal für je 15min mit Tropix-blocking Puffer gewaschen. Es schlossen sich zwei Inkubationsschritte, je 5min in Assay-Puffer an. Danach wurde die Membran für 5min in einer 1:20 Verdünnung in Tropix-Nitroblock in Assay-Puffer inkubiert. Es schlossen sich zwei Inkubationsschritte, je 5min in Assay-Puffer an. Abgeschlossen wurde die Detektion durch Zugabe einer 1:1000 Verdünnung des Tropix-Chemolumineszenzsubtrats in Assay-Puffer. Die Membran wurde daraufhin in Klarsichtfolie eingeschweißt und sofort mit Röntgenfilme exponiert.

Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Embryonen mit anti-Spaghetti Antikörper und To-Pro3 Jodid

Embryonen von *Drosophila melanogaster*

Eiablageplatten
Siebsystem

Chlorbleiche (Thomas Chemikalien)

Saugstrahlpumpe (Neolab)

Greiner-Röhrchen mit Sieb im Verschluss

Heptan (Merck) 4%

4% Paraformaldehyd (Riedel und Hayn)

Fixierlösung 2 (4% Paraformaldehyd, 0,1% TritonX-100 (Merck), 0,1%
Natriumdesoxycholat [Fluka])

Methanol (Merck)

Ethanol (Merck)

Normal goat serum (Sigma)

Primär-Antikörper (anti-Spaghetti)
Sekundär-Antikörper (anti rabbit Cy3 [Sigma])
ToPro3-Jodid (Molecular Probes)

BSA (Sigma)

Überkopfschüttler (Neolab)

Vortex (Neolab)

Einbettmittel

Zur letztendlichen Montage der Gewebe für die Mikroskopie wurde entweder Vectashield [Vector] oder das slow antifade Kit [Biomol] verwendet.

Die Embryonen (ca.5g) wurden über Nacht (0-18h) auf Eiablageplatten gesammelt. Anschließend wurden die Embryonen mit Hilfe eines Systems verschiedener Siebe mit Wasser gewaschen und gesammelt. Es muss hier darauf geachtet werden keinerlei Hefe von der Platte zu waschen, da diese nicht mehr zu entfernen ist. Mit einem Pinsel wurden die Embryonen in ein spezielles Greiner-(50ml) Röhrchen überführt, in dessen Verschluss ein Sieb eingelassen ist. Die Dechorionisierung erfolgte durch Zugabe für ca. 2min einer 1:1 mit Wasser verdünnten Chlorbleiche. Es wurde anschließend sofort mit viel Wasser gespült, als die Embryonen begangen an der Wand des Greiner Röhrchens festzukleben. Hierzu wurde mit Hilfe einer Wasserspritzflasche zügig Wasser durch das Sieb im Verschluss in das Röhrchen mit den Embryonen gespritzt und mit Hilfe einer Saugstrahlpumpe sofort wieder heraus gesaugt. Die Spülung wurde solange fortgesetzt bis der Chlorgeruch verschwunden war. Nun wurde eine Mischung aus 6ml Heptan und 6ml 4% Paraformaldehyd für 15min, RT, zugegeben und die Embryonen im Röhrchen auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die untere Phase der Mischung mit einer Pasteurpipette vorsichtig entfernt. Es wurden 6ml der Fixierlösung 2 zugegeben und wieder für 15min auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 1xPBS für je 5min. Nach Zugabe von 6ml -20°C gekühltem Methanol wurden die Embryonen für 3min gründlich gevortext. Die obere Phase wurde komplett entfernt. Es wurde nochmals Methanol zugegeben. Die Embryonen wurden für 1h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Methanol entfernt und 100% Ethanol zugegeben. (Die Embryonen können so bei -20°C aufbewahrt werden). Die Embryonen wurden über eine Ethanol : TPBS Reihe rehydriert: (je 5min 70% Ethanol : TPBS (1xPBS+0,5% TritonX-100); 50% Ethanol : TPBS; 30% Ethanol : TPBS; 100% TPBS). Es schlossen sich zwei Waschriffe je 5min mit 1xPBS an. Anschließend wurden die Embryonen in Block-Puffer (25% normal goat serum in PBST [1xPBS, 0,1% Tween20]) für 1h, RT inkubiert. Die Embryonen wurden mit dem primären Antikörper (anti-Spaghetti, 1:100) über Nacht bei 4°C in Inkubationspuffer (3% normal goat serum, 3%BSA in PBST) inkubiert. Es wurde anschließend drei mal mit Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (anti-rabbit Cy3) in Inkubationspuffer für 2h, RT, Dunkelheit, zugegeben. Es schlossen sich die folgenden Waschriffe an: drei mal 5min, RT, in Inkubationspuffer, ein mal 5min, RT, in PBST und ein mal 5min in PBS. Das Gewebe wurde in Vectashield oder slow antifade abschließend auf einem Objektträger präpariert und mit einem Deckglas versehen. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt. Diese Präparate sind nur kurze Zeit im Dunkeln bei 4°C haltbar. Die Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops [Zeiss LSM410] in verschiedenen Ebenen gescannt und anschließend mit einer Bildbearbeitungssoftware [Adobe Photoshop4] prozessiert.

Herstellung des Vektors pUAST-spaghetti für die ektopische Expression in Drosophila melanogaster

GAL-UAS Vektor (pUAST) (Bryant)

pBluescript-spaghetti DNA (Istvan Török)

Restriktionsenzyme (NotI [GGCCGC] und KpnI [GGTACC], Promega)

PCR Fragment Isolation Kit (Quiagen)

Miniprep Plasmid Isolation Kit (Quiagen)

Epicurian Coli Ultracompetent cells (Statagene)

Rapid Ligation Kit (Roche)

LB-Platten mit Ampicillin
Ampicillin (Sigma)

Zahnstocher (Aldi)

Drigalski oder sterile Glaskügelchen
Ethanol (Merck)

37°C Inkubator

Eppendorfreaktionsgefäße (1,5ml, Eppendorf)

Greinerröhrchen (15ml)

Zentrifugen (Hereus, ICE)

Agarose (Biozym)

Gelelektrophoreseapparatur (Biozym)

Power Supply (Pharmacia)

Vortex (Neolab)

Mikrowellengerät (Bosch)

Sterilwerkbank (Hereus)

NZY+ Medium (pro Liter: 10g NZ-amine (casein hydrolysate [Difco]); 5g yeast extract [Difco]; 5g NaCl (Merck), pH 7,5 (mit NaOH) Autoklavieren, danach Zugabe von 12,5ml 1M MgCl₂ und 12,5ml 1M MgSO₄ und 20ml filtersterilisierte Glukose (20% w/v))

LB-Ampicillin Platten und Medium (10g NaCl [Merck]; 10g Trypton [Difco]; 5g yeast extract [Difco]; 20g Agar [Difco] für Platten, pH 7,0. Autoklavieren. Zugabe von 100mg Ampicillin bei 55°C und falls Platten, je 25ml in 100mm Petrischalen gießen)

Jeweils 3µg der DNA der Vektoren pBluescript-*spagbetti* und pUAST wurden mit den Restriktionsenzymen NotI und KpnI wie folgt geschnitten (da es nicht zu empfehlen ist mit beiden Restriktionsenzymen zugleich zu schneiden wurde nacheinander geschnitten): 3µl (3µg) je DNA zu 87µl sterilen Wasser+10µl des Puffers D für NotI oder Puffer J für KpnI+je 5µl der Restriktionsenzyme. Die Ansätze wurden kurz gevortext und anschließend für 1h bei 37°C inkubiert. Nun wurde erneut 5µl je Restriktionsenzym zugegeben. Die Restriktion wurde durch Analyse eines Aliquots (10µl) auf einem 1% Agarosegel (siehe unten) geprüft. Der verbliebene Rest der Verdauung wurde mit Hilfe des PCR-Fragment Isolation Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Zugabe von 270µl Puffer QC, anschließend mehrmals je 800µl auf Säule und für je 1min, 13000 Upm, RT, das Zentrifugenröhrchen zwischendurch leeren, danach 750µl Waschpuffer, 1min, 13000 Upm, RT, Röhrchen leeren, 1min, 13000 Upm leer zentrifugieren, Säule in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß stellen und die DNA mit 50µl 1xTE 1min, 13000 Upm, RT eluieren). Anschließend wurde mit dem zweiten Restriktionsenzym wie oben verfahren und die DNA wie oben aufgereinigt. Je 50ng des NotI/KpnI pUAST-Vektors und 150ng des NotI/KpnI *spagbetti*-inserts wurden mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits nach Angaben des Herstellers ligiert (10µl DNA [Vektor+insert] in 1x konz. DNA dilution buffer (vial 2)+10µl T4 DNA ligation buffer (2x conc.) (vial1) mischen, Zugabe von 1µl T4 DNA Ligase (vial3), mischen, für 5min bei RT inkubieren). 4µl des Ligationsansatzes wurden sogleich zur Transformation in Ultracompetent Epicurian Coli XL-2 MRF⁺ Zellen nach Angaben des Herstellers verwendet (die XL-2 MRF⁺ Zellen wurden auf Eis aufgetaut; zu je 50µl der Zellen wurde je 1µl β-mercapthoethanol (Endkonzentration 25mM) gegeben (in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße). Die Zellen wurden auf Eis für 10min gehalten. Jede zweite Minute wurde sehr vorsichtig (!) der Inhalt gemischt. Nun wurden 4µl der oben beschriebenen DNA zugegeben. Es wurde erneut vorsichtig (!) gemischt und der Ansatz für 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30sek bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Die Ansätze

wurden für 2min sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 200µl, 42°C warmes NZY+ Medium zugegeben und die Zellen für 1h bei 37°C mit 250 Upm regeneriert. Der komplette Inhalt wurde auf LB (Ampicillin)-Platten ausplattiert (mit Drigalski oder sterilen Glaskügelchen) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je 12 der gewachsenen Kolonien wurden in 3,5ml LB (Ampicillin) Medium angeimpft (mit Zahnstocher) und über Nacht, bei 37°C, 220 Upm bebrütet. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Kulturen erfolgte mit Hilfe des Miniprep Isolation Kits nach Angaben des Herstellers.

Herstellung transgener Drosophila melanogaster Fliegen für das pUAST-spaghetti Konstrukt (Modifiziert nach Engels Methode)

GAL-UAS Vektoren (pUAST-spaghetti)

Injektions-Puffer (nach Spradling: 5mM KCl, 0,1mM Natriumphosphat, pH 6.8)

Fliegen (*yw; +/+; Sb, P[ry+,Δ(2-3)]/Tm6,Ubx, yw, BcGl/CyO; +/+*)

Eiablageplatten (250ml Apfelsaft [Edeka], 33g Sucrose [Riedel de Hayn], 6g Nipagin M [Boehringer] aufkochen und zu 22,5g Agar [Difco] aufgekocht in 750ml Wasser geben, in 100mm Petrischalen gießen)

Fliegencontainer (Eigenkonstruktion aus Pappdose mit 100mm Durchmesser in der der Boden entfernt und mit fliegendichter Gaze versehen wurde, passt genau auf 100mm Petrischale)

Trockenhefe (Aurora)

Ethanol (Merck)

Binokular (Wild mit Beleuchtung)

Pinzette (Dumont 5)

Pinzel

Transjektor (Eppendorf 5525 mit Mikroskop)

Femtotips I und II (Eppendorf)

Halocarbonöl Serie700 (Votacef)

Petrischalen (150mm und 50mm)

Zentrifuge (Hereus)

ca. 10ml anästhesierte *yw; +/+; Sb, P[ry+, Δ(2-3)]/Tm6, Ubx* (Robertson et al., 1988) Fliegen wurden in den Eiablage-Container überführt. Der Container wurde mit einer Eiablageplatte verschlossen, auf der mittig ein bisschen Hefepaste (5g Trockenhefe+Wasser; rühren bis Paste entsteht) platziert wurde. Nach dem Erwachen der Fliegen wurde der Container auf den Kopf gestellt, sodass die Eiablageplatte unten zu liegen kommt. Es wurde anfangs jede 30min die

Platte gewechselt, bis die Fliegen sich an das Medium gewöhnt hatten und eine konstante Anzahl von Eiern legten. Das Sammelintervall wurde dann auf 20min reduziert, um das notwendige syncyciale Blastodermstadium der Embryonen zu erhalten. Die abgelegten Eier wurden nun mit Hilfe eines mit sauberen Wasser befeuchteten Pinsels auf ein Deckgläschen überführt. Dieses Deckgläschen wurde zuvor angehaucht und auf einen Objektträger "geklebt". Mit Hilfe einer Pinzette und ein bisschen Wasser wurden die Eier nun auf dem Deckgläschen so aufgereiht, dass ihr Appendix vom Aufreiherr wegzeigt. Nach Beendigung des Aufreihens wurden die Embryonen mit reinem Ethanol begossen und so trocknen gelassen. Während des Abtrocknens des Ethanols wurde die Injektionsapparatur vorbereitet: die mindestens für 30min, bei 4°C, bei 13000 Upm abzentrifugierte DNA (ca. 100ng/μl-400ng/μl in Injektions-Puffer nach Spradling) wurde mit Hilfe einer speziellen Ladespitze von hinten in die sterile Femptotip geladen (ca. 5μl). Anschließend wurde die Injektionsnadel an das Drucksystem des Injektors angeschlossen und der Druck kontrolliert. Nun wurden die Embryonen mit Halocarbonöl übergossen und auf dem Injektor installiert. Die Betrachtung im Mikroskop erfolgte mit Phasenkontrast. Die Embryonen wurden über oder seitlich der Polzellen injiziert. Das Austreten der Flüssigkeit aus der Injektionsnadel wurde kontrolliert, indem auf das Erscheinen von Verwirbelungen im Plasma des Embryos und/oder ein Ausdehnen des Embryos beobachtet werden kann. Nach erfolgter Injektion wurden die Deckgläschen mit den injizierten Embryonen in kleine Petrischalen gelegt, die wiederum in einer großen Petrischale gelegt wurden. Die große Petrischale wurde mit feuchten Tüchern befeuchtet, damit die Embryonen nicht vertrocknen (feuchte Kammer). Die injizierten Embryonen schlüpfen üblicherweise nach etwa einen bis anderthalb Tagen und wurden dann umgehend mit einem Pinsel oder einer Pinzette, mit krummer Spitze, aus dem Öl in ein Futterröhrchen überführt. Das Futterröhrchen war frisch hergestellt und mit ein wenig Trockenhefe versehen. Die etwa 11-12 Tage später geschlüpften Adulten wurden mit Fliegen des Stammes *yw; BcGl/CyO; +/+* (oder anderen yw-Stämmen) verpaart. In der darauf folgenden Generation wurden die gelbäugigen oder orangeäugigen Fliegen als Jungfrauen gesammelt, die dann als stabile Stämme etabliert und analysiert wurden.

Strategie zur Feststellung des Chromosoms auf dem das Transgen inserierte:

Die adulten Männchen oder Weibchen, die aus den injizierten Embryonen hervorgegangen sind wurden wie folgt verpaart:

$$\frac{yw}{7}; \frac{+}{+}; \frac{Sb, P[ry+, (\Delta 2-3)]}{TM6, Ubx} \times \frac{yw}{yw}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}$$

Selektion: $\downarrow$ rote Augen
non Sb

$$\begin{array}{l} \frac{?}{7}; \frac{BcGl}{+}; \frac{+}{TM6, Ubx (?) } \quad \text{oder} \quad \frac{yw}{?}; \frac{?}{CyO}; \frac{+}{TM6, Ubx (?) } \\ \text{oder} \\ \frac{?}{7}; \frac{?}{CyO}; \frac{+}{TM6, Ubx (?) } \end{array}$$

1.) Männchen und Weibchen mit $yw; BcGl/CyO; +/+$ verpaaren:

$$\frac{?}{7}; \frac{BcGl}{?}; \frac{+}{TM6, Ubx (?) } \times \frac{yw}{yw}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}$$

► nur Weibchen rotäugig ==> Insertion auf dem X-Chromosom!

$$\frac{\nabla}{7}; \frac{BcGl}{+}; \frac{+}{TM6, Ubx} \times \frac{yw}{yw}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}$$

Selektion: $\downarrow$ rote Augen
 $BcGl$ und CyO

$$\frac{\nabla}{7}; \frac{BcGl}{+}; \frac{+}{+} \times \frac{\nabla}{yw}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}$$

Selektion: $\downarrow$ Weibchen mit dunkelroten Augen

$$\frac{\nabla}{7}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+} \times \frac{\nabla}{\Delta}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}$$

Männchen und Weibchen rotäugig ==> Insertion auf zweitem oder dritten Chromosom:

$$\frac{yw}{yw}; \frac{?}{CyO}; \frac{+}{TM6, Ubx (?)} \times \frac{yw}{7}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}$$

Selektion: ↓ rote Augen

► rotäugige $BcGl/CyO \Rightarrow$ Insertion auf dritten Chromosom:

$$\frac{yw}{7}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{\nabla, TM6, Ubx}{+} \times \frac{yw}{yw}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{\nabla, TM6, Ubx}{+}$$

► keine rotäugigen $BcGl/CyO \Rightarrow$ Insertion auf zweitem

$$\frac{yw}{7}; \frac{\nabla}{CyO}; \frac{+}{+} \times \frac{yw}{yw}; \frac{BcGl}{\blacktriangle}; \frac{+}{+}$$

Selektion: ↓ dunkelrotäugig
non $BcGl$ / non CyO

$$\frac{yw}{7}; \frac{\nabla}{\blacktriangle}; \frac{+}{+} \times \frac{yw}{yw}; \frac{\nabla}{\blacktriangle}; \frac{+}{+}$$

Verpaarung der pUAST-spaghetti-Fliegen mit Fliegen die GAL4 exprimieren (UAS/GAL4 System)

Fliegen (pUAST-spaghetti-Fliegenstämme, w^* ; wg^{SP-1} / CyO ;
 $P\{w+mW.hs=GAL4-dpp.blk1\}40C.6 / TM6B, Tb1$ und
 $w^*; P\{w+mW.hs=GawB\}T80 / CyO$)
 Fliegenfutterröhrchen

Es wurden die folgenden Verpaarungen durchgeführt:

(▼ : pUAST-spaghetti bzw pUAST-spaghetti ΔTPR)

$$\frac{\frac{\text{▼}}{\text{▲}}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}}{\times} \frac{w}{\overline{7}}; \frac{P\{w+mW.hs=GawB\}T80}{CyO}; \frac{+}{+}$$

Selektion: $\downarrow$ non CyO

$$\frac{\text{▼}}{w \text{ oder } \overline{7}}; \frac{P\{w+mW.hs=GawB\}T80}{BcGl}; \frac{+}{+}$$

bzw:

$$\frac{\frac{\text{▼}}{\text{▲}}; \frac{BcGl}{CyO}; \frac{+}{+}}{\times} \frac{w}{\overline{7}}; \frac{wg^{Sp-1}}{CyO}; \frac{P\{w+mW.hs=GAL4-dpp.blk1\}40C.6}{TM6B, Tb1}$$

Selektion: $\downarrow$ non CyO
non Tb

$$\frac{\text{▼}}{w \text{ oder } \overline{7}}; \frac{wg^{Sp-1}}{BcGl}; \frac{P\{w+mW.hs=GAL4-dpp.blk1\}40C.6}{+}$$

Präparation von Flügel und Thorax von Drosophila melanogaster für die Durchlicht-Mikroskopie

Fliegen (gesammelt in 70%Ethanol)

Ethanol (Merck)

Xylol (Merck)

Canada Balsam (Sigma)

Methylsalicylat (Sigma)

Binokular (Wild mit Beleuchtung)

Pinzette (Dumont 5)

Chirurgen-Schere (FST)

Glasblöckchen (Neolab)

Pasteurpipetten (Hereus)

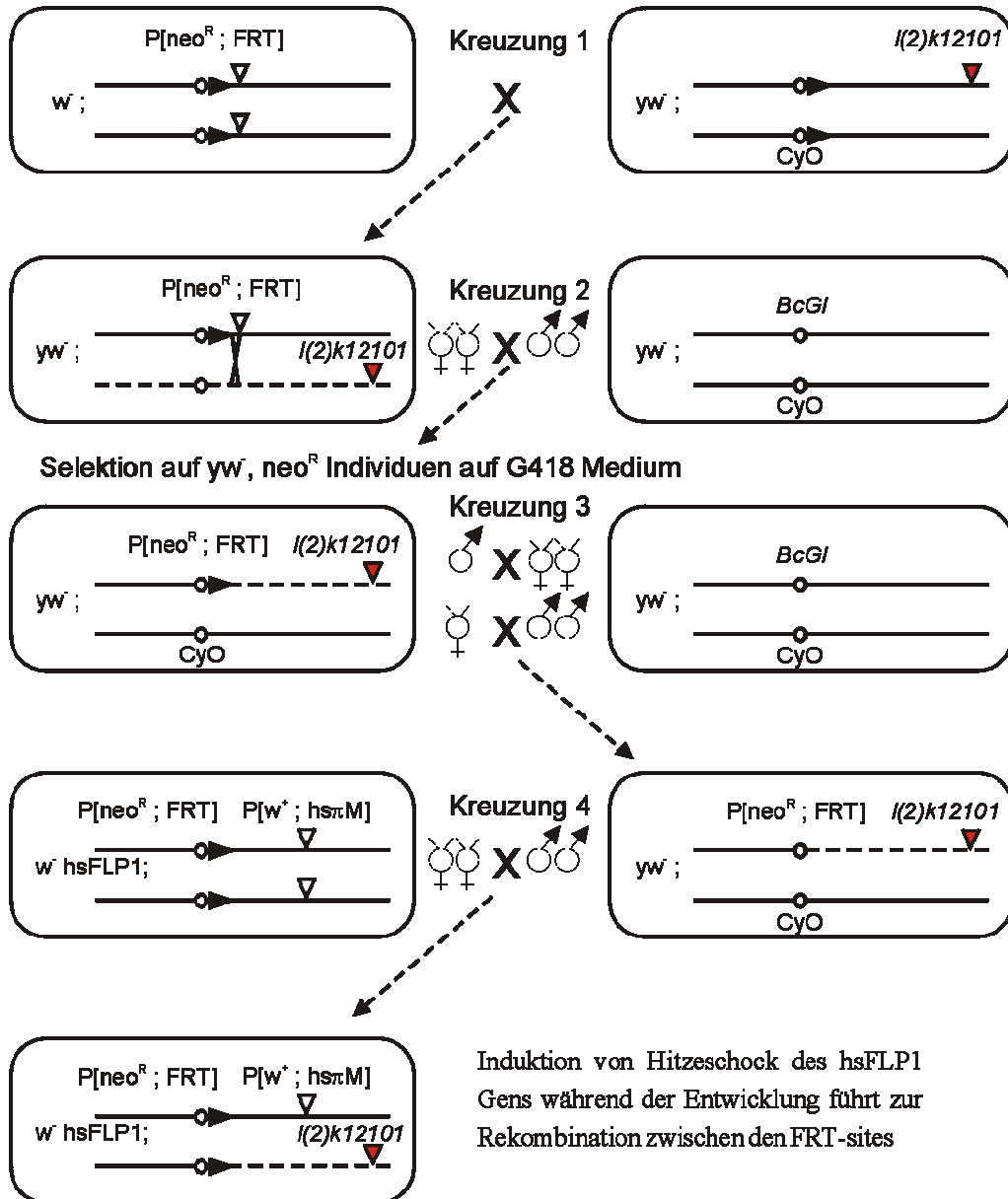
Ofen

100g Gewichte
Mikroskop (Leica)

Von den in 70% Ethanol gesammelten Fliegen wurden der Thorax, sowie die Flügel, mit einer speziellen Chirurgen-Schere abgetrennt. Die Körperteile wurden je 10min in einer Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) entwässert. Anschließend wurden die Körperteile für 10min in Xylol inkubiert. Nun wurden die Flügel und die Thoraxe getrennt auf Objektträgern in einem Tropfen GMM (Gerrys magic mount; 1,5g Canada Balsam pro ml Methylsalicat) arrangiert und mit einem Deckgläschen verschlossen. Die Deckgläschen wurden mit 100g Gewichten beschwert, um die Körperteile flach zu drücken. Die Präparate wurden so über Nacht bei 80°C gelagert. Abschließend wurden die Präparate mit Durchlicht mikroskopiert (LeicaDMR) und mit einer Videokamera (Spot) Aufnahmen gemacht.

Genetische Kreuzungen zur Herstellung von genetischen Mosaiken für die Gene *l(2)k12101*, *l(2)gl* und *vartul (scrib)*

Es wurden die folgenden Kreuzungen durchgeführt (exemplarisch für *l(2)k12101* auf FRT-Chromosom 43D, *l(2)gl* und *vartul* analog mit entsprechenden FRT-Chromosomen 40A und 80B):



Erläuterung des Diagramms: vor der ersten Kreuzung wurden die Chromosomen der mutierten Genen "isogenisiert", d.h. es wurde ausgehend von einem einzigen Männchen ein neuer Stamm gebildet, indem dieses Männchen mit Jungfrauen des Stammes yw ; $BcGl$ / CyO ; + / + (für die Mutationen *l(2)k12101* und *l(2)gl*) verpaart wurden, bzw. im Falle von $P\{vartul (scrib)\}$ mit dem Stamm yw ; + / +; *TM3* / *TM6C*, *Tb1*. Anschließend wurde der Phänotyp der Stämme kontrolliert. Für Kreuzung 1 im Diagramm wurde als FRT-Chromosom im Falle von *l(2)k12101*

Fliegen des folgenden Genotyps verwendet: *w¹¹¹⁸*, *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *P[ry+t7.2=neoFRT]/43D* *P[w+mC=piM]/46F* *P[w+mC=piM]/47F* / *CyO*; *kar2*, *ry506* (Freundliche Gabe von Stephen Cohen). Für die Mutation *l(2)g^{fl}* wurden Fliegen des Genotyps *w¹¹¹⁸*; *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *P[ry+t7.2=neoFRT]/40A*; *ry[506]* verwendet. Für die Mutation *P{vartul (scrib)}* wurden die folgenden Fliegen verwendet: *w¹¹¹⁸*; *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *P[ry+; ^{hs}-neo; FRT]/82B*, *kar2*, *ry506*, *Sb63b* / *TM6C*, *ryCB*. In einem Futterröhrchen wurden je fünf Männchen der Stämme *l(2)k12101* / *CyO*; *l(2)g^{fl}* / *CyO* sowie *P{vartul (scrib)}* / *TM6B*, *Tb* mit je 40 Jungfrauen der oben erwähnten FRT-Fliegen verpaart. Anschließend wurden etwa 10 Jungfrauen gesammelt, die im Falle von *l(2)k12101* und *l(2)g^{fl}* nicht *CyO* waren, bzw. im Falle von *P{vartul (scrib)}* nicht Tubby. Diese Tiere wurde für ein bis zwei Tage auf Futterröhrchen mit frischer Hefepaste gehalten. Anschließend wurden diese Jungfrauen mit je 10 männlichen Fliegen des Genotyps *yw⁻*; *BcGl* / *CyO* (für *l(2)k12101* und *l(2)g^{fl}*), bzw. *yw⁻*; *TM3* / *TM6B* (für *P{vartul (scrib)}*) verpaart und auf Medium gehalten, das mit G418 (Geneticin 25mg/ml Stammlösung: 0,3ml hiervon zu je 10ml Fliegenfutter; frisch angesetzt) versetzt wurde. Das Futterröhrchen mit dem Medikament sollte genügend Trockenhefe haben, um die adulten Tiere zu versorgen, nicht jedoch die Larven. Die verpaarten Fliegen wurden alle drei Tage in neue Futterröhrchen überführt. Die anschließend schlüpfenden Fliegen wurden als Jungfrauen bzw. Männchen gesammelt und einzeln mit Fliegen des Genotyps *yw⁻*; *BcGl* / *CyO*; + / + bzw. *yw⁻*; + / +; *TM3* / *TM6B*, *Tb* verpaart. Von der darauffolgenden Generation wurde der Phänotyp geprüft. Im Falle von *l(2)k12101* wurden die Stämme etabliert, die melanotische Tumore und kleine Imaginalscheiben zeigten (des weiteren wurde geprüft, ob diese Fliegen mit Fliegen die ein *l(2)k12101*-Transgen auf dem dritten Chromosom tragen zu "retten" waren; in allen Fällen positiv). Im Falle der *l(2)g^{fl}*- und *P{vartul (scrib)}*-Mutation wurde auf das Auftreten der sogenannten "giant larvae" geachtet. Die Stämme wurden erneut auf G418-haltigen Fliegenfutter vermehrt. Zur letztendlichen Erzeugung der genetischen Mosaik wurden die folgenden Fliegenkombinationen verpaart: für *l(2)k12101*: *w¹¹¹⁸*, *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *l(2)k12101* *P[ry+t7.2=neoFRT]/43D* *P[w+mC=piM] 46F* *P[w+mC=piM]/47F* / *CyO*; *kar2*, *ry506* mit *w¹¹¹⁸*, *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *P[ry+t7.2=neoFRT]/43D* f+ *M(2R)* / *CyO*; *kar2*, *ry506* für *l(2)g^{fl}*: *w¹¹¹⁸*; *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *l(2)g^{fl}* *P[ry+t7.2=neoFRT]/40A*; *ry[506]* / *CyO*; *kar2*, *ry506* mit *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *P[ry+t7.2=neoFRT]/40A* f+ *P[w+]30B* / *CyO*; *kar2*, *ry506* und für *P{vartul (scrib)}*: *w¹¹¹⁸*; *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *vartul* *P[ry+; ^{hs}-neo; FRT]/82B*, *kar2*, *ry506*, *Sb63b* / *TM6C*, *ryCB* mit *P[ry+ ^{hs}FLP]/f36a*; *P[ry+t7.2=neoFRT]/82B* f+ / *TM6C*, *ryCB*. Da die Flipase unter Kontrolle eines Hitzeschock-Promoters ist, muss zur entsprechenden Zeit das Futterröhrchen, indem die Eier abgelegt wurden, entsprechend lange (siehe Ergebnisse) bei 25°C gehalten und anschließend für 60min bei 37°C im Wasserbad induziert werden. Dabei ist zu beachten, das der Stopfen, der das Röhrchen verschließt soweit nach unten gedrückt werden

muss, sodass es keiner Larve gelingen kann dem Hitzeschock zu entkommen. Die Larven oder die Adulten Fliegen wurden daraufhin nach Klonen analysiert.

Präparation von Thorax, Kopf, Beine und Flügel von Drosophila melanogaster für die Rasterelektronenmikroskopie

Fliegen (gesammelt in 70%Ethanol)

Ethanol (Merck)

Aceton (Merck)

Dimethylsilazane (Sigma)

Binokular (Wild mit Beleuchtung)

Pinzette (Dumont 5)

Chirurgen-Schere (FST)

Glasblöckchen (Neolab)

Pasteurpipetten (Hereus)

Objekträger für REM (Messingteller eigene Herstellung)

Sputter (BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater)

Rasterelektronenmikroskop (Philips SEM 505)

Kamera (Steinheil M20 Oscillophot)

Von den in 70% Ethanol gesammelten Fliegen wurden der Thorax, die Beine, Köpfe und Flügel mit einer speziellen Chirurgen-Schere oder Pinzetten abgetrennt. Die Körperteile wurden je 10min in einer Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) entwässert. Anschließend wurden die Körperteile für je 10min in einer Ethanol:Aceton-Reihe (3:1; 1:1; 2:3) inkubiert. Weiter 10min in 100% Aceton. Es erfolgte eine Inkubation für je 5min in einer Aceton:Dimethylsilazane [giftig! Abzug!]-Reihe (3:1, 1:1, 2:3). Zwei mal weitere 5min in 100% Dimethylsilazane. Anschließend wurden die nun entwässerten und entfetteten Gewebe auf Papier gelegt und so mindestens für 2h entgast. Die Gewebe wurden auf Objektträgern für die REM mit Hilfe eines speziellen Lötzinns montiert. Die Präparate wurden anschließend mit einem Goldsputter beschichtet (140sec, 30mA). Abschließend wurden die Präparate mit dem REM mikroskopiert (Philips) und mit einer Mittelformatkamera Aufnahmen gemacht.

Test von Zellen auf Expression des lacZ-Reportergens durch Filterabklatsch und Färbung mit X-gal.

Hefekolonien, die zu untersuchen sind

Z-Puffer Stock Lösung (16,1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,5g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,75g KCl; 0,246g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; H_2O ad 1000 ml)

X-gal Stock Lösung (20mg/ml in N,N-dimethylformamid [DMF])

β -Mercaptoethanol (Sigma)

Flüssigstickstoff mit Gefäß

Petrischalen
Whatmann-Papier in der Form der Petrischalen

SD-Platten (entsprechende Zusammensetzung)

Pinzette

Die zu untersuchenden Kolonien werden erst für einen Tag auf dem entsprechenden Medium wachsen gelassen. Anschließend wird von diesen Kolonien ein Filterabklatsch gemacht, indem ein entsprechend zurechtgeschnitten Whatmann-Papier auf die Platte mit den Kolonien gelegt wird, mit einem sterilem Drigalski-Spatel leicht angepresst und dann wieder abgehoben wird. Der Filter wird wiederum, mit den Kolonien nach oben zeigend erneut für einen Tag inkubiert. Der Filter wird mit einer Pinzette von der Platte vorsichtig abgehoben und in flüssigen Stickstoff überführt, um die Hefekolonien zu permeabilisieren (der Filter sollte auf den Boden des Stickstoffgefäßes sinken). Die Expression des lacZ-Reportergens wird mit Hilfe einer X-gal Lösung getestet: Es wird etwa 4,5ml des Z-Puffers mit X-Gal (12,5ml Z-Puffer, 37 μ l β -Mercaptoethanol, 210 μ l X-Gal Lösung) auf Whatmann-Filterpapiere, welche auf den Boden einer leeren Petrischalen liegen, gegeben. Auf diesen nun befeuchteten Filter wird ein weiterer Filter gelegt. Beide Filter sollten befeuchtet sein. Den Filter aus den Stickstoff nehmen und auf Papier zum auftauen legen. Nun den Filter mit der Kolonien­seite nach oben in die vorbereiteten Petrischalen mit dem Z-Puffer mit X-Gal Lösung legen (Luftblasen entfernen). Die Petrischalen in Plastiktaschen verschließen und bei 30°C inkubieren. Die Positivkontrollen beginnen sich nach etwa 2-3h blau zu färben. Die Negativkontrollen nach etwa 18h. Kolonien die sich nach den Negativkontrolle färben stellen eine unspezifische Hintergrundfärbung dar.

„Southern Blot“-Transfer von DNA auf Nitrozellulosemembran

20x SSC Puffer (175,3g NaCl; 88,2g Sodiumcitrat; H₂O auf 1000 ml)
Depurinierungslösung (0,25M HCl)
0,5M NaOH-3MNaCl
1M NH₄OAc-0,02M NaOH
Whatmann-Papier
BA-85 Filter
³²P CTP
Klenow-Enzym
Labeling-Mix
NICK Sephacryl G50 DNA Grade-Säule (Pharmacia)

Das nach Southern (1975) benannte Verfahren ermöglicht den Transfer geelektrophoretisch separierter DNA auf Nitrozellulosemembran, wobei die Position der separierten DNA erhalten bleibt. Der DNA-Transfer erfolgt bei hoher Salzkonzentration durch Kapillarkräfte. Die anschließende Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonden erlaubt eine Identifizierung spezifischer, zur Probe homologer Fragmente. Das zum Transfer bestimmte Agarosegel wird (nach dem Fotografieren) mit einer Rasierklinge auf die gewünschte Größe zurechtgeschnitten und für 15 min unter leichtem Schütteln mit 50 Upm in einer Depurinierungslösung (0,25 M HCl) behandelt. Die Depurinierung soll den Transfer von DNA-Fragmenten, die größer als 15 kb sind, erleichtern. Nach kurzem Spülen mit Wasser wird das Gel zweimal für je 30min in Denaturierungslösung geschüttelt. Anschließend erfolgt eine zweifache halbstündige Behandlung mit Neutralisationspuffer. Für den unidirektionalen Transfer wird eine Plastikwanne mit 12,5xSSC gefüllt und über die Wanne mit einer Glasplatte eine Brücke gebaut. Auf die Glasplatte werden drei Lagen mit SSC befeuchtete 3MM-Papier gelegt, die die Lösung aus der Wanne aufgrund der Kapillarkräfte hochsaugen. Das Gel wird, wie auch alle anderen nun folgenden Materialien, luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wird nun ein in SSC abgesättigter Nitrozellulosefilter gleicher Größe aufgelegt. Es folgen drei weitere mit SSC befeuchtete 3MM-Papiere gleicher Größe. Abschließend wird ein etwa 10 cm hoher Stapel trockener Zellstoff darauf gesetzt und das Ganze mit einem Gewicht (0,5kg) beschwert. Die Transferzeit beträgt je nach Größe der Fragmente bis zu 16h. Das Nitrozellulosefilter wird, nach dem Transfer und nach entsprechender Markierung der Geltaschen und des Markers, für 10 min in 2xSSC zur Entfernung der Agarosereste vorsichtig gewaschen. (Die Vollständigkeit des Transfers kann durch Nachfärben des Agarosegels mit Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht kontrolliert werden). Anschließend erfolgt das Fixieren der DNA an das Filter mittels zweistündigen Backen bei 80°C.

Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Etwa 100ng der entsprechenden DNA in 25µl Wasser wurde für 10min auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde 12µl Labeling Mix, 5µl ³²PdCTP und 1µl Klenow-Enzym, (1u/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Dann wurde mit einer NICK Sephacryl Säule G50 DNA Grade (Pharmacia) aufgereinigt: die NICK Sephacryl Säule G50 DNA Grade wurde geöffnet und abgegossen. Sie wurde mit 1xTE aufgefüllt und gespült. Anschließend wurde ca. 500µl 1xTE aufräumen und durchlaufen gelassen. Die radioaktive Sonde wurde aufräumen und einsickern gelassen. Es wurden 400µl 1xTE aufräumen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt (enthält erstes Eluat ohne Sonde). Es wurde erneut 400µl 1xTE aufräumen und in einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt, diese Fraktion enthält die Sonde. Die Sonde wurde vor Benutzung 10min gekocht, anschließend sofort auf Eis gestellt und dann abzentrifugiert.

Filterhybridisierung mit radioaktiver Sonde

Der Filter wurde in 4xSSC waschen. Nun wurde der Filter in Plastikfolie mit minimalem Volumen dreiseitig einschweißt und durch die noch offene Seite wurde ca. 8ml Hybridisierungslösung zugeben. Anschließend wurde der Beutel ganz zugeschweißt. Es erfolgte eine Inkubation für 2h, bei 65°C im Wasserbad, unter langsamen schütteln. Anschließend wurde 200µl der oben beschriebenen Sonde, nach 10 minütigen kochen und sofortigen abkühlen auf Eis, in die Tasche mit dem Filter gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 65°C im Wasserbad, unter langsamen schütteln. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit der Sonde entsorgt und der markierte Filter in 4xSSC mit 0,1% SDS mehrmals gewaschen, bis die Hintergrundstrahlung minimal war (Geigerzähler). Der Filter wurde getrocknet und anschließend in dünne Haushaltsfolie einpackt. Der Filter wurde letztlich mit Röntgenfilm exponiert.

Konstruktion des „bait“-Vektors pBD2(GAL4)-spaghetti

Bluescript-*spaghetti*-Vektor

ATG / Sal-BD-Primer:(5'-
CCGGTCGACTTATGAGTGCACAGGAAAAAGCCTTCGAAC-3')

C-terminalen Xho-BD-Primer:(5'-
GACAACCTTTTCAAGGAATACGGAGTAGCCTAACTCGAGCGG-3')

Sall und XhoI-Restriktionsenzyme (Promega)

Sephacryl S-400 Säule (Amersham)

pBD2(GAL4) [Stratagene]

High Fidelity Expand Kit (Boehringer)

Rapid DNA Ligation Kit (Roche)

Robocycler Gradient 40 (Stratagene)

Die volle Länge der proteinkodierenden Sequenz wurde PCR amplifiziert mit Hilfe der *spaghetti*-cDNA als Matrize, sowie den N-terminalen ATG / Sal-BD-Primer (5'-CCGGTCGACTTATGAGTGCACAGGAAAAAGCCTTCGAAC-3') und dem C-terminalen Xho-BD-Primer (5'-GACAACCTTTTCAAGGAATACGGAGTAGCCTAACTCGAGCGG-3') [High Fidelity Expand Kit, Boehringer]. PCR-Bedingungen: 25µl Reaktionsansatz: 100ng Matrizen DNA+10pmol je Primer+je 200mM Desoxynukleotide+2,5mM MgCl₂+2,5µl 10x Reaktionspuffer und 1µl Pvu-Polymerase. 5min 96°C, 35 Zyklen (2min 54°C, 2min 72°C, 0,8min 94°C), 10min 72°C, 4°C. Das ca. 1.6 kb große amplifizierte PCR-Produkt des *spaghetti*-Gens wurde mit SalI- und XhoI-Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend fand eine Aufreinigung mit Hilfe einer Sephacryl S-400 Säule statt, um die Reste der Primer und der Schnittenden abzuschneiden. Das PCR-Produkt wurde in den mit SalI geschnittenen und dephosphorylierten pBD2(GAL4)-Vektor (Version2 mit Chloramphenicol-Selektionsmarker) [Stratagene] ligiert [Rapid Ligation Kit: 10µl DNA (50ng vector+150ng insert) gelöst in 1x konz. DNA dilution buffer; 10µl T4 DNA ligation buffer; mischen und 1µl T4 DNA ligase zugeben; mischen und bei RT für 5min inkubieren).

Herstellung von kompetenten Hefezellen

YRG-2 Hefezellen (Stratagene)

YPD (20g Difco-Pepton, 10g Hefeextrakt, H₂O ad 960ml, 40ml 50% Glucose, pH 5,8)
SD (6,7g Difco Hefe Nitrogen Basen ohne Aminosäuren, 182,2g D-Sorbitol, H₂O ad 860ml, 100ml 10x Dropout Solution, 40ml 50% Glucose, pH 5,8)
10x Dropout Solution pro Liter: (300mg L-Isoleucin, 1500mg L-Valin, 200mg Adenin Hemisulfat Salz, 200mg Arginin HCl, 300mg Lysine HCl, 200mg L-Methionin, 500mg Phenylalanin, 2000mg L-Threonin, 300mg L-Tyrosin, die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan wurden als 1% Stocklösungen hergestellt)

LiSORB (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA, 1M Sorbitol, H₂O ad 1l)

TE Puffer (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA)

Erlenmeyerkolben 1l

Wasserbad

Photometer (LBK)

Zentrifuge (Sorvall)

Pipetten (Glas und Plastik)

salmon sperm DNA (Stratagene)

PEG 3350 (Sigma)

Lithiumacetat (Sigma)

Es wurde eine YRG-2 Einzelkolonie in 200ml YPD-Medium in einem 500ml Erlenmeyerkolben inokuliert. Diese Kultur wurde bei 30°C, unter schütteln (220 Upm) inkubiert bis die Kultur gesättigt erscheint (1-2 Tage). Es wurde von der gesättigten Kultur in 300ml frisches YPD-Medium soviel überführt bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,2 erreicht wurde. Die Kultur wurde bei 30°C, unter schütteln (220 Upm) inkubiert bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,8 erreicht wurde. Die Kultur wurde mit 3800 Upm für 5min, RT sedimentiert. Das Sediment mit

den Zellen wurde in 100ml dH₂O durch ständiges pipettieren mit einer sterilen Glaspipette gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentieren. Die Zellen wurden in 50ml LiSORB suspendiert und anschließend für 30min in 30°C Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und in 250µl LiSORB suspendiert. Es wurde mit LiSORB auf 1ml Endvolumen aufgefüllt. Es wurde salmon sperm DNA mit einer Konzentration von 20mg/ml (Stratagene), für mind. 15min gekocht. Anschließend wurden 800µl LiSORB zu der DNA gegeben, es wurde gemischt. Die DNA-Lösung wurde auf RT abgekühlt. Zu der DNA-Lösung wurden die 1ml Hefezellen zugegeben und gründlich gemischt. Es wurden letztlich 10ml 1xTE-Puffer, LiAc und 40% (w/v) PEG-Lösung zugegeben, gründlich gemischt. Die kompetenten Zellen wurden zu je 1ml aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

Transformation der kompetenten Hefezellen

Kompetente YRG-2 Hefezellen

DNA der jeweiligen Plasmide

SD (6,7g Difco Hefe Nitrogen Basen ohne Aminosäuren, 182,2g D-Sorbitol, H₂O ad 860ml, 100ml 10x Dropout Solution, 40ml 50% Glucose, pH 5,8)
10x Dropout Solution pro Liter: (300mg L-Isoleucin, 1500mg L-Valin, 200mg Adenin Hemisulfat Salz, 200mg Arginin HCl, 300mg Lysine HCl, 200mg L-Methionin, 500mg Phenylalanin, 2000mg L-Threonin, 300mg L-Tyrosin, die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan wurden als 1% Stocklösungen hergestellt)

Erlenmeyerkolben 1l

Wasserbad

Zentrifuge (Sorvall)

Zu je 1ml der kompetenten Zellen wurden ca. 100ng der zu transformierenden DNA gegeben. Die Zellen wurden bei 30°C für 30min im Wasserbad unter schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 8min unterzogen. Die Zellen wurden für 8min auf Eis gestellt und dann erneut einem Hitzeschock für 8min bei 42°C unterzogen. Die Zellen wurden in ein 50ml Röhrchen mit 10ml SD-Medium mit der entsprechenden Aminosäuren-Zusammenstellung überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 30°C für 1h, unter schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei 3800 Upm für 1min sedimentiert und in 800µl SD-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf große oder kleine Platten mit SD-Medium mit der entsprechenden Aminosäure-Zusammensetzung ausplattiert. Die Platten wurden für mehrere Tage, bis Kolonien sichtbar wurden, inkubiert.

Präparation von Hefe-Proteinextrakten

Mit entsprechender DNA transformierte Hefe

Hefe Lysis Lösung (2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA)

Protease Inhibitorlösung (0,1mg/mlPepstatin A (Sigma); 0,03mM Leupeptin (Sigma); 145mM Benzamidin (Sigma); 0,37mg/ml Aprotinin (Sigma))

cracking-Puffer Stock-Lösung (8M; Harnstoff; 5% SDS; 40mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1mM EDTA; 0,4mg/ml Bromphenolblau; Deionisiertes Wasser)

cracking-Puffer komplett (1ml cracking-Puffer Stock-Lösung; 10µl Mercaptoethanol; 70µl Protease Inhibitor-Lösung; 50µl PMSF 100x Stocklösung)

Flüssigstickstoff mit Gefäß

Zentrifuge (Sorvall)

Vortex (Neolab)

Wasserbad

Für jeden transformierten Hefe-Stamm, der mit Western Blot getestet werden soll, wurde eine über Nacht-Kultur in 5ml SD-Medium mit der entsprechenden Aminosäure-Zusammensetzung hergestellt. Dazu sollte eine Kolonie mit einem Durchmesser von 1-2mm zum Inokulieren des Mediums gewählt werden. Ebenso wurde eine Kolonie untransformierter Hefe in 10ml SD-Medium mit der entsprechenden Aminosäure-Zusammensetzung überführt und über Nacht, bei 30°C inkubiert. Die über Nacht-Kulturen wurden dann für 0,5-1min gevortext, um Zellklumpen zu lösen. Nun wurde jede über Nacht-Kultur in 50ml frisches YPD-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ von 0,4-0,6, bei 30°C, unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Diese Kulturen wurden sofort in eisgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und für 5min bei 4°C mit 1000 Upm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 50ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Sedimentierung für 5min bei 4°C mit 1000 Upm, wurde das Sediment in flüssigen Stickstoff eingefroren und kann bei -70°C gelagert werden. Zugabe von auf 60°C vorgewärmtem cracking-Puffer. Auf Grund des schnellen Degradierens von PMSF, muss der Puffer immer frisch und kurz vorher angesetzt werden. Es wurde je 100µl cracking-Puffer pro 7,5 OD₆₀₀ Einheiten Zellen benötigt. Das Sediment mit

den tiefgefrorenen Zellen wurde schnell nach Zugabe des cracking-Puffer, im 60°C Wasserbad für max. 2min aufgetaut. Es empfiehlt sich alle 7min frisches PMSF zuzugeben. Nun wurden diese Zellsuspensionen in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 80µl Glaskügelchen pro 7,5 OD600 Einheiten Zellen überführt. Es schloss sich 1min intensives Vortexen an. Die Zelltrümmer und unlysierten Zellen wurden absedimentiert und für 3-5min gekocht, anschließend wurde für 1min intensiv gevortext. Nach erneuter Sedimentierung können beide Überstände vereint werden. Der Überstand kann nun nach kochen auf das Polyacrylamidgel für den Western Blot geladen werden.

Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefezellen

Mit entsprechender DNA transformierte Hefe

Hefe Lyse Lösung (2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA)

Protease Inhibitorlösung (0,1mg/mlPepstatin A (Sigma); 0,03mM Leupeptin (Sigma); 145mM Benzamidin (Sigma); 0,37mg/ml Aprotinin (Sigma))

cracking-Puffer Stock-Lösung (8M; Harnstoff; 5% SDS; 40mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1mM EDTA; 0,4mg/ml Bromphenolblau; Deionisiertes Wasser)

cracking-Puffer komplett (1ml cracking-Puffer Stock-Lösung; 10µl Mercaptoethanol; 70µl Protease Inhibitor-Lösung; 50µl PMSF 100x Stocklösung)

Flüssigstickstoff mit Gefäß

Zentrifuge (Sorvall)

Vortex (Neolab)

Wasserbad

Plasmid-DNA kann, durch das folgende Protokoll, aus den Hefezellen in ausreichender Qualität und Quantität isoliert werden, um damit E. coli Zellen zu transformieren. Diese Methode liefert eine Mischung von intakten Plasmiden und chromosomalen DNA-Fragmenten, daher ist die so erhaltene Plasmid-DNA nicht rein genug für eine Gelelektrophoretische Analyse. Es wurden 2ml SD-Medium mit der entsprechenden Aminosäurezusammensetzung mit einer isolierten His⁺ - LacZ⁺ Hefekolonie inokuliert. Diese Kultur wurde bei 30°C inkubiert, bis sie gesättigt war. Die Kultur wurde in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden bei 13000 Upm sedimentiert, der Überstand wurde verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 0,3ml Hefe Lyse-Lösung, es wurde gründlich resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 0,3ml Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol [25:24:1 (v/v/v)] und 0,3g säuregereinigte Glaskügelchen. Diese Suspension wurde für 2min gründlich gevortext. Die Suspension wurde für 5min bei RT mit 13000 Upm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die DNA wurde mit 1/10 Volumen von 3M NaOAc (pH 5,2) und 2,5fachen Volumen Ethanol präzipitiert und anschließend bei 13000 Upm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment mit der DNA wurde mit 1ml 70%

(v/v) EtOH gewaschen und erneut für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 50µl sterilem H₂O gelöst. Für die Transformation von XL-2 Blue MRF⁺ kompetenten Zellen wurden jeweils 5-20µl dieser DNA-Lösung benötigt. Die transformierten Zellen können anschließend auf LB-Platten mit 50µg/ml Ampicillin (für AD-Konstrukte) oder Chloramphenicol; 30µg/ml (für BD-GAL4-Konstrukte) ausplattiert werden

Transformation von XL-2 MRF' coli Zellen

XL-2 MRF' coli Zellen (Stratagene)

β -mercapthoethanol (Stratagene)

entsprechenden Plasmid-DNA

Wasserbad

Inkubator

LB-Platten (pro l: 10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, H₂O ad 1l, pH 7,0; eventuell mit 50mg/ml Ampicillin oder 12,5mg/ml Tetracyclin; 16g Agar (Difco))

SOC-Medium (pro l: 20g Trypton; 5g Hefeextrakt; 0,5g NaCl; autoklavieren; 10ml einer 1M MgCl₂-Lösung und 10ml einer 1M MgSO₄-Lösung; 20ml einer 20% (w/v) Glukose-Lösung)

Zentrifuge (Hereus)

Vortex (Neolab)

Inkubator

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Es wurde 3,4 μ l β -mercaptoethanol zu je 200 μ l der Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 10min auf Eis inkubiert, wobei alle 2min vorsichtig geschüttelt wurde. Es wurde ca. 100ng der Plasmid-DNA zugegeben, geschüttelt und für 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einen Hitzeschock von 30sec, 42°C unterzogen und dann sofort auf Eis gestellt. Nach 2min wurde zu den Zellen 200 μ l SOC-Medium zugegeben und dieser Ansatz wurde bei 37°C, mit 250 Upm für 1h inkubiert. Es wurden die gesamten 200 μ l auf LB-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausplattiert.

In vitro Transkription

5x Transkriptions-Puffer (Promega) DTT (Promega) RNasin (Promega) rNTPs (Promega) DNA Polymerasen T7 oder T3 oder SP6 (Promega) Wasserbad

Es wurde der folgende Ansatz pipettiert:

20µl 5xTranskriptionspuffer, 10µl DTT, 2,5µl RNasin, 20µl rNTPs-Mix, 2µl DNA je 1µg/µl, 2µl Polymerase (z.B. T7-Polymerase), auf 100 mit H₂O.

Der Ansatz wurde für 2h, 37°C inkubiert. Anschließend kann die RNA auf einem 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert werden. Es sollte ein RNA-Marker zur Bestimmung der Größe verwendet werden, da einzelsträngige RNA im Gel eine andere Mobilität besitzt, als doppelsträngige DNA.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Agarosegel mit entsprechender DNA-Bande

QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)

Wasserbad

Zentrifuge (Hereus)

Vortex (Neolab)

Mit Hilfe einer Rasierklinge wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die ethidiumbromidgefärbte Bande wurde dabei mittels UV-Tisch sichtbar gemacht. Es wurden drei Volumen des Puffers QG zu einem Volumen Gel gegeben. Anschließend wurde der Ansatz bei 50°C, für 10min bis zur vollständigen Lösung des Gels im Puffer inkubiert. Der Ansatz wurde zu je 800µl auf eine QIAquick Säule gegeben und jeweils für 1min bei 13000 Upm zentrifugiert, es wurde jeweils das Zentrifugat verworfen. Es wurde mit 0,75ml Puffer PE gewaschen (1min, 13000 Upm, Zentrifugat verworfen). Es folgte ein Leerlauf von 1min, 13000 Upm, um überschüssigen Puffer zu entfernen. In einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die Säule hineingestellt und die gebundene DNA wurde mit 50µl Elutionspuffer EB eluiert.

Herstellung der pGEX4T1-hsp83³³⁵⁻⁷¹⁷; pGEX4T1-emc und pGEX4T1-CG5792-Konstrukte für den Gluthathion in vitro Bindungstest.

DNA der entsprechenden Gene (in pBluescript oder pAD2.1)

pGEX-4T1-Vektor (Amersham)

Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI (Promega)

Alkalische Phosphatase (Roche)

QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)

Rapid Ligation Kit (Roche)

Wasserbad (Kühner)

Zentrifuge (Heraeus)

Die Plasmide mit der DNA der Gene wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI geschnitten und die inserts mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits isoliert. Der Expressionsvektor pGEX4T1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen geschnitten und dephosphoryliert. Die inserts wurden mit Hilfe des Rapid Ligation Kits in den Vektor ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden XL-2 MRF⁺ coli Zellen transformiert. Mit Hilfe des QIAprep Miniprep-Kits wurden aus den transformierten Zellen die Plasmide isoliert. Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI geschnitten und die DNA auf einem 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid separiert. Die Plasmide, die ein korrektes Schnittmuster zeigten, wurden weiterverwendet.

Transformation von BL21-CodonPlus coli Zellen mit den pGEX4T1-hsp83⁵³⁵⁻⁷¹⁷; pGEX4T1-emc und pGEX4T1-CG5792-Konstrukten für den Gluthathione in vitro Bindungstest.

pGEX-4T1-Vektor mit den entsprechenden Genen
BL21-CodonPlus coli Zellen (Stratagene)

beta-Mercaptoethanol (Stratagene)

LB-Platten (pro l: 10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, H₂O ad 1l, pH 7,0;
50mg/ml Ampicillin; 16g Agar (Difco))

SOC-Medium (pro l: 20g Trypton; 5g Hefeextrakt; 0,5g NaCl; autoklavieren; 10ml
einer 1M MgCl₂-Lösung und 10ml einer 1M MgSO₄-Lösung; 20ml einer
20% (w/v) Glukose-Lösung)

Wasserbad (Kühner)

Zentrifuge (Hereus)

Vortex (Neolab)

Die kompetenten BL-21 Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden zu je 100µl aliquotiert. Der β-Mercaptoethanol wurde 1 zu 10 mit sterilem Wasser verdünnt. Hiervon wurden 2µl zu je 100µl der Zellen gegeben und vorsichtig geschüttelt. Die Zellen wurden auf Eis aller 2min, insgesamt für 10min vorsichtig geschüttelt. Zu den Zellen wurden ca. 100ng der verschiedenen Plasmide zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und auf Eis für 30min inkubiert. Die Zellen wurden für 20sec bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Danach wurden die Zellen für 2min auf Eis gestellt. Es wurde 0,9ml vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und bei 37°C mit 250 Upm für 1h inkubiert. Der Zellen wurde kurz bei 13000 Upm sedimentiert, der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 200µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Platten mit Ampicillin plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

***Induktion der Fusionsproteine der pGEX4T1-Konstrukte in BL21-Zellen mit IPTG
(kleiner Maßstab zum Isolieren der korrekten Kolonien)***

BL21-Zellen transformiert mit den pGEX-4T1-Vektor mit den entsprechenden Genen

2x YT-G-Medium (pro l: 16g Bacto-Trypton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl, H₂O ad 800ml, pH 7,0; auf 900ml mit H₂O; autoklavieren; 100ml einer 20% Glukose-Lösung; 1ml von 100mg/ml Ampicillin;)

IPTG (isopropyl β -D-thiogalactosid, Laktose-Analog; 100mM Stocklösung)

1x PBS

Cell disrupter (LKB)

Glutathion Sepharose 4B (Amersham)

Drehrad (LKB)

Coomassie-Blau

SDS-PAGE mit Zubehör

Wasserbad (Kühner)

Zentrifuge (Hereus)

Vortex (Neolab)

Von den über Nacht gewachsenen LB-Platten mit den transformierten BL-21 Zellen wurden mehrere Einzelkolonien gepickt und in 2ml 2xYT-G für 3-5h bei 37°C mit 250 Upm inkubiert. Die Kulturen wurden bis zu einer OD600 von 0,6 wachsen gelassen. Die Fusionsproteine wurden durch Zugabe von 20 μ l einer 100mM IPTG-Stocklösung induziert. Es wurde für 2h 37°C, 250 Upm inkubiert. Es wurden die Zellen kurz sedimentiert, der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 300 μ l eiskaltem 1xPBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Cell disrupters (je 1min auf Eis, Einstellung 6, kleine Spitze, permanent) sonifiziert. Das Sonifikat wurde sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurde hierzu 20 μ l der Glutathion Sepharose 4B zugegeben. Der Ansatz wurde auf einem Drehrad für 30min inkubiert. Es wurde 100 μ l 1xPBS zugegeben, kurz gevortext und anschließend wurde die Sepharose sedimentiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die

Sepharose wurde in 2xSDS-loading buffer aufgenommen, für 10min gekocht und einer SDS-PAGE unterzogen. Nach Coomassie-Färbung des Gels konnten die Banden sichtbar gemacht werden.

Induktion der Fusionsproteine der pGEX4T1-Konstrukte in BL21-Zellen mit IPTG (im großen Maßstab)

BL21-Zellen transformiert mit den pGEX-4T1-Vektor mit den entsprechenden Genen

2x YT-G-Medium (pro l: 16g Bacto-Trypton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl, H₂O ad 800ml, pH 7,0; auf 900ml mit H₂O; autoklavieren; 100ml einer 20% Glukose-Lösung; 1ml von 100mg/ml Ampicillin;)

IPTG (isopropyl β -D-thiogalactosid, Laktose-Analog; 100mM Stocklösung)

1xPBS

Lysozym (1mg/ml Stocklösung; Sigma)

Triton X-100 (Sigma)

Cell disrupter (LKB)

Glutathion Sepharose 4B (Amersham)

Drehrad (LKB)

Coomassie-Blau

SDS-PAGE

2x SDS loading Puffer

Wasserbad (Kühner)

Zentrifuge (Sorvall)

Von den Kolonien, die das korrekte Fusionsprotein exprimieren, wurden Einzelkolonien gepickt und in 100 ml 2xYT-G über Nacht bei 37°C mit 250 Upm inkubiert. Die Kulturen wurden 1 zu 10 mit vorgewärmten 2xYT-G verdünnt und für zwei weitere Stunden, bei 37°C, 250 Upm inkubiert, bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bis 2. Die Fusionsproteine wurden durch Zugabe von einer 100mM IPTG-Stocklösung zu einer Endkonzentration von 0,1mM induziert. Es wurde für 2h 37°C, 250 Upm inkubiert. Es wurden die Zellen sedimentiert (10min, 4°C), der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 10ml eiskaltem 1xPBS aufgenommen. Es wurde 20 μ l Lysozym

(10mg/ml) zugegeben und für 20min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Cell-disrupters (sechsmal je 1min auf Eis, Einstellung 6, kleine Spitze, permanent) sonifiziert. Das Sonifikat wurde sedimentiert und der Überstand in ein neues Falcon 50ml Gefäß überführt. Es wurde Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30min, RT auf dem Drehrad inkubiert. Es wurde für 10min, 4°C, 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder gleich mit Sepharose versetzt oder bei -80°C tiefgefroren. Es wurde hierzu 1ml der Gluthathion Sepharose 4B zugegeben. Der Ansatz wurde auf einem Drehrad für 30min inkubiert. Die Sepharose wurde sedimentiert und bei 4°C gelagert, der Überstand tiefgefroren. Ein Aliquot der Sepharose wurde dreimal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen, in 2xSDS-loading Puffer überführt, 10min gekocht und einer SDS-PAGE unterzogen. Nach Coomassie-Färbung des Gels wurde die korrekte Größe der Fusionsproteine überprüft.

in vitro Translation von ³⁵S-Methionin-Spaghetti und SpaghettiΔTPR-Proteinen

pBluescript-*spaghetti* und pBluescript-*spaghetti*ΔTPR DNA

In vitro Translations-Kit (T3/ T7; Promega)

Wasserbad (Kühner)

SDS-PAGE
2xSDS loading Puffer

Blot-Apparatur (LKB)

Röntgenfilm (Kodak)

Es wurde der folgende Reaktionsansatz pipettiert: 25µl Rabbit Reticulocyte Lysat; 2µl Reaction Puffer; 1µl RNA-Polymerase T7; 1µl Aminoacid Mixture minus Methionine; 4µl ³⁵S-Methionin (10mCi/ml); 1µl RNasin Ribonuclease Inhibitor 40U/µl; 2µl der jeweiligen pBluescript-DNA; auf 50µl mit sterilem Wasser. Der Ansatz wurde für 1h bei 30°C inkubiert. Danach bei -20°C tiefgefroren. 20µl des Ansatzes wurde auf einem 12% Polyacrylamidgel geladen, geblottet und die Membran auf Röntgenfilm exponiert.

Glutathion-Bindungstest mit den GST-Fusionsproteinen und in vitro translatierten ³⁵S-Methionin-Spaghetti und SpaghettiΔTPR-Proteinen

Sepharose 4B mit den gebundenen GST-Fusionsproteinen

in vitro translatierte Spaghetti-und SpaghettiΔTPR-Proteine

Drehrad (LKB)

SDS-PAGE

2xSDS loading Puffer

Blot-Apparatur (LKB)

Zentrifuge (Hereus)

Vortex (Neolab)

Röntgenfilm (Kodak)

Es wurden je 300µl der Sepharose4B mit den gebundenen GST-Fusionsproteinen (vorherige Versuche) zusammen mit je 5µl der radioaktiven Fusionsproteine für 4h bei RT, auf dem Drehrad in Inkubationspuffer inkubiert. Es wurde fünfmal mit 1xPBS gewaschen. Die Sepharose wurde in 2xSDS-loading Puffer aufgenommen und für 10min gekocht. Es wurden je 50µl der jeweiligen Ansätze auf ein 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, die Proteine wurden separiert, geblottet und die Membran mit einem Röntgenfilm exponiert.

Herstellung von Fliegenfutter (nach Nüsslein-Volhard)

Es werden die folgenden Komponenten benötigt:

Wasser	30l	20l	10l
Agar	240g	160g	80g
Maismehl	2400g	1600g	800g
Sojamehl	300g	200g	100g
Bierhefe	540g	360g	180g
Malzextrakt	2400g	1600g	800g
Rübensirup	660g	440g	220g
Nipagin	72g	48g	24g
Propionsäure	187,5ml	125ml	62,5ml
Phosphorsäure	18,75ml	12,5ml	6,25ml

1. Agar im kochenden Wasser lösen
2. Malz- Sirup-Lösung zugeben. Aufkochen lassen
3. Hefe- Mehl-Lösung zugeben.
4. Aufkochen, Deckel schließen und gründlich kochen lassen für ca. zwei Stunden
5. Abkühlen lassen
6. Wenn Temperatur unter 50°C ist die Säuren zugeben.
7. Zwischendurch kräftig rühren.
8. Abfüllen, sofort mit Gaze abdecken, zwei Stunden Trocknen lassen, stöpseln und über Nacht bei RT stehen lassen.
9. Bei 18°C lagern.

LITERATURVERZEICHNISS

Literaturverzeichnis

Helen M. Beere, Beni B. Wolf, Kevin Cain, Dick D. Mosser, Artin Mahboudi, Tomomi Kuwana, Pankaj Tailor, Richard I. Morimoto, Gerald M. Cohen and Douglas R. Green (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2, 469-475.

V. Van de Bor, R. Delanoue, R Cossard and J. Silber (1999). Truncated products of the *vestigial* proliferation gene induce apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 6, 557-564.

Christoph Borner and Laurent Monney (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death and Differentiation*. 6, 497-507.

Andrea H. Brand, and Norbert Perrimon (1993). *Nature*. 118, 401-415.

Andrea H. Brand, Armen S. Manoukian, and Norbert Perrimon (1994). *Methods in cell biology*. 44, 635-654.

Broach, J. R. und Hicks, J. B. (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell*. 21, 501-508.

Carlos V. Cabrera, Maria C. Alonso and Hella Huikeshoven (1994). Regulation of scute function by extramacrochaete in vitro and in vivo. *Development*. 120, 3595-3603

Hui-Chen Jane Chang, Debra F. Nathan, and Susan Lindquist (1997). In vivo Analysis of the Hsp90 Cochaperone *Si1* (p60). *Molecular and Cellular Biology*. 17, 318-325.

Shiying Chen, Viravan Prapapanich, Ronald A. Rimerman, Bent Honore, and David F. Smith (1996). Interactions of p60, a Mediator of Progesterone Receptor Assembly, with Heat Shock Proteins Hsp90 and Hsp70. *Molecular Endocrinology*. 682-693.

Tze-bin Chou and Norbert Perrimon (1996). The Autosomal FLP-DFS Technique for Generating Germline Mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 144, 1673-1679.

Amit K. Das, Patricia T. W. Cohen and David Barford (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implication for TPR-mediated protein-protein interactions. *The EMBO Journal*. 17, 1192-1199.

Dali Ding, Susan M. Parkhurst, Susan R. Halsell, and Howard D. Lipshitz (1993). Dynamic *Hsp83* RNA Localization during *Drosophila* Oogenesis and Embryogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. *13*, 3773-3781.

Maria J. Garcia-Garcia, Philippe Romain, Pat Simpson and Juan Modolell (1999). Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development*. *126*, 3523-3532.

Elisabeth Gateff and Bernard M. Mechler (1989). Tumor-Suppressor Genes of *Drosophila melanogaster*. *Oncogenesis* *2*, 221-245.

Xiang Gao and Kenneth v. Honn (1995). Recessive Oncogenes: Current Status. *Pathology Oncology Research*. *1*, 1-16.

Ennio Giordano, Ivana Peluso, Stefania Senger, and Maria Furia (1999). *Minijfly*, a *Drosophila* Gene required for ribosome biogenesis. *144*, 1123-1133.

Golic, K. G., and Linquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyze site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* *59*, 499-509.

Cayetano Gonzalez and David M. Glover. Techniques for studying mitosis in *Drosophila*. 143-175.

Scott Goode and Norbert Perrimon (1997). Inhibition of patterned cell shape change and cell invasion by Discs large during *Drosophila* oogenesis. *Genes and Development*. *11*, 2532-2544.

Lakshmi Goyal, Kimberly McCall, Julie Agapite, Erika Hartwig and Hermann Steller (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila reaper*, *hid* and *grim* through inhibition of IAP function. *EMBO*. *19*, 589-597.

Hartenstein, V. (1993). Atlas of *Drosophila* development. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

W. Hennig (1995). Genetik. Springer.

Edith Hintermann, Nicole C. Grieder, Remo Amherd, Daniel Brodbeck, and Urs A. Meyer (1996). Cloning of an arylalkylamine N-acetyltransferase (aaNAT1) from *Drosophila melanogaster* expressed in the nervous system and the gut. *Proc. Natl. Acad. Sci*. *93*, 12315-12320.

Jörg Höfeld (1999). Regulation of the Heat Shock Cognate Hsc70 in the Mammalian Cell: The Characterization of the Anti-Apoptotic Protein BAG-1 Provides Novel Insights. *Nature*. 269-274.

Collen D. Hough, Daniel F. Woods, Sangbin Park, and Peter J. Bryant (1997). Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs large. *Genes and Development*. 11, 3242-3253.

Audrey M. Huang, E. Jay Rehm, and Gerald M. Rubin (1999). Recovery of DNA Sequences Flanking P-element Insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue. 429-437.

Ioannis Iliopoulos, Istvan Török and Bernard M. Mechler (1997). The *DnaJ60* Gene of *Drosophila melanogaster* Encodes a New Member of the DnaJ Family of Proteins. *Biol. Chem.* 378, 1177-1181.

Jayaram, M. (1985). Two-micrometer circle site-specific recombination: The minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 5875-5879.

R. Farkas and B. M. Mechler (2000). The timing of *Drosophila* salivary gland apoptosis displays an *l(2)gl*-dose response. *Cell Death and Differentiation*. 7, 89-101.

Felix D. Karim and Gerald M. Rubin (1999). PTP-ER, a Novel Tyrosine Phosphatase, Functions Downstream of Ras1 to Downregulate MAP Kinase during *Drosophila* Eye Development. *Molecular Cell*. 3, 741-750.

Bodo M. H. Lange, Angela Bachi, Matthias Wilm and Cayetano Gonzalez (2000). Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *EMBO*. 19, 1252-1262.

Mingfa Li, Dennis Strand, Andreas Krehan, Walter Pyerin Hans Heid, Beate Neumann and Bernard M. Mechler. Casein Kinase 2 Binds and Phosphorylates the Nucleosome Assembly Protein-1 (NAP1) in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 293, 1067-1084.

Tzmin Lee and Liqun Luo (1999). Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis. *Neuron*. 22, 451-461.

Cecilia de Lorenzo, Dennis Strand and Bernard M. Mechler (1999). Requirement of *Drosophila l(2)gl* function for survival of the germline cells and organization of the follicle cells in a columnar epithelium during oogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **43**, 207-217.

M. Milan, S. Campuzano, and A. Garcia-Bellido (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5691-5696.

Arati Mishra, Joachim Marhold, Anastasios Gatos, Mingfa Li, Istvan Török, Pradip Sinha, and Bernard M. Mechler (2000). *Vartul*, a novel PDZ-LRR tumour suppressor of *Drosophila*, displays Dlg-dependent regulation of cell shape and proliferation in epithelial tissues. Unpublished.

W.A. Müller und M. Hassel (1999). *Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen*. Springer-Verlag.

Shigekazu Nagata (1997). Apoptosis by Death Factor. *Cell*. **88**, 355-365.

Eisuke Nishida, Shigeo Koyasu, Hikoichi Sakai, and Ichiro Yahara (1986). Calmodulin-regulated Binding of the 90-kDa Heat Shock Protein to Actin Filaments. *The Journal of Biological Chemistry*. **261**, 16033-16036.

Vincent Ollendorff and Daniel J. Donoghue (1997). The Serine/ Threonine Phosphatase PP5 Interacts with CDC16 and CDC27, Two Tetratricopeptide Repeat containing Subunits of the Anaphase-promoting Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. **51**, 32011-32018.

Norbert Perriomon, Anne Lanjun, Charles Arnold and Elizabeth Noll (1996). Zygotic Lethal Mutations With Maternal Effect Phenotypes in *Drosophila melanogaster*. II.Loci on the Second and Third Chromosomes Identified by *P*-Element-Induced Mutations. *Genetics Society of America*. 1681-1692.

Chris B. Phelps and Andrea H. Brand (1998). Ectopic Expression in *Drosophila* Using GAL4 Ssystem. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. **14**, 367-379.

William B. Pratt (1998) The hsp-90 based Chaperone System: Involvement in Signal Transduction from a Variety of Hormone and Growth Factor Receptors. *Society for Experimental Biology and Medicine*. 420- 430.

Martin C. Raff (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. **356**, 397- 399.

James B. Skeath and Sean B. Carroll (1991). Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes and Development*. 5, 984-995.

F. Roch, F. Serras, F. J. Cifuentes, M. Corominas, B. Alsina, M. Amoros, A. Lopez-Varea, R. Hernandez, D. Guerra, S. Cavicchi, J. Baguna and A. Garcia-Bellido (1997). Screening of larval/pupal P-element induced lethals on the second chromosome in *Drosophila melanogaster*: clonal analysis and morphology of imaginal discs. 103-112.

Gerald M. Rubin and Allan C. Spradling (1982). Genetic Transformation of *Drosophila* with Transposable Element Vectors. *Science*. 218, 348-353.

Suzanne L. Rutherford and Susan Linquist (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*. 396, 336-342.

Stein Saeboe-Larssen, May Lyamouri, John Merriam, Morten P. Oksvold and Andrew Lambertsson (1998). Ribosomal Protein Insufficiency and the Minute Syndrome in *Drosophila*: A Dose-Response Relationship. *Genetics*. 148, 1215-1224.

Ayman Saleh, Srinivasa M. Srinivasula, Levent Balkir, Paul D. Robbins and Emad S. Alnemri (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology*. 2, 476-483.

Clemens Scheufler, Achim Brinker, Gleb Bourenkov, Stefano Pegoraro, Luis Moroder, Hans Bartunik, F. Ulrich Hartl, and Ismail Moarefi (2000). Structure of TPR-Domain Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70-Hsp90 Multichaperone Machine. *Cell*. 101, 199-210.

Zhiwei Song, Kimberly McCall, Hermann Steller (1997). DCP-1, a *Drosophila* Cell Death Protease Essential for Development. *Science*. 275, 536-540.

Nicole A. Theodosiou and Tian Xu (1998). Use of FLP/FRT System to Study *Drosophila* Development. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. 14, 355-365.

Tibor Török, Gabriella Tick, Martha Alvarado and Istvan Kiss (1993). *P-lacW* Insertional Mutagenesis on the Second Chromosome of *Drosophila melanogaster*: Isolation of Lethals With Different Overgrowth Phenotypes. *Genetics*. 135, 71-80.

Thomas A. Weaver and Robert A. H. White (1995). *Headcase*, an imaginal specific gene required for adult morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development*. 121, 4149-4160.

Eric Wieschau. Cell Lineage Relationships in the *Drosophila* Embryo. 97-118.

John P. Wing, Lei Zhou, Lawrence M. Schwartz and John R. Nambu (1998). Distinct cell killing properties of the *Drosophila reaper*, *head involution defective*, and *grim* genes. *Cell Death and Differentiation*. 5, 930-939.

Kristin White, Megan E. Grether, John M. Abrams, Lynn Young, Kim Farrell, Hermann Steller (1994). Genetic Control of Programmed Cell Death in *Drosophila*. *Science*. 264, 677-683.

Corinna Wülbeck and Pat Simpson (2000). Expression of *achaete-scute* homologues in discrete proneural clusters on the developing notum of the medfly *Ceratitis capitata*, suggests a common origin for the stereotyped bristle patterns of higher Diptera. *Development*. 127, 1411-1420.

David L. Vaux (1999). Caspases and apoptosis-biology and terminology. *Cell Death and Differentiation*. 6, 493-494.

Ann-Mari Voie and Stephen Cohen (1998). Germ-Line Transformation of *Drosophila melanogaster*. *Cell Biology*. 3, 510-517.

Gerd Vorbrüggen, Susanne Önel, Herbert Jäckle (2000). Restricted expression and subnuclear localization of the *Drosophila* gene *Dnop5*, a member of the Nop/Sik family of the conserved rRNA processing factors. *Mechanisms of Development*. 90, 305-308.

Tian Xu and Stephen D. Harrison (1994). Mosaic Analysis Using FLP Recombinase. *Methods in Cell Biology*. 44, 655-681.

Lin Yue, Timothy L. Karr, Debra F. Nathan, Hewson Swift, Shaila Srinivasan and Susan Linquist (1999). Genetic Analysis of Viable Hsp90 Alleles Reveals a Critical Role in *Drosophila* Spermatogenesis. *Genetics*. 151, 1065-1079.

Jianjun Zhang and Richard W. Carthew (1998). Interactions between Wingless and Dfz2 during *Drosophila* wing development. *Development*. 125, 3075-3085.

Vorträge, Poster und Publikationen:

Vorträge:

The *spaghetti* gene encodes a TPR-protein interacting with HSP90 and forms a large chaperone complex required for imaginal disc development and morphogenesis. Marhold Joachim, Illiopoulos Ioannis, Schmitt Rolf, Kempf Tore, Mechler Bernard M. and Török Istvan. 6th Regional Drosophila Meeting. Hohenheim, July 22-23, 1999.

Scribble protein isoforms in *Drosophila*. Joachim Marhold and Mingfa Li. Heidelberg Developmental Biology Seminars. 2nd April 2001. EMBL, Heidelberg.

Posterpräsentationen:

The *spaghetti* gene encodes a TPR-protein interacting with HSP90 and forms a large chaperone complex required for imaginal disc development and morphogenesis. Török, I., Illiopoulos, I., Marhold, J., Schmitt, R., Kempf, T., and Mechler, B.M. 16th European Drosophila Research Conference. September 29-October 2, 1999. Zürich, Schweiz.

The TPR- containing Spaghetti protein interacts with Hsp90 and is required for cell survival and differentiation in imaginal discs. J. Marhold, I. Török, I. Illiopoulos, A. Mishra, C. De Lorenzo, T. Kempf, R. Schmitt, B.M. Mechler. 41st Annual Drosophila Research Conference. March 22-26, 2000. Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

The TPR-containing Spaghetti protein interacts with HSP90 and is required for cell survival and differentiation in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. J. Marhold, I. Török, I. Iliopoulos, A. Mishra, C. De Lorenzo, S. Oksas, T. Kempf, R. Schmitt, B. M. Mechler. External Review. October 2000, DKFZ- Heidelberg.

Publikationen:

Suche nach Proteinen, die mit dem vom *spaghetti*-Gen kodierten Protein im *yeast two-hybrid* System interagieren. Diplomarbeit vorgelegt der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. 1998.

Vartul, a novel PDZ-LRR tumour suppressor of *Drosophila*, displays Dlg-dependent regulation of cell shape and proliferation in epithelial tissues. Arati Mishra, Joachim Marhold, Anastasios Gatos, Mingfa Li, Istvan Török, Pradip Sinha, and Bernard M. Mechler. Unpublished, 2000.

Dynamic chromosomal association of the putative *Drosophila* methyl-DNA binding protein dMBD2/3. Marcin Zbylut¹, Joachim Marhold¹, Mingfa Li, Daniel Gerlich, Esteban Ballestar, Bernard M. Mechler, and Frank Lyko. Submitted, 2001. (¹Both authors contributed equally).

Differential Expression of Two Scribble Isoforms during *Drosophila* Embryogenesis. Mingfa Li¹, Joachim Marhold¹, Arati Mishra, Anastasios Gatos, Istvan Török, Pradip Sinha, and Bernard M. Mechler. Submitted, 2001. (¹Both authors contributed equally).

Anhang:

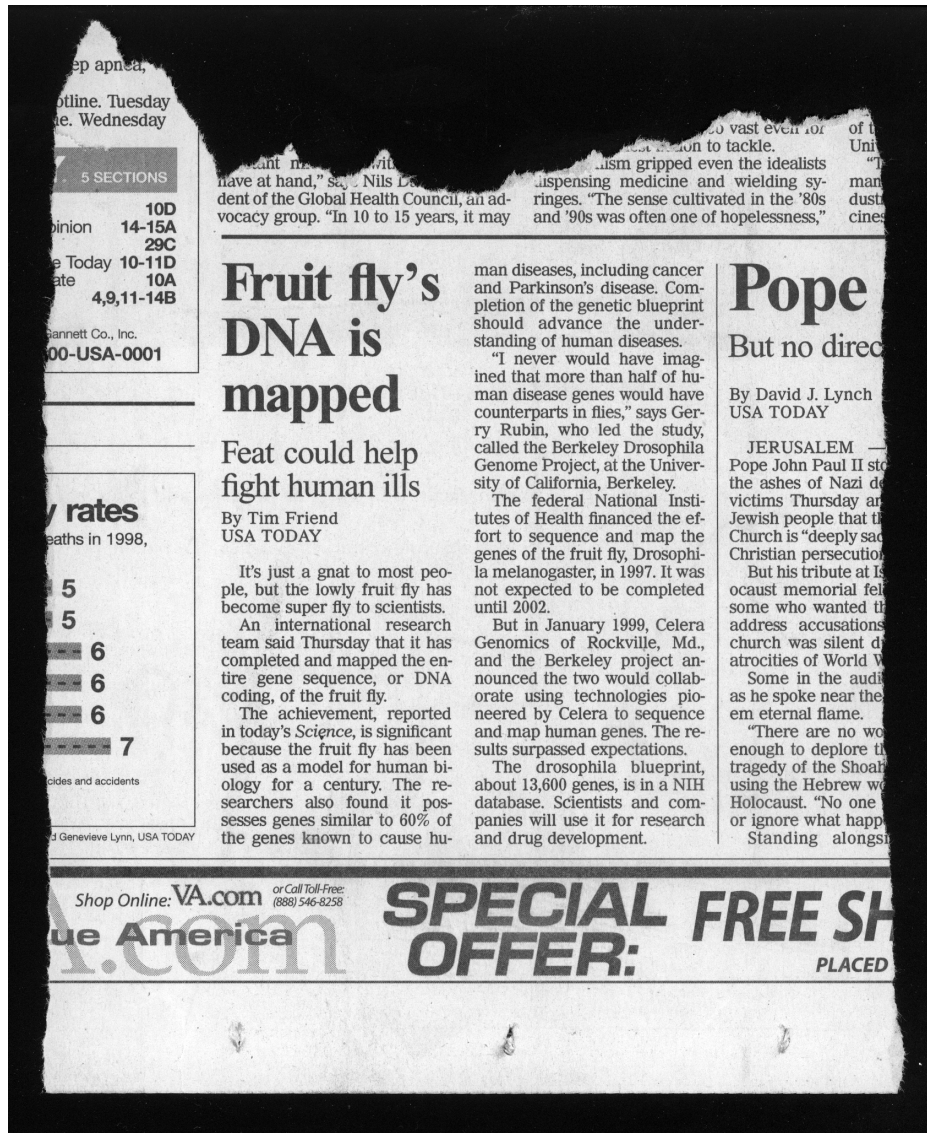


Abb. 49 Zeitungsausschnitt einer Tageszeitung aus Pittsburgh, Pennsylvania zur Zeit des 41st Annual Drosophila Research Conference. Das Genom von *Drosophila* umfasst nach Meinung von Celera ca. 13600 Gene.