

**Genetische und molekulare Analysen
zur Funktion von Alien/CSN2 und Rpn6 in *Drosophila*
weisen auf eine kooperative Beziehung zwischen Signalosom und Proteasom
hin**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Simone Lier
aus Bad Homburg v. d. H.

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 20.09.2002
angenommen.

Erstgutachter: HD Dr. Achim Paululat

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am 20.09.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Alien/CSN2 zeigt die Charakteristika eines Corepressors für Kernhormonrezeptoren und ist integraler Bestandteil des Signalosoms	3
2.2 Das Signalosom ist für die Entwicklung vielzelliger Organismen von essentieller Bedeutung	4
2.3 Das Signalosom besitzt Kinase- und Deneddylasefunktionen und partizipiert an einer Vielzahl von Signalwegen	6
2.3.1 Die Rolle der Kinasefunktion des Signalosoms bei der Regulation der Proteinstabilität	7
2.3.2 Die Rolle der Deneddylasefunktion des Signalosoms bei der Regulation der Proteinstabilität	9
2.4 Die PCI-Komplex-Familie	11
2.5 Der Deckelkomplex des 19S regulatorischen Partikels des Proteasoms	13
2.6 Physikalische Interaktionen innerhalb der PCI-Komplex-Familie implizieren funktionelle Kooperationen	14
2.7 Problemstellung	16
3. Material	17
3.1 Geräte	17
3.2 Chemikalien und Nährmedien	17
3.3 Radioisotope	18
3.4 Enzyme	18
3.5 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze	18
3.6 Antikörper und Seren	19
3.7 Stammhaltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	19
3.8 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterienstämmen	22
3.9 Stammhaltung und Kultivierung von Hefestämmen	23
3.10 Plasmide	23
3.11 Synthetische Oligonukleotide	24
3.12 cDNA-Bibliotheken	25
3.13 Auftragsarbeiten	25
4. Methoden	26
I. Präparation und Analyse von DNA	26
4.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	26
4.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	27
4.3 Herstellung elektrokompeter Bakterien	27
4.4 Transformation elektrokompeter Bakterien	27
4.5 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	28
4.5.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	28
4.5.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	28
4.6 Präparation genomischer DNA aus <i>Drosophila</i>	29
4.7 Plasmid-Rescue-Klonierung aus genomischer DNA von <i>Drosophila</i>	29
4.8 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	30
4.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen	30
4.10 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	31
4.11 Southern Blot-Analyse	31
4.11.1 Southern Blot durch nach unten gerichteten Kapillartransfer	31
4.11.2 Hybridisierung der Nylonmembran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	32
4.11.3 Entfernung radioaktiv markierter Sonden von einer hybridisierten Membran	32
II. Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren	33
4.12 Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	33
4.13 Dephosphorylierung von freien 5'-Enden	33
4.14 Ligation von DNA-Fragmenten	33
4.15 Markierung von RNA- und DNA-Molekülen	34
4.15.1 Nichtradioaktive Markierung von RNA-Sonden mittels <i>in vitro</i> -Transkription	34
4.15.2 Nichtradioaktive Markierung von DNA-Sonden mit Hilfe von Zufallsprimern	34

4.15.3	Spot-Test DIG-markierter DNA-Sonden	34
4.15.4	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit Hilfe von Zufallsprimern	35
4.15.5	Schleudersäule	35
4.16	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
4.17	<i>in vitro</i> -Transkription und Herstellung doppelsträngiger RNA	37
III. Präparation und Analyse von Proteinen		38
4.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	38
4.19	<i>in vitro</i> -Expression	39
4.20	Expression und Extraktion von GST-Fusionsproteinen	39
4.21	Affinitätsaufreinigung <i>in vitro</i> -exprimierter Proteine durch Bindung an GST-Fusionsproteine (GST-Pulldown-Assay)	40
IV. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in <i>S. cerevisiae</i>		42
4.22	Herstellung von Hefe-Nährmedien	42
4.23	Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen mittels Lithiumacetat	43
4.24	Durchmusterung von cDNA-Banken mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems (MATCHMAKER Two-Hybrid System 2, Clontech)	43
4.25	Ermittlung der Transformationseffizienz und Abschätzung der durchmusterter, unabhängigen Klone	45
4.26	Mini-Präparation von Hefe-Gesamt-DNA zur Gewinnung von Plasmid-DNA	46
4.27	Kolorimetrischer Nachweis der <i>lacZ</i> -Reportergenaktivität in Einzelkolonien auf festen Nährböden (X-Gal Agarose Overlay Assay)	47
4.28	Quantifizierung der <i>lacZ</i> -Reportergenaktivität in Flüssigkulturen	47
V. Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i> und histologische Methoden		49
4.29	P-Element Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i>	49
4.30	Hitzeschockbehandlung von <i>Drosophila</i> -Embryonen und -Larven	50
4.31	Selektion Neomycin-resistenter Fliegen	51
4.32	Antikörperfärbung an fixierten <i>Drosophila</i> -Embryonen	51
4.33	Histochemische X-Gal-Blaufärbung an larvalen und adulten Geweben	53
4.34	<i>in situ</i> -Hybridisierung an fixierten <i>Drosophila</i> -Embryonen, Larven und adulten Ovarien und Testes mit DIG-markierten RNA-Sonden	54
4.35	<i>in situ</i> -Hybridisierung an Polytänochrosomen	56
5. Ergebnisse		58
I. Funktionsanalyse des <i>alien/CSN2</i>-Gens <i>in vivo</i>		58
5.1	Das <i>alien/CSN2</i> -Gen wird in allen Entwicklungsstadien von <i>Drosophila</i> exprimiert	59
5.2	Genetische, cytologische und molekulare Charakterisierung <i>alien/CSN2</i> -defizienter Fliegenlinien	61
5.3	P-Element Remobilisation zur Mutagenisierung des <i>alien/CSN2</i> -Gens	66
5.4	Injektion doppelsträngiger RNA und Expression eines symmetrisch transkribierten Transgens zur Erzeugung von <i>alien/CSN2</i> -Phänokopien mittels RNA-Interferenz (RNAi)	70
5.4.1	Injektion doppelsträngiger <i>alien/CSN2</i> -RNA in <i>Drosophila</i> Embryonen	70
5.4.2	Expression eines symmetrisch transkribierten Transgens zur Erzeugung doppelsträngiger <i>alien/CSN2</i> -RNA <i>in vivo</i>	72
5.5	Die ektopische Expression des Alien/CSN2-Genprodukts in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben von <i>Drosophila</i> verursacht keine spezifischen Entwicklungsstörungen	77
II. Interaktionsanalyse des Alien/CSN2-Proteins <i>in vitro</i>		80
5.6	Das Durchmusteren einer embryonalen cDNA-Bibliothek liefert 92 potentielle Interaktionspartner für Alien/CSN2	80
5.7	Drei N-terminal verkürzte Varianten der Proteasom-RP-Untereinheit Rpn6 interagieren mit Alien/CSN2 in der Hefe 2-Hybrid Analyse	83
5.8	Die PCI-Domäne des Rpn6-Proteins trägt maßgeblich zur Interaktion mit Alien/CSN2 bei	86
5.9	<i>in vitro</i> -exprimiertes Rpn6 bzw. Rpn6 Δ PCI bindet an ein GST-Alien/CSN2- bzw. GST-Alien/CSN2 Δ PCI-Fusionsprotein	89

5.10	Die Hefe 2-Hybrid Analyse liefert keine Hinweise auf eine Interaktion von Alien/CSN2 mit α Ftz-F1, β Ftz-F1 oder <i>Drosophila</i> p53	90
	III. Molekulare und funktionelle Analyse der Proteasomuntereinheit Rpn6	93
5.11	Die 19S RP-Deckelkomplex-Untereinheit Rpn6 ist evolutionär hochkonserviert und ähnelt der Signalosom-Untereinheit Alien/CSN2	93
5.12	Das <i>Rpn6</i> -Expressionsmuster überlappt mit <i>alien/CSN2</i>	96
5.13	Das P-Element <i>l(2)k00103</i> inseriert im 5'-untranslatierten Bereich von <i>Rpn6</i>	98
5.14	Das Enhancertrapmuster des P{ <i>lacW</i> }-Elements <i>l(2)k00103</i> überlappt partiell mit dem <i>Rpn6</i> -Expressionsmuster	100
5.15	Die P-Element-Insertion <i>l(2)k00103</i> verursacht früh-larvale Letalität	102
5.16	Die <i>Rpn6</i> -spezifische P-Element-Insertion <i>l(2)k00103</i> ist ursächlich für den larval letalen Phänotyp der Linie BL 10465-H	103
5.17	Die letalen <i>Jump Out</i> -Linien 2F und 20F repräsentieren neue <i>Rpn6</i> -spezifische Mutationen und zeichnen sich durch unterschiedliche Allelstärken aus	105
5.17.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>Jump Out</i> -Allele <i>rpn6^{2F}</i> und <i>rpn6^{20F}</i>	105
5.17.2	Molekulargenetische Charakterisierung der <i>Jump Out</i> -Allele <i>rpn6^{2F}</i> und <i>rpn6^{20F}</i>	106
5.18	Die Analyse von somatischen <i>rpn6^{2F}</i> - und <i>rpn6^{20F}</i> -Mosaiken liefert Hinweise auf eine essentielle Funktion von Rpn6 in proliferierenden Geweben	109
5.18.1	Kopplung der <i>Rpn6</i> -Allele <i>rpn6^{2F}</i> und <i>rpn6^{20F}</i> mit FRT-Elementen durch meiotische Rekombination	109
5.18.2	Homozygot mutante <i>rpn6^{20F}</i> -Zellen proliferieren und differenzieren normal während homozygot mutante <i>rpn6^{2F}</i> -Zellen zugrunde gehen	111
5.19	Weder die ektopische Expression von Rpn6 noch die ektopische Koexpression von Rpn6 und Alien/CSN2 verursacht spezifische Entwicklungsstörungen	117
	6. Diskussion	118
6.1	Die Funktionsanalyse des <i>alien/CSN2</i> -Gens <i>in vivo</i> scheitert an der eingeschränkten reversen Genetik von <i>Drosophila</i>	119
6.1.1	Das <i>alien/CSN2</i> -Gen in <i>Drosophila</i> – ein <i>Cold Spot</i> ?	119
6.1.2	Die Problematik der RNAi-Methode	122
6.2	Allgemeine und spezielle Limitationen des Hefe 2-Hybrid Screens mit Alien/CSN2 als Köderprotein	125
6.3	Die physikalische Interaktion von Alien/CSN2 mit Rpn6 – ein Hinweis auf eine Kooperation von Signalosom und Proteasom?	129
6.4	Die Relevanz der PCI-Domänen für die physikalische Interaktion von Alien/CSN2 und Rpn6 bleibt fraglich	132
6.5	<i>Drosophila</i> Alien/CSN2 – nur Signalosomuntereinheit oder auch Corepressor?	135
6.6	Rpn6, eine Komponente des 19S regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms, ist essentiell für die Entwicklung von <i>Drosophila</i>	137
6.7	Ausblick	140
	7. Abkürzungen	141
	8. Literaturverzeichnis	142

1. Zusammenfassung

Die zelluläre Konzentration regulatorischer Proteine ist die Bilanz des antagonistischen Wechselspiels von Proteinsynthese und Proteinabbau. Die wichtigste Maschinerie des selektiven Proteinabbaus in der eukaryontischen Zelle ist das Ubiquitin-26S Proteasom-System, dessen Aktivität und Spezifität u. a. durch das Signalosom, einen multifunktionellen Proteinkomplex kontrolliert wird.

Die funktionelle Charakterisierung der Signalosom-Untereinheit Alien/CSN2 in *Drosophila* sollte die Kenntnisse zur entwicklungsbiologischen Relevanz des Signalosoms vertiefen und überdies zur Klärung der Frage beitragen, ob *Drosophila* Alien/CSN2 außerdem als Kernhormonrezeptor-spezifischer Corepressor agiert. Mit dem Ziel, den Funktionsverlust von Alien/CSN2 *in vivo* analysieren zu können, wurden verschiedene revers genetische Ansätze verfolgt. Einerseits wurde durch die Remobilisation genomisch integrierter P-Elemente versucht, den *alien/CSN2*-Locus durch die Insertion eines P-Element-Transposons zu mutagenisieren. Da auf diese Weise jedoch keine *alien/CSN2*-Mutante generiert werden konnte, wurde alternativ der Versuch unternommen, mit Hilfe der RNA-Interferenz-Methode die *alien/CSN2*-Genaktivität posttranskriptionell zu inhibieren. Allerdings konnte weder durch die Injektion doppelsträngiger RNA noch durch die Expression eines symmetrisch transkribierten Transgens ein effizientes Gensilencing erzielt werden, so daß keine *alien/CSN2*-spezifischen Phänokopien untersucht werden konnten.

Zur Aufklärung molekularer Wechselwirkungen des Alien/CSN2-Proteins wurde mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems nach Alien/CSN2-interagierenden Proteinen gesucht. Die Durchmusterung einer embryonalen cDNA-Bibliothek führte zur Identifizierung von Rpn6, einer Untereinheit des regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms. Die physikalische Interaktion von Alien/CSN2 und Rpn6, die sowohl im Hefe 2-Hybrid System als auch *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sowie die Kongruenz der *alien/CSN2*- und *Rpn6*-Expressionsmuster sind vielversprechende Indizien für eine mögliche Kooperation von Signalosom und Proteasom.

Durch die Charakterisierung einer *Rpn6*-spezifischen P-Element-Insertionsmutante konnte erstmalig die essentielle entwicklungsbiologische Relevanz des regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms in *Drosophila* demonstriert werden. Die Remobilisation des *Rpn6*-spezifischen P-Elements ermöglichte die Generierung weiterer *Rpn6*-Allele mit unterschiedlichen Allelstärken, von denen zwei, ein hypomorphes und ein Null-Allel, einer näheren genetischen Analyse unterzogen wurden. Die Untersuchung somatischer Klone, die durch FLP/FRT-induzierte mitotische Rekombination erzeugt wurden, zeigt, daß Rpn6 für das Überleben proliferierender Zellen unentbehrlich ist.

2. Einleitung

Im Zentrum der modernen Entwicklungsbiologie steht die Frage nach den genetischen und molekularen Prinzipien, die insbesondere für die Entwicklung multizellulärer Organismen von Bedeutung sind. Trotz der enormen Vielfalt multizellulärer Erscheinungsformen trägt bereits die Untersuchung einiger repräsentativer Modellorganismen, wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* oder Maus nachhaltig zum Verständnis ontogenetischer Prozesse bei. Die vergleichende Analyse so komplexer Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung, Morphogenese und Reproduktion gewährt zum einen Einblicke in die Vielseitigkeit der verschiedenen, arteigenen Entwicklungsmuster, ermöglicht aber zugleich auch die Charakterisierung hochkonservierter, universeller Mechanismen.

Der Ubiquitin-abhängige Abbau zellulärer Proteine stellt einen solchen, für Eukaryonten typischen Mechanismus dar. Neben der hinlänglich bekannten proteolytischen Funktion des Proteasoms zeichnet sich zunehmend eine regulatorische Funktion des Signalosoms innerhalb der Ubiquitinierungskaskade ab. Die derzeitigen Erkenntnisse zur Funktion des Signalosoms und des regulatorischen Partikels des Proteasoms beruhen in erster Linie auf Untersuchungen an *Arabidopsis*, Hefe oder Säugerzellen und entbehren bislang einer näheren Charakterisierung der entwicklungsbiologischen Relevanz dieser beiden Komplexe im tierischen Organismus. Die hier vorliegende Arbeit vermittelt Einblicke in die entwicklungsbiologischen Funktionen der Signalosom-Untereinheit Alien/CSN2 und der Proteasom-Untereinheit Rpn6 in *Drosophila* und trägt somit zum allgemeinen Verständnis dieser hochkonservierten Komplexe bei. Aus diesem Grund soll in den folgenden einleitenden Kapiteln u. a. ein Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand bezüglich der Struktur, Funktion und Wechselwirkung von Signalosom und Proteasom gegeben werden.

2.1 Alien/CSN2 zeigt die Charakteristika eines Corepressors für Kernhormonrezeptoren und ist integraler Bestandteil des Signalosoms

Alien/CSN2 trat erstmalig im Vertebratensystem als Thyroidhormonrezeptor (TR)-interagierendes Protein (TRIP15) in Erscheinung (Lee *et al.*, 1995) und wurde im folgenden sowohl als Kernhormonrezeptor-spezifischer Corepressor Alien als auch als Untereinheit CSN2 des Signalosom-Komplexes charakterisiert (Seeger *et al.*, 1998; Dressel *et al.*, 1999).

Während in Vertebraten zwei verschiedene *alien/CSN2*-Genloci, -Transkripte und auch Proteine, Alien α (40 kDa) und Alien β (52 kDa) nachweisbar sind (Tenbaum *et al.*, 2002), verfügt *Drosophila* über nur eine *alien/CSN2*-Genkopie, ein Transkript und auch nur ein Alien/CSN2-Protein einer molekularen Größe von etwa 52 kDa (Goubeaud *et al.*, 1996; Freilich *et al.*, 1999). Der Sequenzvergleich von *Drosophila* Alien/CSN2 mit den humanen Alien/CSN2-Varianten zeigt eine 90%ige Identität auf Aminosäureebene und dokumentiert so die ausgeprägte evolutionäre Konservierung von Alien/CSN2 (Dressel *et al.*, 1999).

Dressel *et al.* (1999) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, daß das im Vergleich zu Alien β C-terminal verkürzte Alien α -Protein als Corepressor mit Spezifität für einige Mitglieder der Superfamilie der Kernhormonrezeptoren agiert. Kernhormonrezeptoren sind Bestandteile des endokrinen Systems eines Organismus und bilden eine Klasse strukturell verwandter, DNA-bindender Proteine, deren Aufgabe darin besteht, das Signal kleinmolekularer, lipophiler Botenstoffe, wie z. B. Steroide, Retinoide, Thyroidhormone oder Vitamin D₃, zu empfangen, um es dann unmittelbar in eine genetische Antwort umzusetzen. Demnach werden sie auch als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren bezeichnet, obwohl für einige Mitglieder der Kernhormonrezeptor-Superfamilie, die sog. *orphan*-Rezeptoren (engl. Waise), bisher keine adäquaten Liganden identifiziert werden konnten (Übersicht in Owen & Zelent, 2000). Neben der hormonabhängigen Aktivierung von Zielgenen können einige Kernhormonrezeptoren, z. B. EcR, TR und der Retinsäurerezeptor (RAR), in Abwesenheit des entsprechenden Liganden außerdem als Repressoren wirken und auf diese Weise aktiv die Expression von Zielgenen inhibieren (Dobens *et al.*, 1991; Baniahmad *et al.*, 1992; Fondell *et al.*, 1993). Die genregulatorische Aktivität von Kernhormonrezeptoren wird überdies durch die Rekrutierung modulierender Cofaktoren beeinflusst. Derartige Coaktivatoren bzw. Corepressoren, die von sich aus nicht an DNA binden können, verstärken den transkriptionsaktivierenden bzw. -reprimierenden Effekt des Kernhormonrezeptors durch Wechselwirkung mit der basalen Transkriptionsmaschinerie und/oder durch Modifikation der lokalen Chromatinstruktur (Übersicht in Glass & Rosenfeld, 2000).

In einer Reihe von GST-Pulldown- und Coimmunopräzipitations-Experimenten konnte gezeigt werden, daß humanes Alien α mit diversen anderen Kernhormonrezeptoren, wie humanem COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) und DAX-1 (DSS, AHC, X-chromosomal protein 1), dem *Drosophila*-spezifischen Ecdysonrezeptor (EcR), Ftz-F1 (Fushi tarazu transcription factor 1) und SVP (Seven-up) physikalisch interagiert (Dressel *et al.*, 1999; Altincicek *et al.*, 2000). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Interaktion von Alien α mit dem Thyroidhormonrezeptor nur in Abwesenheit von Thyroidhormon stattfindet und daß Alien unter diesen Bedingungen die genreprimierende Funktion von TR signifikant verstärkt. Aufgrund der Beobachtungen, daß Alien zusätzlich mit SIN3A, einem mit Histondeacetylasekomplexen assoziierten Faktor, interagiert und daß in Anwesenheit eines Histondeacetylase-hemmenden Agens, die Repressionsaktivität von Alien inhibiert wird, wurde postuliert, daß die Alien-vermittelte Repression zumindest teilweise auf die Acetylierung von Histonen, also einen Chromatin-modifizierenden Mechanismus zurückzuführen ist (Dressel *et al.*, 1999).

Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde Alien/CSN2 in einem völlig anderen biologischen Zusammenhang entdeckt. Mit der Isolierung des sogenannten Signalosom-Komplexes aus humanen und auch aus Maus-Zellen stellte sich Alien β als integrale Komponente des multimeren Komplexes heraus (Seeger *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1998), und auch *Drosophila* Alien/CSN2 wurde schließlich als Untereinheit des *Drosophila* Signalosoms identifiziert (Freilich *et al.*, 1999). Aus diesem Grund sollen die mittlerweile vielfältigen Erkenntnisse zur Struktur und Funktionsweise des Signalosoms im folgenden näher betrachtet werden.

2.2 Das Signalosom ist für die Entwicklung vielzelliger Organismen von essentieller Bedeutung

Das Signalosom ist ein innerhalb der Eukaryonten hochkonservierter Multiproteinkomplex, der inzwischen aus Pflanzen, Säugern, *Drosophila* und der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* isoliert werden konnte. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* scheint allerdings nicht über einen Signalosom-Komplex zu verfügen, da mit Ausnahme der Untereinheit CSN5 keine homologen Gene für die übrigen Untereinheiten im Genom von *S. cerevisiae* identifiziert werden konnten (Aravind *et al.*, 2000). Der 450-500 kDa große Komplex setzt sich aus acht individuellen Untereinheiten zusammen, die *per definitionem* beginnend mit der größten Untereinheit gemäß ihrer apparenten Molekulargewichte als CSN1-8 bezeichnet werden (Deng *et al.*, 2000).

Das Signalosom wurde erstmalig in *Arabidopsis* identifiziert und aufgrund seiner Beteiligung an lichtabhängigen, photomorphogenetischen Prozessen als COP9-Komplex bzw. COP9-Signalosom bezeichnet (Wei *et al.*, 1994). Einige Untereinheiten des Signalosoms werden von Genen der sogenannten *cop/det/fus*-Klasse codiert, die bereits vor der Identifizierung des Signalosom-Komplexes im Zuge genetischer Screens zur Isolierung von *Arabidopsis*-Mutanten mit Störungen in der lichtregulierten Keimlingsentwicklung identifiziert worden waren (Übersicht in Schwechheimer & Deng, 2000).

Die Gruppe der *cop/det/fus*-Mutanten zeichnet sich durch die phänotypische Übereinstimmung der einzelnen Loci aus (*constitutive photomorphogenesis*, *de-etiolated*, *fusca*). Alle Mutanten dieser Klasse und somit auch die mittlerweile charakterisierten Signalosom-Mutanten *CSN1* (*fus6/cop11*), *CSN3* (*fus11*), *CSN4* (*cop8/fus4*) *CSN7* (*fus5*) und *CSN8* (*cop9/fus7*) zeigen in Dunkelheit statt der normalen, dunkeladaptierten Keimlingsentwicklung (Skotomorphogenese) photomorphogenetische Charakteristika, wie sie normalerweise nur in Anwesenheit von Licht ausgeprägt werden, und sterben schließlich im Keimlingsstadium (Chamovitz *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2001a; Wang *et al.*, 2002). Auch der partielle Funktionsverlust der Signalosom-Untereinheiten *CSN5* bzw. *CSN6*, der durch Cosuppressions-Experimente in transgenen Pflanzen induziert wurde, resultiert in konstitutiver Photomorphogenese und zeigt überdies eine Reihe weiterer Störungen z. B. während der Blütenentwicklung (Schwechheimer *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2001b).

Auch in *Drosophila* führt der Verlust der Signalosomaktivität zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen. *CSN4*- wie auch *CSN5*-Nullmutanten sterben als frühe Larven vor Erreichen des dritten Larvenstadiums (Suh *et al.*, 2002), während einige hypomorphe *CSN5*-Allele lediglich spät-larvale bis pupale Letalität bewirken (Freilich *et al.*, 1999). Mit Ausnahme eines Differenzierungs- und Migrationsdefektes Photorezeptor-spezifischer Neurone während der Augendifferenzierung von *Drosophila*, der in *CSN5*-Mosaiktieren beobachtet wurde (Suh *et al.*, 2002), wurden bislang keine weiteren distinkten Phänotypen beschrieben.

Im Gegensatz zu den offensichtlich essentiellen Funktionen des Signalosoms während der Entwicklung von *Arabidopsis* und *Drosophila* verursacht der Funktionsausfall des Signalosoms in *S. pombe* vergleichsweise schwache Effekte. Zwar ist der Zellzyklus und somit das Wachstum von *CSN1*- und *CSN2*-mutanten Zellen durch eine verlängerte S-Phase verzögert, und die Zellen nehmen eine ungewöhnlich gestreckte Gestalt an; trotzdem sind die *CSN1*- und *CSN2*-Mutanten lebensfähig (Mundt *et al.*, 1999). Darüber hinaus zeigen *CSN3*-, *CSN4*- und auch *CSN5*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keine phänotypischen Anomalien (Zhou *et al.*, 2001; Mundt *et al.*, 2002).

Die unter Laborbedingungen relativ entbehrliche Funktion des Signalosoms in *S. pombe* steht im krassen Widerspruch zu den fundamentalen, entwicklungsrelevanten Funktionen des Komplexes in *Arabidopsis* und *Drosophila*. Anscheinend sind in erster Linie multizelluläre Organismen auf einen funktionellen Signalosom-Komplex angewiesen. Die Pleiotropie der phänotypischen Effekte der Signalosom-Mutanten in *Arabidopsis* und *Drosophila* deutet überdies eine vielfältige Beteiligung des Signalosoms an verschiedenen entwicklungsrelevanten Prozessen an. Interessanterweise verläuft die Embryonalentwicklung der verschiedenen *CSN*-Mutanten sowohl in *Arabidopsis* als auch in *Drosophila* völlig ungehindert; die morphologischen Entwicklungsstörungen und schließlich die letalen Folgen manifestieren sich erst in späteren Entwicklungsstadien. Die Tatsache, daß alle bislang charakterisierten Mutanten der verschiedenen Untereinheiten die gleichen phänotypischen Effekte in *Arabidopsis* oder *Drosophila* hervorrufen, spricht eher für die Funktionalität des Signalosoms im Gesamtkomplex als für verschiedene, autonome Teilfunktionen einzelner Untereinheiten.

Die Frage, ob das Signalosom auch in anderen Metazoen, wie z. B. Vertebraten, eine tragende Rolle während der Entwicklung spielt, ist bislang ungeklärt. Aufgrund der spezifischen biochemischen Funktionen und der zahlreichen Protein-Wechselwirkungen des Signalosoms, die im nächsten Kapitel behandelt werden sollen, kann jedoch auch für höhere Tiere eine essentielle Funktion des Signalosoms postuliert werden.

2.3 Das Signalosom besitzt Kinase- und Deneddylasefunktionen und partizipiert an einer Vielzahl von Signalwegen

Die biochemische Analyse des Signalosoms erbrachte zahlreiche Hinweise, die auf eine Doppelfunktion des Komplexes hinweisen. Neben einer Funktion als Kinase konnte dem Signalosom außerdem eine Deneddylaseaktivität attestiert werden. Bei näherer Betrachtung der Konsequenzen Signalosom-abhängiger Phosphorylierung und Deneddylierung wird deutlich, daß das Signalosom unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation des Ubiquitin-abhängigen Abbaus zellulärer Proteine spielt (Übersicht in Seeger *et al.*, 2001; Bech-Otschir *et al.*, 2002). Durch die direkte und indirekte Regulation der Stabilität und somit der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren gewinnt das Signalosom Einfluß auf eine Vielzahl von Signalwegen. Die damit verbundene Multifunktionalität des Signalosoms soll daher im folgenden anhand einiger Beispiele verdeutlicht werden.

2.3.1 Die Rolle der Kinasefunktion des Signalosoms bei der Regulation der Proteinstabilität

Die Kinaseaktivität des Signalosom-Komplexes wurde an einer Reihe spezifischer Substrate, wie c-Jun, I κ B α und p105 (Seeger *et al.*, 1998), ICSBP (Cohen *et al.*, 2000) und p53 (Bech-Otschir *et al.*, 2001), gezeigt. Obwohl in keiner der acht Signalosomuntereinheiten eine typische Kinase-Domäne identifiziert werden kann, besitzt der aufgereinigte Komplex eine spezifische Ser/Thr-Kinaseaktivität. Bis heute ist allerdings unklar, ob die Kinaseaktivität von Signalosompräparationen aus humanen Blutzellen einer der Untereinheiten, dem Gesamtkomplex oder einer bislang unerkannten, assoziierten Kinase zuzuschreiben ist (Bech-Otschir *et al.*, 2002). Dennoch repräsentiert die Signalosom-assoziierte Kinaseaktivität einen neuartigen Kinasetyp. Verschiedene spezifische Kinase-Inhibitoren, u.a. auch für Ser/Thr-Kinasen, zeigen keine hemmende Wirkung auf die Signalosom-assoziierte Kinaseaktivität. Im Gegenzug wurde Cucurmin, ein Bestandteil des Currygewürzes, dem tumorsupprimierenden Eigenschaften zugeschrieben werden, als spezifischer Inhibitor der Signalosom-assoziierten Kinaseaktivität identifiziert (Henke *et al.*, 1999).

Die Signalosom-abhängige Stabilisierung von c-Jun

Eines der Zielproteine Signalosom-abhängiger Phosphorylierung ist der Transkriptionsfaktor c-Jun (Seeger *et al.*, 1998). In Form von Homo- oder Heterodimeren, z. B. mit c-Fos, bindet c-Jun an sog. AP-1 (activating protein 1) DNA-Sequenzen und aktiviert so die Expression verschiedener Zielgene. Die Aktivität von c-Jun hängt zum einen von seiner Proteinstabilität und zum anderen von posttranslationalen Modifikationen ab. Obwohl c-Jun in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert wird, bleibt die c-Jun-Proteinkonzentration niedrig, da ein konstanter Abbau von c-Jun über das Ubiquitin-Proteasom-System erfolgt. Erst infolge der Phosphorylierung spezifischer Serin-Aminosäurereste in der N-terminalen Aktivierungsdomäne von c-Jun wird das Protein stabilisiert und entgeht so der Ubiquitin-abhängigen Degradierung. Das erhöhte c-Jun-Proteinlevel ermöglicht dann die transkriptionelle Aktivierung AP-1-regulierter Gene (Treier *et al.*, 1994; Musti *et al.*, 1997).

Bis zur Identifizierung der Signalosom-abhängigen Phosphorylierung von c-Jun waren ausschließlich einige Mitglieder der MAP-Kinase-Familie als c-Jun-spezifische Kinasen, sog. JNKs (c-Jun N-terminal kinases), beschrieben worden. Das Signalosom bindet c-Jun durch eine direkte Wechselwirkung der Untereinheit CSN5, die bereits zuvor als JAB1 (Jun activation domain-binding protein 1) isoliert und als AP-1-Coaktivator charakterisiert worden war (Claret *et al.*, 1996). Vergleichbar den JNKs phosphoryliert das Signalosom c-Jun an den spezifischen

N-terminalen Aminosäureresten und bewirkt so eine Stabilisierung von c-Jun und dadurch wiederum die Aktivierung AP-1-regulierter Gene (Naumann *et al.*, 1999). Die Signalosom-abhängige Stabilisierung bzw. Aktivierung von c-Jun stellt somit einen alternativen, JNK-unabhängigen Mechanismus zur Aktivierung der AP-1-Transkription dar.

Die Signalosom-abhängige Destabilisierung von p53

Ein weiteres Substrat der Signalosom-assoziierten Kinase ist der Tumorsuppressor p53. Ähnlich wie c-Jun, so wird auch die zelluläre p53-Konzentration unter normalen Bedingungen durch den kontinuierlichen Abbau von p53 durch das Ubiquitin-Proteasom-System limitiert (Maki *et al.*, 1996). Erst infolge genotoxischer Stimuli, wie z. B. ionisierender Strahlung, akkumuliert p53 im Zellkern und aktiviert die Transkription Zellzyklus-hemmender und proapoptotischer Gene (Übersicht in Ryan *et al.*, 2001).

Neben einigen anderen Modifikationen ist auch der Phosphorylierungszustand von p53 entscheidend für die Stabilität bzw. Aktivität von p53. Das Signalosom interagiert durch die direkte Wechselwirkung der Untereinheit JAB1/CSN5 mit p53 und phosphoryliert p53 an spezifischen Positionen mit dem Effekt, daß p53 destabilisiert und dem Ubiquitin-abhängigen Abbau zugeführt wird. Die Inhibition der Signalosom-assoziierten Kinaseaktivität durch Cucurmin hingegen hat zur Folge, daß p53 akkumuliert und die Zellen schließlich apoptotisch zugrunde gehen (Bech-Otschir *et al.*, 2001).

Anhand der Beispiele von c-Jun und p53 wird deutlich, daß die Signalosom-abhängige Phosphorylierung die Stabilität verschiedener Substrate reguliert, deren Proteinkonzentration unter normalen Wachstumsbedingungen vom Ubiquitin-Proteasom-System gering gehalten wird. Dabei folgt die Wirkung der Signalosom-abhängigen Phosphorylierung allerdings keinem einheitlichen Schema, sondern kann je nach Substrat stabilisierend oder destabilisierend wirken. Ob auch die Signalosom-abhängige Phosphorylierung der anderen bislang charakterisierten Signalosom-Substrate I κ B α , p105 und ICSBP Auswirkungen auf ihre Proteinstabilität hat, ist unklar. Fest steht nur, daß ICSBP (interferon consensus sequence-binding protein) mit der Untereinheit CSN2 interagiert und infolge der Signalosom-spezifischen Phosphorylierung mit IRF-1, einem weiteren regulatorischen Transkriptionsfaktor interagieren und die Expression verschiedener Zielgene reprimieren kann (Cohen *et al.*, 2000).

Für den NF- κ B-Inhibitor I κ B α ist hinlänglich bekannt, daß er infolge spezifischer Phosphorylierungen vom Ubiquitin-Proteasom-System proteolytisch angegriffen wird (Chen *et al.*, 1996). Analysen zur Klärung der Frage, ob die Signalosom-spezifische Phosphorylierung

auch in diesem Fall eine stabilisierende oder destabilisierende Funktion erfüllt, stehen allerdings noch aus.

2.3.2 Die Rolle der Deneddylasefunktion des Signalosoms bei der Regulation der Proteinstabilität

Nedd8 ist ein hochkonserviertes, Ubiquitin-ähnliches Polypeptid, das genau wie Ubiquitin oder auch SUMO-1 im Zuge posttranslationaler Modifikation kovalent an spezifische Substrate geheftet wird. Der Prozess der Nedd8-Konjugation, die sog. Neddylierung, erfolgt durch eine Enzymkaskade, die dem Mechanismus der Ubiquitinylierung ähnelt (zur Übersicht Ciechanover, 1998; Yeh *et al.*, 2000). Die einzig bekannten Nedd8-Substrate sind die Mitglieder der Cullin-Proteinfamilie. Culline sind integrale Bestandteile der sog. SCF-Komplexe (SKP1/Cullin/E-box protein complex), die als E3-Ubiquitin-Ligasen funktionieren (zur Übersicht Deshaies, 1999). Die Nedd8-Modifikation der Cullin-Untereinheit stimuliert die Ubiquitin-Ligase-Aktivität der SCF-Komplexe (Osaka *et al.*, 2000; Read *et al.*, 2000).

Untersuchungen an *S. pombe* und *Arabidopsis* zeigen, daß das Signalosom für die Deneddylierung verschiedener SCF-Ligasen verantwortlich ist (Lyapina *et al.*, 2001; Schwechheimer *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002). Zwar konnten individuelle Interaktionen zwischen einzelnen Signalosom- und SCF-Untereinheiten charakterisiert werden, wie z. B. die spezifische Wechselwirkung von CSN2 und Cullin bzw. von CSN6 und HRT1, einer weiteren SCF-Untereinheit; trotzdem konnte wie auch schon hinsichtlich der Kinaseaktivität keiner der einzelnen Signalosom-Untereinheiten die Deneddylaseaktivität zugeschrieben werden. Da *S. pombe* Zellen mit verschiedenen CSN-Mutationen in gleicher Weise neddylierte Culline akkumulieren, wird spekuliert, daß der Gesamtkomplex als solcher als Deneddylase funktioniert (Zhou *et al.*, 2001; Mundt *et al.*, 2002).

in vitro-Untersuchungen zeigten, daß durch die Hemmung der Deneddylaseaktivität des Signalosoms die Ubiquitinylierung und somit auch der proteolytische Abbau von p27^{kip1}, einem Substrat der E3-Ligase SCF^{Skp2}, stimuliert wird (Yang *et al.*, 2002). Demzufolge ist das Signalosom durch seine deneddylierende, SCF-inhibierende Wirkungsweise indirekt an der Stabilisierung zellulärer Proteine beteiligt. Da die Substratspezifität der verschiedenen SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexe durch die Rekrutierung verschiedener F-Box-Proteine determiniert wird, kann spekuliert werden, daß das Signalosom durch die Modifikation der Cullin-Untereinheit, die allen SCF-Ligasen gemein ist, eine Vielzahl von Ubiquitin-Ligasen des SCF-Typs inhibiert und somit die Stabilität verschiedener SCF-Substrate reguliert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das Signalosom durch seine unterschiedlichen katalytischen Funktionen an mindestens zwei Stellen der Ubiquitylierungskaskade eingreift (Abb. 2.1). Zum einen wird das Schicksal verschiedener Proteine, wie z. B. von c-Jun oder p53, bereits auf dem Substratniveau direkt durch die Signalosom-spezifische Phosphorylierung determiniert. Zum anderen modifiziert das Signalosom durch seine Deneddylase-Funktion die Aktivität der E3-SCF-Ubiquitin-Ligasen und reguliert so auf indirekte Weise die Stabilität SCF-spezifischer Substrate.

Die Tatsache, daß das Signalosom zum einen durch direkte physikalische Interaktionen und außerdem durch seine biochemischen Qualitäten in verschiedene Teilprozesse der Ubiquitylierungskaskade involviert ist, führte zur Formulierung der Hypothese, der Signalosom-Komplex könne eine Gerüstfunktion übernehmen. Demnach würde das Signalosom als zentrale Stützstruktur die verschiedenen Enzyme, wie z. B. Kinasen, Deneddylasen und Ubiquitin-Ligasen zusammenbringen und ihre enzymatische Aktivität organisieren (Bechtolschir *et al.*, 2002). Diese Auffassung wird dadurch gestärkt, daß kürzlich ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Signalosom-Komplex und COP10, einem vermeintlich E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym, in *Arabidopsis* beschrieben wurde, wodurch ein weiterer Reaktionsschritt des Ubiquitin-Proteasom-Weges von der regulatorischen Funktion des Signalosoms abhängig sein könnte (Suzuki *et al.*, 2002).

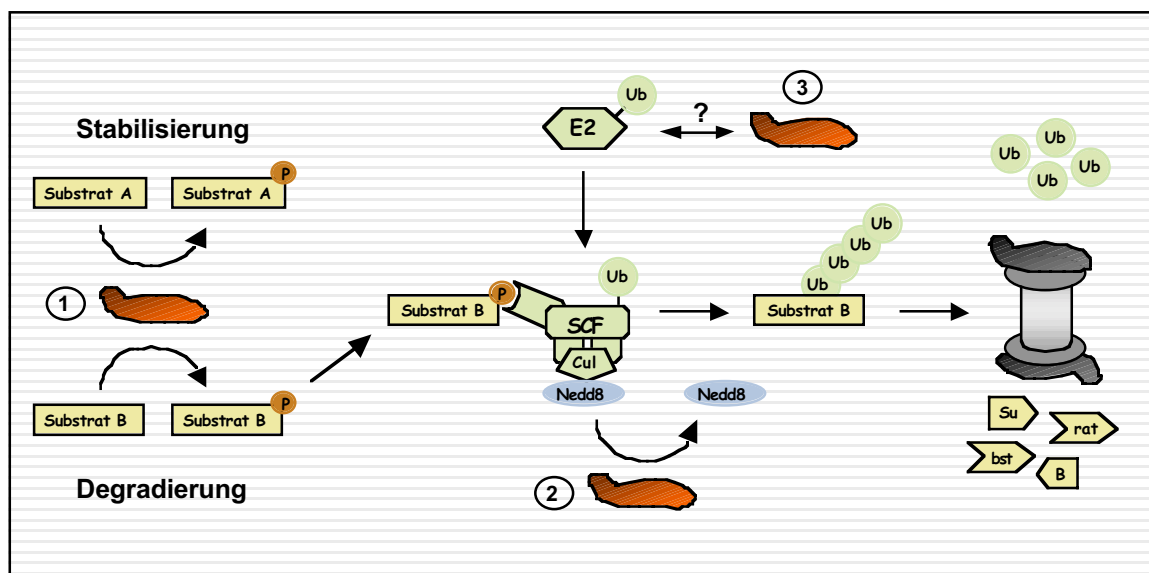


Abb. 2.1 Das Signalosom als multifunktionaler Regulator der Ubiquitylierungsmaschinerie.

Schematische Darstellung der Reaktionsschritte des Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Proteinabbaus, die durch das Signalosom reguliert werden; modifiziert nach Seeger *et al.*, 2001. Die Signalosom-spezifische Phosphorylierung (1) kann je nach Substrat stabilisierend (Substrat A) oder destabilisierend (Substrat B) wirken. Die Ubiquitylierung von Substraten, die für den Abbau vorgesehen sind, erfolgt u. a. durch E3-SCF-Ligasen. Die Aktivität der SCF-Komplexe wird durch die Signalosom-spezifische Deneddylierung der Cullin-Untereinheit gehemmt (2). Neueste Untersuchungen weisen auf eine Interaktion des Signalosoms mit E2-Ubiquitin-Carrier-Enzymen hin (3).

2.4 Die PCI-Komplex-Familie

Das Signalosom bildet zusammen mit dem Deckelkomplex des 19S regulatorischen Partikels (RP) des Proteasoms und dem eukaryotischen Translationsinitiationskomplex eIF3 die PCI-Komplex-Familie (proteasome/COP9 signalosome/eukaryotic translation initiation factor 3). Alle drei Komplexe sind mit Ausnahme von *S. cerevisiae* in Pflanzen, Tieren und *S. pombe* gleichermaßen konserviert (Wei & Deng, 1999). In *S. cerevisiae* fehlt der Signalosom-Komplex gänzlich und auch die Zusammensetzung des eIF3-Komplexes weicht von der in höheren Eukaryoten ab (Aravind *et al.*, 2000).

Die PCI-Komplex-Familie zeichnet sich sowohl durch die strukturelle Ähnlichkeit der Komplexe als auch durch die Sequenzhomologien der einzelnen Untereinheiten aus (Glickman *et al.*, 1998a). Während das Signalosom und der 19S RP-Deckelkomplex aus jeweils acht Untereinheiten bestehen, setzt sich eIF3 aus fünf Core-Untereinheiten und je nach Aufreinigungsprozedur aus fünf bis 11 akzessorischen Untereinheiten zusammen (Kim *et al.*, 2001).

Die Sequenzhomologien beruhen in erster Linie auf dem Vorkommen zweier Struktur motive, der MPN- und der PCI-Domäne (Aravind & Ponting, 1998; Hofmann & Bucher, 1998). Die MPN-Domäne (Mpr1/Pad1 N-terminal domain), die auch für andere Proteine, die nicht am Aufbau eines PCI-Komplexes beteiligt sind, bekannt ist, umfaßt ca. 140 Aminosäuren, ist typischerweise im N-terminalen Bereich lokalisiert und wird als α/β -Struktur interpretiert. Die PCI-Domäne hingegen findet sich exklusiv in PCI-Komplex-Untereinheiten. Sie besteht aus einer Folge von bis zu 200 C-terminalen Aminosäuren, für die eine α -helikale Struktur vorhergesagt wird. Für keine der beiden Domänen konnte bislang eine spezifische Aktivität festgestellt werden. Da aber beide Motive ausschließlich in Proteinen identifiziert wurden, die am Aufbau multimerer Komplexe beteiligt sind, wurde von Anbeginn vermutet, daß sie als Gerüststrukturen das Gesamtgefüge der Multiprotein-Komplexe stabilisieren könnten (Hofmann & Bucher, 1998; s. auch Kap. 2.6).

Jeweils zwei Untereinheiten des Signalosoms (CSN5 und CSN6) und des 19S RP-Deckelkomplexes (Rpn8 und Rpn11) verfügen über eine MPN-Domäne, während die übrigen sechs Untereinheiten beider Komplexe durch eine PCI-Domäne gekennzeichnet sind. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und Hefe 2-Hybrid-Interaktionsstudien zeigten, daß sowohl die intermolekularen Wechselwirkungen als auch die dreidimensionale Anordnung der Untereinheiten im Signalosom und 19S RP-Deckelkomplex, d.h. die Architektur der beiden Komplexe, einem gemeinsamen Muster folgt (Kapelari *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2001; Bech-

Otschir *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, daß der humane Signalosom-Komplex ursprünglich als hartnäckige Kontamination beobachtet wurde, die regelmäßig bei dem Versuch, Proteasom-Komponenten aufzureinigen, auftrat (Seeger *et al.*, 1998; Prof. W. Dubiel, persönliche Mitteilung). Diese Befunde gaben auch Anlass zu der Vermutung das Signalosom könne anstelle des 19S RP-Deckelkomplexes an der Bildung alternativer Proteasom-Komplexe beteiligt sein (Henke *et al.*, 1999; Wei & Deng; 1999; Schwachheimer & Deng, 2001). Für die Existenz derartiger Übergangsformen liegen jedoch keine fundierten Evidenzen vor.

Aufgrund der außerordentlichen Ähnlichkeit des Signalosoms und des 19S RP-Deckelkomplexes hinsichtlich Anzahl, Sequenzhomologie und Topologie der Untereinheiten wird allgemein angenommen, daß die beiden Komplexe und zum Teil auch eIF3 einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben und werden deshalb auch als Paraloge klassifiziert (Glickman *et al.*, 1998a; Schwachheimer & Deng, 2001).

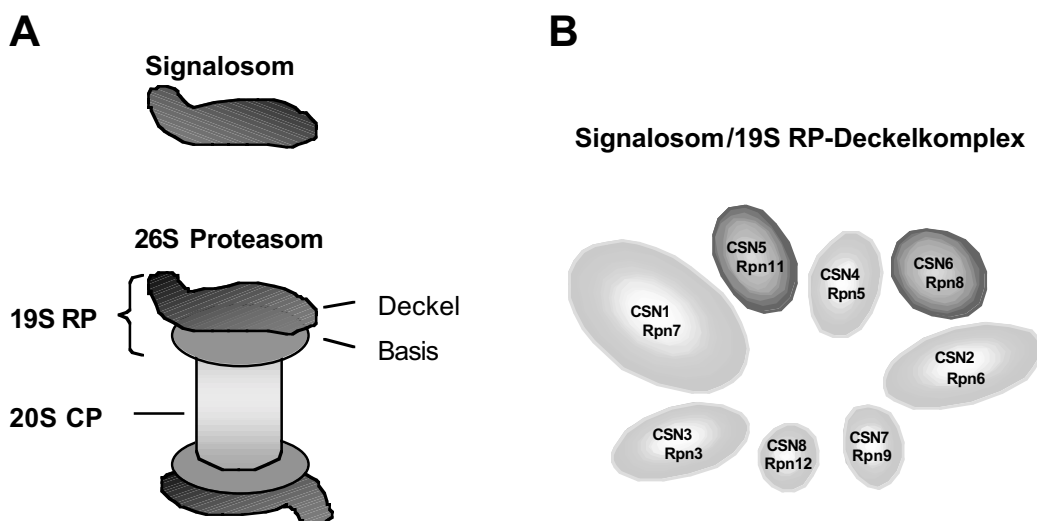


Abb. 2.2 Das Signalosom und der 19S RP-Deckelkomplex sind strukturell hochkonserviert.

(A) Schematische Darstellung des Signalosoms und des 19S RP-Deckelkomplexes als Subkomplex des 26S Proteasoms. (B) Das Signalosom und der 19S RP-Deckelkomplex setzen sich jeweils aus acht Untereinheiten zusammen, von denen je zwei durch eine MPN-Domäne (dunkelschattiert) und die übrigen sechs durch eine PCI-Domäne gekennzeichnet sind (hellschattiert). Jeder individuellen Komponente des Signalosoms (CSN) kann eine paraloge Untereinheit im 19S RP-Deckelkomplex (Rpn) zugeordnet werden. Die Untereinheiten der beiden Komplexe sind so angeordnet, daß eine zentrale Furche entsteht. Nähere Erläuterung s. Text. Abk.: RP, regulatorischer Partikel; CP, Core Partikel. Schemata modifiziert nach Wei & Deng, 1999 und Bech-Otschir *et al.*, 2002.

2.5 Der Deckelkomplex des 19S regulatorischen Partikels des Proteasoms

Das Proteasom ist eine multikatalytische, nicht lysosomale Protease, die am Ende einer Kaskade von enzymatischen Prozessen, dem Ubiquitin-Proteasom-Signalweg, den Abbau Ubiquitin-konjugierter Proteine verwirklicht (Baumeister *et al.*, 1997). Das 26S Proteasom ist eine labile Struktur, die in zwei Subkomplexe, den 20S Core Partikel (CP) und den 19S regulatorischen Partikel (RP), dissoziieren kann. Der katalytische 20S Core Partikel bildet eine röhrenförmige Struktur, die sich aus vier Ringen, zwei α - und zwei β -Ringen, die in einer $\alpha\beta\beta\alpha$ -Anordnung übereinander gestapelt sind, zusammensetzt. Jeder der Ringe besteht aus sieben individuellen Untereinheiten, α_{1-7} und β_{1-7} , die so arrangiert sind, daß die proteolytisch aktiven Stellen auf der Innenseite des zylindrischen Komplexes zum Liegen kommen.

Im funktionellen 26S Proteasom wird der 20S Komplex an beiden Enden von je einem 19S regulatorischen Partikel flankiert (Abb. 2.2). Die Aufgabe des 19S RP besteht in der Erkennung, Bindung und Deubiquitynylierung polyubiquitynylierter Substrate, die dann in denaturierter Form in das Lumen des 20S CP transloziert werden, wo sie schließlich proteolytisch gespalten werden. Der 19S RP-Deckelkomplex wurde inzwischen aus einer Reihe eukaryotischer Organismen, wie Säugern (Dubiel *et al.*, 1995), *S. cerevisiae* (Glickman *et al.*, 1998a), *Drosophila* (Haracska & Udvardy, 1996) und kürzlich auch *Arabidopsis* (Peng *et al.*, 2001c) isoliert. Er besteht aus insgesamt 17-18 Untereinheiten, die sich in zwei Subkomplexen assemblieren, dem distalen Deckelkomplex (*lid*) und dem proximalen Basalkomplex (*base*). Der Basalkomplex, der den Kontakt zum 20S CP herstellt, umfaßt sechs AAA-ATPasen, Rpt1-6 (Regulatory particle triple-A ATPase subunit), und die beiden größten nicht-ATPase Untereinheiten Rpn1 und Rpn2 (Regulatory particle non-ATPase subunit). Rpn10, eine Untereinheit, die ebenfalls dem Basalkomplex zugeordnet wird, stellt die Verbindung zum distalen Deckelkomplex her, dem die acht nicht-ATPase Untereinheiten Rpn3, Rpn5-9 und Rpn11-12 angehören (Finley *et al.*, 1998).

Die proteolytische Aktivität des Proteasoms ist für die Zelle und somit auch für den Gesamtorganismus von essentieller Bedeutung. Neben der Eliminierung fehlerhafter Proteine, deren Akkumulation toxisch wirken könnte, realisiert das Proteasom auch den Abbau diverser regulatorischer Proteine, wie z. B. von Tumorsuppressoren, Protoonkogenen und anderen Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität maßgeblich von ihrer Proteinstabilität bzw. -konzentration in der Zelle abhängt. Aufgrund der Vielzahl von Substraten partizipiert das Proteasom an so fundamentalen Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus, der Zellteilung und intrazellulärer Signalkaskaden, Stressantworten, DNA-Reparaturmechanismen und der Prozessierung antigener Peptide (zur Übersicht Ciechanover, 1998).

Genetische Analysen in *S. cerevisiae* zeigen, daß der Verlust der Proteasomfunktion und auch der Verlust einzelner Untereinheiten des Deckel- oder Basalkomplexes mit schwerwiegenden, phänotypischen Folgen verbunden ist. Nullmutationen der Basalkomplex-spezifischen ATPase-Untereinheiten *Rpt1-6* sind letal, genau wie Mutationen, die die Deckelkomplex-spezifischen Untereinheiten *Rpn5* und *Rpn6* betreffen (Saito *et al.*, 1997; Rubin *et al.*, 1998). Mutationen in der Polyubiquitin-bindenden Untereinheit *Rpn10* sind hingegen vermutlich aufgrund redundanter Aktivitäten vital (van Nocker *et al.*, 1996).

Die Charakterisierung von Proteasom-spezifischen Mutanten in vielzelligen Organismen ist weit weniger vorangeschritten. In *Drosophila* wurden bisher lediglich zwei Untereinheiten des 20S Core-Komplexes, $\beta 2$ und $\beta 6$ genetisch analysiert (Saville & Belote, 1993; Smyth & Belote, 1999). Nullmutanten beider Untereinheiten überleben die Embryonalphase und gehen während des ersten Larvalstadiums ohne nennenswerte morphologische Störungen zugrunde. Die Analyse verschiedener antimorpher, temperatursensitiver Allele der beiden Loci zeigte dominant-negative Effekte, wie pupale Letalität, Entwicklungsstörungen abdominaler Strukturen, Sterilität sowie Störungen bei der Determination von Zellschicksalen während der Entwicklung mechanosensorischer Sinnesborsten (Schweisguth, 1999). Die pleiotropen Phänotypen veranschaulichen nachhaltig die funktionelle Mitwirkung des katalytischen 20S Core-Komplexes an etlichen entwicklungsrelevanten Prozessen. Die funktionelle Charakterisierung von Komponenten des 19S RP-Komplexes beschränkt sich auf neueste Untersuchungen in *Drosophila* S2 Schneider-Zellen. Der RNAi-induzierte Funktionsverlust verschiedener Basalkomplex-spezifischer Untereinheiten und der Deckelkomplex-spezifischen Untereinheit *Rpn12* resultiert in einer Verlangsamung der Zellteilungsrate und einer Akkumulation polyubiquitinylierter Proteine, gefolgt von einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate (Wójcik & DeMartino, 2002). Zur entwicklungsbiologischen Relevanz des 19S RP-Komplexes liegen jedoch keine genetischen Untersuchungen vor.

2.6 Physikalische Interaktionen innerhalb der PCI-Komplex-Familie implizieren funktionelle Kooperationen

Die PCI-Komplex-Familie scheint außer durch ihren gemeinsamen evolutionären Ursprung zusätzlich auch durch funktionelle Beziehungen miteinander verbunden zu sein. So konnte in *Arabidopsis* eine direkte, physikalische Interaktion des Signalosoms mit Untereinheiten des Translationsinitiationskomplexes eIF3 nachgewiesen werden (Karniol *et al.*, 1998; Yahalom *et al.*, 2001). Ob das Signalosom dadurch möglicherweise auch an der Regulation der Translation spezifischer mRNAs beteiligt ist, ist allerdings unklar.

Bemerkenswerterweise wird auch von Interaktionen des Signalosom-Komplexes mit Komponenten des 19S RP-Deckelkomplexes berichtet. Yahalom *et al.* (2001) erwähnen die Copräzipitation der Deckelkomplex-spezifischen Untereinheit Rpn7 mit dem Signalosom-Komplex, zeigen aber keine experimentellen Daten. Darüber hinaus wird mit der physikalischen Interaktion von AtRpn6 und AtCSN1 im Hefe 2-Hybrid System ein weiterer Hinweis auf einen unmittelbaren Kontakt von Signalosom und 19S RP-Deckelkomplex geliefert (Kwok *et al.*, 1999). Obwohl auch diese Art der Wechselbeziehung im Hinblick auf ihre funktionelle Relevanz noch unverstanden ist, lieferte die weiterführende Untersuchung der CSN1-Rpn6-Interaktion erstmalig Hinweise auf die Funktionalität der PCI-Domäne. Die Analyse von Deletionskonstrukten zeigte, daß die PCI-Domäne von CSN1 für die spezifische Wechselwirkung mit Rpn6 verantwortlich ist. In einer Reihe anderer Arbeiten konnte die Funktion der PCI-Domäne als Interaktionsmotiv verifiziert werden. Insbesondere die vielverzweigten Interaktionen der einzelnen Untereinheiten innerhalb des Signalosoms bzw. des 19S RP-Deckelkomplexes, die letztendlich die Integrität der PCI-Komplexe ausmachen, sind auf die PCI-Domänen zurückzuführen (Freilich *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001; Tsuge *et al.*, 2001).

2.7 Problemstellung

Das vorrangige Ziel der hier vorliegenden Arbeit bestand in der Aufklärung der entwicklungsbiologischen Relevanz der Signalosomuntereinheit Alien/CSN2 in *Drosophila*. Die Charakterisierung einer *alien/CSN2*-spezifischen Mutante sollte Aufschlüsse über die Funktion von Alien/CSN2 *in vivo* liefern und somit zur Klärung der Frage beitragen, ob Alien/CSN2 in *Drosophila* neben seiner Funktion als integrale Komponente des Signalosom-Komplexes möglicherweise auch als Corepressor für Kernhormonrezeptoren fungiert. Neben der Über- und Fehlexpression von Alien/CSN2 in transgenen Fliegen wurde durch lokale P-Element-Transposition versucht, das *alien/CSN2*-Gen in einem revers genetischen Ansatz zu mutagenisieren. Parallel wurden verschiedene RNA Interferenz-Strategien erprobt, die der Erzeugung von *alien/CSN2*-Phänokopien dienen sollten.

Eine weiteres Ziel bestand in der Isolierung und Charakterisierung Alien/CSN2-interagierender Proteine. Der Einsatz des Hefe 2-Hybrid Systems sollte zur Identifizierung neuer Interaktionspartner und somit zur Aufklärung molekularer Wechselwirkung des Alien/CSN2-Proteins beitragen. Mit der Identifizierung der 19S RP-Deckelkomplex-spezifischen Untereinheit Rpn6 als spezifischem Interaktionspartner erwuchs die Frage nach der Funktion von Rpn6 während der Entwicklung von *Drosophila*. Ausgehend von einer P-Element-Insertion im *Rpn6*-Gen wurden mit Hilfe genetischer Methoden neue *Rpn6*-Allele generiert und zum Teil in Form von genetischen Mosaiken einer phänotypischen Analyse unterzogen.

3. Material

3.1 Geräte

Digitalkamera	Polaroid
Elektrophoreseapparaturen	Werkstatt, Universität Marburg
Elektropulsgerät	Easyject Basic, Equibio
Fotomikroskop	Axiophot, Zeiss
Geltrockner	Biometra
Kapillarziehgerät	Vertical Pipette Puller 720, Kopf
Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R
Mikroinjektionsapparatur	5242 Hermle ZK 401, Eppendorf
Mikromanipulator	Leitz
Photometer	Ultrospec, Pharmacia
PCR-Maschine	Personal Cyclor, Biometra
Stereomikroskop	Stemi SV 6, Zeiss
Tischzentrifuge	Biofuge 13, Heraeus
Ultraschallwasserbad	Sonorex TK 52, Bandelin
UV-Transilluminator	Spektroline TS-302
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene
Videokamera und -printer	Biotech-Fischer

3.2 Chemikalien und Nährmedien

Die verwendeten Chemikalien und Nährmedien wurden von folgenden Firmen bezogen:
 Becton & Dickinson (Heidelberg), Fluka (Taufkirchen), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen).

3.3 Radioisotope

α - ³² P-dATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
³⁵ S-Methionin (1000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig

3.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Complete Mini, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
DNase I, RNase-frei	Roche, Mannheim
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Roche, Mannheim
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
RNAsin (RNase-Inhibitor)	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden Sigma, Taufkirchen
T3 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

3.5 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze

Benchmark Prestained Protein Ladder	Gibco, Karlsruhe
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Jetstar Plasmid Kit 2.0	GENOMED, Bad Oeynhausen
Mass Ruler DNA-Ladder, Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Prime it II, Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Heidelberg

TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Heidelberg
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain Elite ABC Standard Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Zero Blunt PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.6 Antikörper und Seren

anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche, Mannheim
anti-Digoxigenin-POD, Fab-Fragmente	Roche, Mannheim
anti- β -Galaktosidase-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen)	Biotrend, Köln
anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ziegenerum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Pferdeserum	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.7 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

a) Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Im folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fliegenstämme aufgelistet.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird jeder Stamm mit einer Kurzbezeichnung bzw. einem Trivialnamen benannt. Die mit dem Präfix BL und einer Stocknummer gekennzeichneten Stämme wurden vom *Bloomington Drosophila Stock Center* (Indiana University, Bloomington, Indiana, USA) bezogen. Weitere Informationen zu den entsprechenden Stämmen sind erhältlich unter www.flystocks.bio.indiana.edu. Die Beschreibung der Genotypen folgt der Nomenklatur nach Lindsley und Zimm (1992).

Balancerstämme

w*; If/CyO

w*; $Kr^{Jf-1}/CyO_{hg-lacZ}$

Balancerstamm mit Markern für Chr. II,
zur Verfügung gestellt von M. Affolter, Basel

CSTM

w*; $CyO/Sp; Sb/Ubx$

Multimarkerstamm zur kreuzungsgenetischen Lokalisation inserierter P-
Elemente,
zur Verfügung gestellt von A. Holz, Marburg

- BL 4533** w^* ; $In(2LR)noc^{4L}Sco^{rv9R}, b^1/CyO, P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR1$
 Markerstamm für Chr. II mit GFP-exprimierendem *CyO*-Balancer-
 chromosom,
 Donor: J.M. Reichhart
- f11** $wg^{Sp-1}/CyO; ry^{506} Sb^1 P\{ry^{+17.2}=Delta2-3\}99B/TM6, Ubx$
 Multimarkerstamm mit Transposase-codierendem Transgen auf Chr. III
 zur Remobilisation von P-Elementen, Robertson *et al.* (1988),
 zur Verfügung gestellt von der W. Janning, Münster

Defizienzen

- BL 2892** $Df(2L)N22-14/CyO$
 Bruchpunkte: 29C01-02; 30C08-09, 30D01-02; 31A01-02,
 Donor: M. Ashburner
- BL 384** w^* ; $Df(2L)N22-5/CyO$
 Bruchpunkte: 29D01-02; 30C04-D01,
 Donor: T. Schüpbach
- BL 3702** $w^{1118}; Df(2L)30A-C/CyO$
 Bruchpunkte: 30A03-05; 30C05,
 Donor: T. Lavery
- BL 368** w^* ; $Df(2L)N22-3/CyO$
 Bruchpunkte: 30A01-02; 30D01-02,
 Donor: T. Schüpbach
- BL 3354** $Df(3R)roe/TM3, Ser^1$
 Bruchpunkte: 84A06-B01; 84D04-D09,
 Donor: C. Nüsslein-Volhard

P-Element-Insertionen, Mutanten

- BL 12042** $w^{1118}; P\{w^{+mC}=lacW\}l(2)s2978s2978/CyO$
(P2042) $P\{lacW\}$ -Insertion im *rolling stone*-Locus bei 29F08-30A01,
 Donor: M. Scott
- EP 2569** $w^{1118}; P\{w^{+mC}TrlBR^{cRA}UAS^{14xcRb}=EP\}(2)2569$
 $P\{EP\}$ -Insertion im *rolling stone*-Locus,
 Rorth *et al.* (1998), Liao *et al.* (2000)
- BL 10465** $y^1 w^{67c23}; P\{w^{+mC}=lacW\}Rpn6^{k00103}/CyO$
 $P\{lacW\}$ -Insertion im *Rpn6*-Locus bei 51C01-02,
 Donor: I. Kiss, BDGP
- BL 4096** $numb^1/CyO$
 $numb$ -Allel, Uemura *et al.*, 1989

UAS- und GAL4-Stämme

- BL 1795** w^* ; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}30A/CyO$
 Enhancer Trap-GAL4-Treiber auf Chr. II,
 Expression in Imaginalscheiben,
 Donor: A. Brand

- BL 1967** $y^1 w^*$; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}34B$
 Enhancer Trap-GAL4-Treiber auf Chr. II, Expression in embryonalen Speicheldrüsen und in larvalen Imaginalscheiben,
 Donor: A. Brand
- BL 1878** w^* ; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}T80/CyO$
 Enhancer Trap-GAL4-Treiber auf Chr. II,
 Expression in larvalen Imaginalscheiben, Speicheldrüsen und CNS,
 Donor: N. Perrimon
- BL 1774** w^* ; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}69B$
 Enhancer Trap-GAL4-Treiber auf Chr. III,
 Expression in der embryonalen Epidermis und in larvalen Imaginalscheiben, Speicheldrüsen und CNS,
 Donor: A. Brand
- BL 1782** w^* ; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}32B$
 Enhancer Trap-GAL4-Treiber auf Chr. III,
 Expression in larvalen Imaginalscheiben, Speicheldrüsen und CNS,
 Donor: A. Brand
- BL 1799** w^* ; $P\{w^{+mC}=GAL4-Hsp70.PB\}-89-2-1$
 Hitzeschock-induzierbares GAL4-Transgen auf Chr. III,
 Donor: A. Brand
- BL 5460 (daGAL4)** w^* ; $P\{w^{+mW.hs}=GAL4-da.G32\}UHI$
 GAL4-Treiber im *daughterless*-Muster auf Chr. III,
 Donor: E. Knust
- nos GAL4** w^{1118} ; $P\{w^{+mC}=GAL4::VP16-nos-UTR\}MVD1$
 GAL4-Treiber im *nanos*-Muster auf Chr. III
 Donor: R. Lehmann
- SG24** GAL4-Treiber im *twist*-Muster,
 zur Verfügung gestellt von A. Michelson, Boston
- Sgs 58 AB** GAL4-Treiber-Linie, die unter der Kontrolle der *Sgs4*-regulatorischen Elemente steht,
 zur Verfügung gestellt von A. Hofmann, Berlin

FLP- und FRT-Stämme

- BL 1929** $y^1 w^*$; $P\{ry^{+17.2}=hsFLP\}12$; noc^{Sco}/CyO
 X-chromosomal codierte Flip-Rekombinase,
 Donor: N. Perrimon
- BL 2120** w^{1118} ; $P\{ry^{+17.2}=neoFRT\}42D$ $P\{w^{+mC}=piM\}45F$
 FRT-Element an Position 42D zur Kopplung distaler Mutationen (2R),
 Donor: G. Rubin

Sonstige

- Oregon R** Wildtypstamm, Laborzucht der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl, Marburg
- white** w^1
 Transformationsstamm, Laborzucht der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl, Marburg

b) Fliegenhaltung und Zucht

Maismehl	60 % (w/v) Maismehl
	7,15 % (w/v) Fructose
	1,2 % (w/v) Trockenhefe
	0,14 % (w/v) Nipagin
	0,6 % (w/v) Propionsäure
	0,7 % (w/v) Agar

Die Aufzucht der Fliegen erfolgte in Kunststoffröhrchen verschiedener Größe, die etwa viertels mit Maismehl gefüllt waren und mit einem Ceaprenstopfen verschlossen wurden. Zur Fütterung der Tiere wurde zusätzlich eine Prise gekörnte Trockenhefe auf den Agar gegeben. Die Haltung der Fliegenstämme erfolgte in Klimakammern bei 18 bzw. 25 °C. Zur experimentellen Handhabung wurden die Tiere kurz mit Diethylether narkotisiert.

3.8 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterienstämmen

a) Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Stämme verwendet:

BL 21	<i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i>
DH5α	<i>supE44</i> , $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>
XL-1 Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac^-</i> , F' [pro AB <i>lacI^q</i> , <i>lacZ \Delta M15</i> , <i>Tn10(tet^R)</i>]

Während der Stamm BL21 für die heterologe Expression von GST-Fusionsproteinen eingesetzt wurde, wurden die Stämme DH5 α und XL-1 Blue für die Transformation mit rekombinanten Plasmiden verwendet. Der Stamm SURE wurde für die Transformation mit Konstrukten verwendet, die durch komplizierte Sekundärstrukturen in den herkömmlichen Transformationsstämmen nicht klonierbar waren.

b) Kultivierung und Stammhaltung

LB-Medium (Luria-Bertani)	1 % (w/v) Bactotrypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	85,5 mM NaCl

Für die Anzucht der Bakterien in Flüssigkulturen wurde LB-Medium verwendet. Kurzfristige Stammhaltungen erfolgten auf festen Agarnährböden (LB-Medium/1,5 % (w/v) Agar), die nach der Anzucht bei 37 °C schließlich für einige Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden konnten. Zur

langfristigen Stammhaltung wurde eine frische Flüssigkultur mit 15 % sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

3.9 Stammhaltung und Kultivierung von Hefestämmen

a) Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Stämme verwendet:

CG-1945	<i>MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA::GAL4_{17mers(×3)}-CyC1_{TATA}-lacZ</i>
SFY526	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, can^r, gal4-542, gal80-538, URA::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>

Während der Stamm CG-1945 (Reporter: *HIS3, lacZ*) zum Durchmustern einer cDNA-Bibliothek verwendet wurde, wurden der Stamme SFY526 (Reporter: *lacZ*) für die Quantifizierung der Interaktion zweier Proteine eingesetzt.

b) Kultivierung und Stammhaltung

YEPP-Medium	5 % (w/v) YEPP Broth (Gibco)
	2 % (w/v) Glucose

Für die Anzucht der Hefen in Flüssigkulturen wurde YEPP-Medium verwendet. Kurzfristige Stammhaltungen erfolgten auf festen Agarnährböden (YEPP-Medium/2 % (w/v) Agar), die nach der Anzucht bei 30 °C schließlich für einige Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden konnten. Zur langfristigen Stammhaltung wurde eine frische Flüssigkultur mit 50 % sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

3.10 Plasmide

pBluescript IKS+	Klonierungsvektor, Stratagene, Heidelberg
pBluescript IISK+	Klonierungsvektor, Stratagene, Heidelberg
pGEX-1	Expressionsvektor zur Expression von GST-Fusionsproteinen, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pAS2-1	Schaukelvektor mit multipler Klonierungstelle, der sich sowohl in <i>E. coli</i> als auch in <i>S. cerevisiae</i> repliziert und die Expression von GAL4-DBD-Fusionsproteinen in Hefe erlaubt ("Köderplasmid"); <i>GAL4₍₁₋₁₄₇₎</i> DBD, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i> , <i>CYH^s2</i> , CLONTECH

pACT2	Schaukelvektor mit multipler Klonierungstelle, der sich sowohl in <i>E. coli</i> als auch in <i>S. cerevisiae</i> repliziert und die Expression von GAL4-AD-Fusionsproteinen in Hefe erlaubt ("Beuteplasmid"); <i>GALA</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, <i>Leu2</i> , amp ^r , CLONTECH
pCR II-TOPO	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pCR-Blunt	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pCR-Blunt II-TOPO	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pUAST	Brand & Perrimon, 1993
Klon 327	vollständige <i>CSN2/alien</i> -cDNA (1,4 kb) in pBS KS+ (<i>EcoRI</i>), Lier, 1998
pBc TTF 1	vollständige <i>don juan</i> -cDNA (0,92 kb) in pBS KS+ (<i>EcoRI</i>), Winhauer, 1995
pBS-hGFP-S65T	GFP-cDNA (ca. 0,7 kb) in pBS KS+ (<i>HindIII/XbaI</i>), Kremser, 1998
LD18931	embryonale <i>Rpn6</i> -cDNA (1816 bp) in pBS SK+ (<i>XhoI</i>), GenBank Nr. AF160939, Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project, Research Genetics, Huntsville, USA
pACT2-αFtz-F1	vollständige α Ftz-F1-cDNA in pACT2 zur Expression eines GAL4-AD-Fusionsproteins in Hefezellen, zur Verfügung gestellt von L. Pick, New York
pACT2-βFtz-F1	vollständige β Ftz-F1-cDNA in pACT2 zur Expression eines GAL4-AD-Fusionsproteins in Hefezellen, zur Verfügung gestellt von L. Pick, New York
pRc/CMV-Dmp53	vollständige <i>Dmp53</i> -cDNA in pRc/CMV (Ollmann <i>et al.</i> , 2000), zur Verfügung gestellt von A. Baniahmad, Giessen
pπ25.7wc	Helferplasmid für die P-Element-Transformation, das die codierende Sequenz für die P-Element-Transposase enthält (Karess & Rubin, 1984)

3.11 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden als Initiatoren (Primer) für die sequenzspezifische DNA-Synthese in PCR-Versuchen oder in Sequenzierungsreaktionen eingesetzt. Sie wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Artifiziiell eingeführte Restriktionsschnittstellen sind fett hervorgehoben.

alien3'art.HindIII	5' CGAATCCA AGCT TTTTTCTGGACCACAGCGAACTG 3'
3'art.EcoRI	5' GTGTCATCTAGA AATTC GCAG 3'
5'art.BglII	5' GTGCTCAG ATCT GGAAAATG 3'

Del.PCI-alien	5' GTTCACGTATAAACTGATCG 3'
Del.PCI-Rpn6	5' CAAATGCGCCTGCACAATCAC 3'
M13Fw(-20)	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13Fw(-40)	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
M13Rev	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
3'p53art.XhoI	5' GTC ACTCGAGG TCATGGCAGCTC 3'
5'p53Del.ATG	5' TGTATATATCACAGCCAATGTCTG 3'
pACT2-3'-AD	5' GTGCACGATGCACAGTTGAAG 3'
pACT2-5'-AD	5' GATGATGAAGATACCCAC 3'
pAS2.1-5'-MCS	5' CATCGGAAGAGAGTAGTAAC 3'
Plac1	5' CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT 3'
Plw3-1	5' TGTCGGCGTCATCAACTCC 3'
Pry2	5' CTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATT 3'
pUAST-MCS-UAS	5' GATCCTCTAGAGGTACCCTC 3'
pUAST-UAS-blunt	5' GCATGCCTGCAGGTCGGAG 3'
Rpn6Del.ATG+EcoRI	5' CAAGA ATT CTGGCCGGAGCAAC 3'
3'(+55bp)-Rpn6P	5' GTGTTTCGATCGTTTCCGGTGTG 3'
3'(+1532bp)-Rpn6P	5' GCTGAATGCTCTCGGCAACATG 3'
5'(-54bp)-Rpn6P	5' GCACCAGCTCTAATCGTACTG 3'
5'(-541bp)-Rpn6P	5' GATTGTGGGCTCAACTCACCTG 3'
5'(-1303bp)-Rpn6P	5' GGTAGATAACGACGTCCAGTTGA 3'
T3	5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

3.12 cDNA-Bibliotheken

pACT-cDNA-Bibliothek
Drosophila melanogaster,
embryonal, 0-6 h

basierend auf polyA-mRNA; ungerichtete Klonierung der
cDNAs über *XhoI* (Yu *et al.*, 1999)
zur Verfügung gestellt von L. Pick, New York (USA)

3.13 Auftragsarbeiten

Sequenzierarbeiten wurden bei der Firma Seqlab GmbH, Göttingen in Auftrag gegeben.

4. Methoden

I. Präparation und Analyse von DNA

4.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (Sambrook *et al.*, 1989)

SOB-Medium	2 % (w/v) Bactotrypton		
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt		
	10 mM NaCl		
	2,5 mM KCl		
	10 mM MgCl ₂		
	10 mM MgSO ₄		
RF1	10 mM RbCl	RF2	10 mM MOPS (pH 6,8)
	50 mM MnCl ₂		10 mM RbCl
	30 mM KCl		75 mM CaCl ₂
	10 mM CaCl ₂		15 % (v/v) Glycerin
	15 % (v/v) Glycerin		

250 ml SOB-Medium wurden mit 2,5 ml einer frischen *E. coli*-Kultur (1:100) angeimpft und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 kultiviert. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 UpM, 4 °C, 10 min), in 80 ml kaltem RF1-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert (4000 UpM, 4 °C, 10 min) in 20 ml RF2-Puffer aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich wurde die Zellsuspension in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

(Sambrook *et al.*, 1989)

200 µl dauerkompetenter Zellen (Kompetenz 10^7 - 10^9 Transformanten/µg DNA) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-10 µl Plasmid-DNA-Lösung versetzt und für weitere 30 Minuten auf Eis gelagert. Nach einer 60sekündigen Hitzeschockbehandlung bei 42 °C im Wasserbad wurde der Ansatz sofort 10 Minuten auf Eis gestellt. Schließlich wurden 0,8 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, IPTG, X-Gal) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

4.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	2 % (w/v) Bactotrypton
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	20 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

Mit 5 ml einer frischen *E. coli*-Kultur wurde 1 l SOC-Medium (1:200) angeimpft und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 UpM, 4 °C, 10 min), in 1 l eiskaltem A. dest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einer weiteren Resuspension der Zellen in 500 ml eiskaltem A. dest. wurde die Zentrifugation wiederholt und das Zellpräzipitat in 20 ml 10 % (v/v) Glycerin gelöst. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 5 ml 10 % (v/v) Glycerin gelöst, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.4 Transformation elektrokompetenter Bakterien

100 µl elektrokompetenter Zellen (Kompetenz 10^{10} - 10^{11} Transformanten/µg DNA) wurden auf Eis aufgetaut, während 1-5 µl der Plasmid-DNA-Lösung in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß auf Eis vorgelegt wurden. 40 µl der Zellsuspension wurden mit der Plasmid-DNA gemischt und schließlich in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Nach der Applikation des Elektropulses (5 ms) wurden sofort 0,9 ml eiskaltes SOC-Medium zugegeben. Mit Hilfe einer

Pasteur-Pipette wurde der Transformationsansatz in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf entsprechenden LB-Selektionsplatten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

4.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

4.5.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)

(Birnboim & Doly, 1979)

S1-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg RNase A/ml	S2-Puffer	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
		S3-Puffer	2,6 M KAc/Essigsäure (pH 5,2)

3 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 1 ml der Kultur wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (13000 UpM, 1 min). Die sedimentierten Zellen wurden in 250 µl S1-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl S2-Puffer und fünfminütiger Inkubation bei RT einer alkalischen Lyse unterworfen. Schließlich wurden 250 µl S3-Puffer zur Neutralisierung zugegeben, leicht geschwenkt und 5-10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit Hilfe einer 10minütigen Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C) wurden die Zelltrümmer zusammen mit der chromosomalen DNA von der gelösten Plasmid-DNA getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 0,8 VT Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch eine 10minütige Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C) pelletiert, anschließend zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O gelöst.

4.5.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

(Genomed Jetstar, nach Angaben des Herstellers)

Zur Präparation größerer DNA-Mengen wurde eine ü.N. kultivierte 50 ml Bakterienkultur in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (4000 UpM, 10 min). Die sedimentierten Zellen wurden in 4 ml E1-Puffer resuspendiert und schließlich durch Zugabe von 4 ml E2-Puffer unter leichtem Schwenken lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 4 ml E3-Puffer zur Neutralisation zugegeben. Durch eine 20minütige Zentrifugation (6000 UpM, 20 °C) wurden die chromosomale DNA und Zelltrümmer präzipitiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf

eine zuvor mit E4-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule geladen. Nach dem Durchfluß wurde die Säule zweimal mit je 10 ml E5-Puffer gewaschen. Die Elution der an die Säulenmatrix gebundenen Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 5 ml E6-Puffer. Das Eluat wurde mit 0,7 VT Isopropanol versetzt und die DNA durch Zentrifugation (6000 UpM, 4 °C, 15 min) gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O gelöst.

4.6 Präparation genomischer DNA aus *Drosophila*

(Pirota, 1986; Steller & Pirota, 1986)

Extraktionspuffer	100 mM Tris/HCl (pH 9,0)
	100 mM EDTA
	1 % (w/v) SDS

10 ätherisierte Fliegen wurden in 100 µl Extraktionspuffer mit einem Pistill in einem Glashomogenisator homogenisiert. Für die Präparation genomischer DNA aus Embryonen wurde ein Volumen an Extraktionspuffer eingesetzt, das etwa dem Gesamtvolumen der zur Verfügung stehenden Embryonen entsprach. Das Gesamtextrakt wurde in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 20 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 14 µl 8 M KAc wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert und schließlich zentrifugiert (13000 UpM, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die genomische DNA wurde durch Zugabe von 0,5 VT Isopropanol für 5 Minuten bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C, 15 min) und zweimaligem Waschen mit 70 % EtOH wurde das Präzipitat ca. 10 Minuten luftgetrocknet und schließlich in 20-100 µl A. dest. gelöst.

4.7 Plasmid-Rescue-Klonierung aus genomischer DNA von *Drosophila*

(nach Pirota, 1986)

Einige P-Element-Transformationsvektoren, die über einen bakteriellen Plasmid-Anteil verfügen, ermöglichen die Klonierung P-Element-flankierender, genomischer Sequenzen und somit die genaue Bestimmung der Insertionsstelle eines P-Element-Transposons.

Etwa 5 µg genomischer DNA einer P-Element-Insertionslinie wurden mit 50-100 Units eines geeigneten Restriktionsemzyms in einem Gesamtvolumen von 500 µl für 2-3 Stunden inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die DNA durch die Zugabe von 1/10 VT 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 VT EtOH abs. und anschließender Zentrifugation ((13000 UpM, 4 °C, 15 min) gefällt. Nach mehrmaligem Waschen mit 70 % EtOH wurde das Präzipitat getrocknet und

schließlich in 400 µl 1 × Ligationspuffer gelöst. Durch die Zugabe von 2 Units T4-DNA-Ligase wurde die Ligationsreaktion eingeleitet und über Nacht bei 18 °C fortgeführt. Die ligierte DNA wurde nochmals gefällt und in 50 µl A. dest. gelöst. 2 µl dieser DNA-Lösung wurden schließlich für die Transformation elektrokompenter Zellen eingesetzt.

4.8 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

(Sambrook *et al.*, 1989)

1 × TAE-Puffer	200 mM Tris-Acetat (pH 7,7) 10 mM EDTA
10 × Auftragspuffer	0,5 % (w/v) Xylencyanol 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerin in 1 × TAE

Analytische und präparative Gelelektrophoresen wurden mit Horizontalgelen der Größe 6 cm × 9 cm bzw. 8 cm × 12 cm durchgeführt. In Abhängigkeit von der gewünschten Trenneigenschaft betrug die Agarosekonzentration 0,8-2 % (w/v) in 1 × TAE-Puffer, dem zusätzlich Ethidiumbromid (0,5 µg/µl) zugesetzt wurde. Als Laufpuffer diente 1 × TAE. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/10 VT 10 × Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 60-100 V Gleichspannung. Anschließend wurde das Gel bei UV-Durchlicht analysiert bzw. dokumentiert.

4.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

(GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)

Unter UV-Licht wurde das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Zu je 100 mg Gelstück wurden 100 µl Capture-Puffer zugegeben und bei 60 °C 10-15 Minuten inkubiert, um die Agarose zu lösen. Der Reaktionsansatz wurde dann auf die Glasfasermatrix-Säule gegeben und 1 Minute bei RT inkubiert. Zur Zentrifugation (13000 UpM, 30 s) wurde die Säule in einem Sammelgefäß plaziert. Die darin aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die säulengebundene DNA mit 500 µl ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen (13000 UpM, 30 s). Die Säule wurde nun in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, und es wurden 10-50 µl A. dest. auf die Matrix gegeben. Nach einminütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 UpM, 1 min), um die eluierte DNA im Reaktionsgefäß aufzufangen.

4.10 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm photometrisch quantifiziert werden. Aus der Absorption (optische Dichte OD) läßt sich unter Berücksichtigung der folgenden Parameter die Nukleinsäure-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ bei einer Quarzküvetten Dicke von 1 cm berechnen:

doppelsträngige DNA	$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
einzelsträngige DNA	$OD_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
RNA	$OD_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

4.11 Southern Blot-Analyse

4.11.1 Southern Blot durch nach unten gerichteten Kapillartransfer

(nach Chomczynski, 1992)

Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH	20 × SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat (pH 7,0)
Neutralisierungspuffer	1 M Tris/HCl (pH 7,4) 1,5 M NaCl		

5-10 μg restriktionsenzymatisch behandelte, genomische DNA aus *Drosophila* wurden in einem Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch einen nach unten gerichteten Kapillartransfer auf einer Nylonmembran immobilisiert. Dazu wurde das Agarosegel zunächst 10 Minuten in 0,25 M HCl gebadet, um große DNA-Segmente (> 10 kb) durch die stattfindende Depurinierung zu fragmentieren und somit leichter transferierbar zu machen. Nachdem kurz mit A. dest. gespült worden war, wurde das Gel zweimal 15 Minuten in Denaturierungspuffer und schließlich zweimal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer geschwenkt. In der Zwischenzeit wurde der Blotaufbau wie folgt vorbereitet: 2-3 cm Saugpapiertücher, 5 Lagen 3 MM Whatmanpapier, die mit Transferpuffer (10 × SSC) getränkte, in Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran (Hybond N, Amersham). Darauf wurde das Gel mit den Geltaschenöffnungen nach oben luftblasenfrei aufgelegt und mit 3 Lagen in Transferpuffer getränktem 3 MM Whatmanpapier überschichtet. Mit Hilfe einer Whatmanpapier-Brücke wurde der Blot mit einem Transferpuffer-Reservoir verbunden. Die DNA-Übertragung erfolgte für 1-2 Stunden bzw. über Nacht. Nach dem Transfer wurden die Geltaschen zur Orientierung markiert und das Agarosegel vorsichtig entfernt. Nach einer 10minütigen Trocknung der Membran bei 80 °C, wurde die DNA durch UV-Quervernetzung kovalent an die Membran gebunden.

4.11.2 Hybridisierung der Nylonmembran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Church-Puffer 0,5 M NaPO₄ (pH 7,0)
 7 % (w/v) SDS

Waschpuffer 1 2 × SSC
 0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer 2 0,1 × SSC
 0,1 % (w/v) SDS

Die getrocknete Membran wurde zunächst 1 Stunde bei der gewünschten Hybridisierungstemperatur (i. d. R. 65 °C) in ca. 20 ml Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) in einem Hybridisierungsröhrchen rotierend prähybridisiert. Schließlich wurde die Membran mit der hitzedenaturierten (100 °C, 5 min), radioaktiv markierten DNA-Sonde in ca. 20 ml Church-Puffer über Nacht bei 65 °C rotierend inkubiert. Nach dem Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran zunächst 10 Minuten in Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur und schließlich in frischem Waschpuffer 1 10 Minuten bei 65 °C gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift in Waschpuffer 2 für 10 Minuten bei Hybridisierungstemperatur wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen. Der Nachweis der Hybridisierungssignale erfolgte mittels Autoradiographie.

4.11.3 Entfernung radioaktiv markierter Sonden von einer hybridisierten Membran

Stripp-Puffer 0,4 N NaOH
 0,1 % (w/v) SDS

Um ein und dieselbe Membran nacheinander mit verschiedenen Sonden hybridisieren zu können, wurden bereits hybridisierte Filter zunächst zweimal 30 Minuten in ca. 100 ml Stripp-Puffer bei 45 °C geschwenkt. Nach fünfminütigem Waschen in 0,1 M NaPO₄-Puffer (pH 6,8) konnte die Membran getrocknet oder direkt prähybridisiert werden.

II. Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

4.12 Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Die erforderliche Enzymmenge, um die eingesetzte DNA vollständig zu spalten wird nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{benötigte Units}/\mu\text{g DNA} = \frac{48,5 \text{ kb (= bp } \lambda) \times \text{Anzahl der Schnittstellen in der Ziel-DNA}}{\text{Größe der Ziel-DNA (bp)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

Sie basiert auf der Definition der Enzymeinheit Unit [U], die die Enzymmenge definiert, welche benötigt wird, um 1 μg λ -DNA innerhalb einer Stunde vollständig zu schneiden.

Pro Restriktionsansatz wurden 0,2-5,0 μg DNA mit entsprechender Enzymmenge in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem in einem Reaktionsvolumen von 20-200 μl bei optimaler Reaktionstemperatur für ein bis drei Stunden inkubiert.

4.13 Dephosphorylierung von freien 5'-Enden

Um eine Religation linearisierter Vektormoleküle zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA vor der Ligationsreaktion mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dieses Enzym spaltet die Esterbindung zwischen der Phosphatgruppe und dem C5-Atom des offenen Zuckerphosphatgerüsts und verhindert somit eine Veresterung mit freien 3'-Hydroxyl-Enden.

Für die Reaktion wurde die DNA-Lösung mit 0,5 U alkalischer Phosphatase und 1/10 VT 10 \times Reaktionspuffer versetzt und 15 Minuten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Es wurden nochmals 0,5 U Enzym hinzugefügt und die Reaktion bei 50 $^{\circ}\text{C}$ für 45 Minuten fortgesetzt. Zuletzt wurde das Enzym durch eine 10minütige Inkubation bei 70 $^{\circ}\text{C}$ inaktiviert.

4.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfordert das Vorhandensein von kompatiblen Enden. 20-100 ng Vektor-DNA wurden zusammen mit einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Nach Zugabe von 1/10 VT 10 \times Ligationspuffer und 1 U T4 DNA-Ligase wurde in einem Endvolumen von 15-20 μl für eine Stunde bei RT oder ü.N. bei 16 $^{\circ}\text{C}$ ligiert.

4.15 Markierung von RNA- und DNA-Molekülen

4.15.1 Nichtradioaktive Markierung von RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription (DIG RNA Labeling and Detection Kit, Roche, Mannheim)

Die *in vitro*-Synthese DIG-markierter RNA-Moleküle unter Verwendung linearisierter Plasmid-DNA und einer entsprechenden RNA-Polymerase liefert RNA-Sonden mit definierter Länge und Einzelstrangspezifität. Dazu wurden zunächst 5 µg Plasmid-DNA stromabwärts der zu transkribierenden Fremd-DNA restriktionsenzymatisch linearisiert. Dabei wurde ein Restriktionsenzym verwendet, das entweder Blunt-Enden oder 5'-Überhänge generiert. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde gefällt und in 20 µl H₂O aufgenommen. Für die *in vitro*-Transkription wurden 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 2 µl DIG RNA-Labeling Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-UTP), 2 µl 10 × Transkriptionspuffer, 1 µl RNasin (20 U/µl) und 1 µl T3- oder T7-Polymerase (20 U/µl) in 20 µl Gesamtvolumen für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine 1:10-Verdünnung hergestellt und bis zur Verwendung in *whole mount in situ*-Hybridisierungen bei -20 °C gelagert.

4.15.2 Nichtradioaktive Markierung von DNA-Sonden mit Hilfe von Zufallsprimern (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche, Mannheim)

Nichtradioaktive DNA-Sonden, die für *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt wurden, wurden nach der "random priming" Methode durch den Einbau des DIG-markierten Nukleotids Digoxigenin-11-UTP hergestellt. Dazu wurden 50-200 ng der zu markierenden Template-DNA (i.d.R. Agarosegel-aufgereinigte Restriktionsfragmente) in 9 µl H₂O aufgenommen, 5 Minuten bei 100 °C denaturiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Zugabe von 2 µl Zufallshexameren (1,56 mg/ml), 2 µl dNTP/DIG-11-UTP Markierungsgemisch (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP) und 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) wurde der Ansatz in einem Endvolumen von 20 µl ü.N. bei Raumtemperatur inkubiert.

4.15.3 Spot-Test DIG-markierter DNA-Sonden (nach Roche, Mannheim)

DIG1-Puffer	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) 0,15 M NaCl	DIG3-Puffer	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5) 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
--------------------	--	--------------------	--

Zur Abschätzung der Qualität DIG-markierter DNA-Sonden, die für *in situ*-Hybridisierungen an Polytäanchromosomen eingesetzt werden sollten, wurde 1 µl des Markierungsansatzes entnommen und eine 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} -Verdünnung hergestellt. Jeweils 1 µl der Verdünnungen wurde auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) gespottet und durch UV-Bestrahlung kovalent vernetzt. Nach kurzem Waschen der Membran in DIG1-Puffer, wurde das Filter 30 Minuten in DIG2-Puffer (0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz in DIG1) präinkubiert. Schließlich wurde die Membran 30 Minuten in anti-DIG-AP-Antikörperlösung (1:5000 in DIG2) bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach zweimal 15minütigem Waschen in DIG1-Puffer wurde die Membran für 2 Minuten in DIG3-Puffer äquilibriert und schließlich in einem aufgeschnittenen Autoklavenbeutel mit ca. 1 ml Färbereagenz (4,5 µl NBT + 3,5 µl X-Phosphat/ml DIG3) inkubiert. Konnte nach 5 Minuten Färbezeit eine Färbung des 10^{-3} -Spots beobachtet werden, war die Sonde ausreichend markiert und wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.15.4 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit Hilfe von Zufallsprimern

(Prime it II-Kit Random Primer Labeling Kit, Stratagene, Heidelberg)

Blue Juice 0,1 M EDTA (pH 8,0)
 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Radioaktive DNA-Sonden, die für die Hybridisierung membrangebundener DNA eingesetzt wurden, wurden nach der "random priming" Methode durch den Einbau von (α - ^{32}P)-dATP hergestellt (Feinberg & Vogelstein, 1983). Dazu wurden 20-50 ng der zu markierenden Template-DNA in 24 µl H_2O aufgenommen, mit 10 µl 9-mer Zufallsprimern vermischt und 5 Minuten bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Schließlich wurden 10 µl Nukleotidgemisch (jew. 0,1 mM dCTP, dGTP, dTTP), 1-2 µl (α - ^{32}P)-dATP (3000 Ci/mmol) und 1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl) hinzugefügt, und der Ansatz wurde für 1 Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Blue Juice abgestoppt.

4.15.5 Schleudersäule

Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide nach der Markierung radioaktiver DNA-Sonden wurde der gesamte Markierungsansatz über eine Bio-Gel P10-Gelfiltrationsmatrix (Biorad) aufgereinigt. Dazu wurden zunächst der Deckel und der Boden eines 0,5 ml-Reaktionsgefäßes mit einer Kanüle durchstoßen und zur Abdichtung wurden 2-3 mm Glasperlen in das

Reaktionsgefäß transferiert. Über die Glasperlen wurden ca. 500 µl der Biogel P10-Trennmatrix (30 % (w/v) in A. dest.) geschichtet. Die Säule wurde dann in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß plaziert und zentrifugiert (2000 UpM, 2 min). Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und der radioaktiv markierte Ansatz wurde auf die Säule gegeben. Während einem weiteren Zentrifugationsschritt (2000 UpM, 2 min) wurde die hochmolekulare, radioaktiv-markierte DNA aufgefangen, während einzelne Nukleotide zusammen mit dem Bromphenolblau-Farbstoff in der Matrix zurückgehalten wurden.

4.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki *et al.*, 1988; Qiagen, Stratagene nach Angaben der Hersteller)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Voraussetzung für die gezielte Vervielfachung eines DNA-Fragmentes ist die Kenntnis endständiger Sequenzbereiche, die der Anlagerung synthetisch hergestellter Oligonukleotide, sog. Primer, dient. Unter Verwendung der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase werden die Primer komplementär zur Matrizen-DNA elongiert. Durch zyklische Wiederholungen des Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Polymerisierungsschrittes wird eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erzielt.

Die Reaktionsansätze umfaßten ein Gesamtvolumen von 100 µl und setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- x µl Template-DNA (5-50 ng)
- 1 µl Sinn-Primer (25 pmol/µl)
- 1 µl Antisinn-Primer (25 pmol/µl)
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM pro dNTP)
- 10 µl 10 × PCR-Puffer
- 20 µl 5 × Q-Solution (optional)
- 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- ad 100 µl H₂O

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermoblock nach folgendem Basisprogramm durchgeführt:

1. Schritt: Denaturierung	95 °C	300 s
2. Schritt: Denaturierung	94 °C	10 s
3. Schritt: Primerhybridisierung	40-60 °C	60 s
4. Schritt: Polymerisierung	72 °C	30-180 s
5. Schritt: Polymerisierung	72 °C	300 s

Nach Beendigung der DNA-Synthese in Schritt 4 wurde die Reaktion wieder bei Schritt 2 aufgenommen. Pro Ansatz wurden 25-30 Amplifikationszyklen durchgeführt.

Zur Amplifikation von Fragmenten, die im folgenden für Expressionsversuche verwendet werden sollten, wurde zur Vermeidung von Falscheinbauten die Pfu Turbo DNA-Polymerase (Stratagene) mit 3'-5'-Exonuclease-Aktivität im entsprechenden Puffersystem verwendet.

4.17 *in vitro*-Transkription und Herstellung doppelsträngiger RNA

(Lohmann *et al.*, 1999)

Für die Herstellung einzelsträngiger RNA wurden 2 µg linearisierte Template-DNA mit 5 µl 10 × Transkriptionspuffer, 5 µl NTP-Mix (10 mM je NTP), 2 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 5 µl T3- bzw. T7-Polymerase (20 U/µl) gemischt, mit RNase-freiem H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und schließlich 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der Template-DNA wurden dem Ansatz 2 µl RNase-freie DNase I (20 U/µl) zugesetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Menge der synthetisierten einzelsträngigen RNA durch die gelelektrophoretische Auftrennung von 1/10 VT des Ansatzes in einem DNA-Agarosegel abgeschätzt worden war, wurden die *sense*- und *antisense*-RNA-Transkriptionsansätze in äquimolaren Mengen gemischt. Nach einer 10minütigen Denaturierung des Gemischs bei 100 °C im Wasserbad wurde der Ansatz zur Hybridisierung der einzelsträngigen RNAs im heißen Wasserbad stehen gelassen und über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Diese Lösung wurde direkt für die Injektion doppelsträngiger RNA in Embryonen verwendet.

III. Präparation und Analyse von Proteinen

4.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	10 × SDS-Laufpuffer	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1 % (w/v) SDS
4 × Tris-SDS-Puffer, pH 6,8	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS	2 × SDS-Probenpuffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol
4 × Tris-SDS-Puffer, pH 8,8	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS		0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau	Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

Proteine lassen sich in Anwesenheit von SDS, einem denaturierenden Detergenz, in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht auftrennen.

Das verwendete Laemmli-System besteht aus zwei Komponenten: einem Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration vom gewünschten Auftrennungsbereich abhängt (i. d. R. 12,5 % Acrylamidlösung in 1 × Tris-SDS-Puffer pH 8,8) und einem 5%igem Sammelgel (5 % Acrylamidlösung in 1 × Tris-SDS-Puffer pH 6,8), mit dem das auspolymerisierte Trenngel überschichtet wird.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Sammelgel wurden die Ansätze mit 1 VT 2 × SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die anschließende Gelelektrophorese in vertikalen Gelelektrophoreseapparaturen erfolgte bei 150-200 V für 1-2 Stunden.

Um die aufgetrennten Proteine direkt im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel für 10 Minuten in Coomassie-Färbelösung bei RT geschwenkt. Durch mehrfaches Waschen in Entfärbelösung wurde überschüssiger Farbstoff entfernt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

Wurden ³⁵S-Methionin-markierte Proteine aufgetrennt, wurde das gefärbte Gel nach gründlichem Spülen mit H₂O 30 Minuten in 1 M Natriumsalicylat (Scintillator) inkubiert und 1 Stunde bei 65 °C auf 3-4 Lagen Whatmanpapier unter Vakuum getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte ü.N. bei -80 °C in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie (Laskey, 1980).

4.19 *in vitro*-Expression

(TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega)

Das *in vitro* Transkriptions-Translations-System von Promega ermöglicht die Expression von Proteinen ausgehend von rekombinanten Plasmiden. Dazu muß das Plasmid zum einen den offenen Leserahmen des zu exprimierenden Gens enthalten und zum anderen einen T7- bzw. T3-Promotor für die Bindung der entsprechenden RNA-Polymerase. Im Kaninchen-Retikulocyt-Lysat befinden sich die Komponenten der Translationsmaschinerie. Zur Markierung des *in vitro*-Translates wurde die Reaktion in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin durchgeführt.

Die Reaktion wurde in folgendem Ansatz nach den Angaben des Herstellers durchgeführt:

- 25 µl Kaninchen Retikulocyt-Lysat
- 2 µl 25 × Reaktionspuffer
- 1 µl T7- bzw. T3-RNA-Polymerase (68 U/µl)
- 1 µl 1mM Aminosäuregemisch ohne Methionin
- 4 µl ³⁵S-Methionin (10 mCi/ml)
- 1 µl RNasin (20 U/µl)
- 1 µl zirkuläre Plasmid-DNA (1µg/µl)
- ad 50 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für 60-90 Minuten bei 30 °C inkubiert. 5 µl des Ansatzes wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). Schließlich wurden die Reaktionsprodukte autoradiographisch detektiert.

4.20 Expression und Extraktion von GST-Fusionsproteinen

(Smith & Johnson, 1988; GST Gene Fusion System, Amersham Pharmacia)

Das Glutathion S-Transferase (GST)-Gen-Fusionssystem erleichtert die Detektion und Aufreinigung bakteriell exprimierter Fremd-Proteine. Nach der gerichteten Klonierung der codierenden Region des zu exprimierenden Peptids in ein pGEX-Plasmid (Amersham Pharmacia), so daß sich die cDNA 3'-terminal im gleichen Leseraster des GST-Gens befindet, wird im folgenden ein GST-Fusionsprotein exprimiert. Der GST-Anteil ermöglicht schließlich die Isolierung des Fusionsproteins aus bakteriellen Proteinextrakten durch eine affinitätschromatographische Aufreinigung über Glutathione-beschichtete Sepharose-Kügelchen ("Beads").

MTPBS	150 mM NaCl	
	16 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,3)	
	4 mM NaH ₂ PO ₄	
	2 µg/µl Aprotinin	alternativ: 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail-Complete
	2 µg/µl Leupeptin	Mini (Roche) pro 10 ml MTPBS

Das rekombinante pGEX-Plasmid wurde zur Expression in *E. coli*-BL21 transformiert. 50 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und ü.N. bei 37 °C geschüttelt (225 UpM). Mit 4 ml dieser Übernachtskultur wurden 400 ml frisches LB-Amp-Medium (1:100) inokuliert und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,5-0,8 wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 1 M IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert, und die Bakterienkultur bei 30 °C weitergeschüttelt. Nach 2-3 Stunden wurde die Kultur abzentrifugiert (5000 UpM, 4 °C, 10 min) und das Zellsediment in 5 ml MTPBS resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch zweimaliges Frieren und Tauen in flüssigem N₂ und bei Raumtemperatur und eine anschließende Ultraschallbehandlung (1 min, max., in Pulsen) auf Eis. Nach Zugabe von 10 % (w/v) Triton-X 100 (1 % Endkonzentration) wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (6000 UpM, 4 °C, 10 min) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 50 % (v/v) Glycerin (Endkonzentration 10 %) versetzt, in 500 µl-Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.21 Affinitätsaufreinigung *in vitro*-exprimierter Proteine durch Bindung an GST-Fusionsproteine (GST-Pulldown-Assay)

(Ausubel *et al.*, 1999; modifiziert)

GST-Pulldown-Experimente erlauben die physikalische Interaktion zwischen einem bakteriell exprimierten GST-Fusionsprotein und einem *in vitro*-exprimierten ³⁵S-markierten Protein *in vitro* nachzuweisen.

NETN	20 mM Tris/HCl (pH 8,0)	TWB	20 mM HEPES (pH 7,9)
	100 mM NaCl		60 mM NaCl
	1 mM EDTA		6 mM MgCl ₂
	0,5 % (v/v) NP-40		0,1 mM EDTA
	1 mM DTT		8,2 % (v/v) Glycerin

Nach Äquilibrierung der Glutathion-Sepharose-Kügelchen ("Beads") durch mehrfaches Waschen in NETN wurden pro Ansatz 40 µl der 50%igen Suspension mit einer abgeschnittenen gelben Spitze in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die GST-Fusionsprotein-haltigen Extrakte wurden bei 30 °C aufgetaut und das in einem Vorversuch ermittelte Volumen Proteinextrakt (10-500 µl), das zu einer Aufreinigung von 2-5 µg GST-Fusionsprotein führt, wurde zu den Beads

gegeben. Durch Zugabe von NETN wurden alle Ansätze auf das gleiche Volumen gebracht und 45-60 Minuten bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 UpM, 15 s) wurde der Überstand abgenommen und die GST-Fusionsprotein-gekoppelten Beads dreimal in jew. 1 ml NETN-M (0,5 % (w/v) Magermilchpulver in NETN) gewaschen. Daraufhin wurden die Beads in 200 µl 20 % (w/v) Magermilchpulver (in NETN) 15 Minuten bei RT rotierend geblockt. Die Beads wurden pelletiert, dreimal in jew. 1 ml NETN-M und schließlich zweimal in jew. 1 ml TWB gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand soweit abpipettiert, daß ca. 50 µl Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß verblieben. Nun wurden pro Ansatz 5 µl frisches *in vitro*-Translat zugefügt, und die Proben wurden 1 Stunde bei RT auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Beads pelletiert, sechsmal in jew. 1 ml NETN-M und abschließend zweimal in jew. 1 ml NETN gewaschen. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen, ohne Beads zu verlieren, und es wurden 5 µl 2 × SDS-Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert, und der Überstand wurde mit Hilfe einer weißen Pipettenspitze auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Zum Nachweis der GST-Fusionsproteine wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Zur Detektion des *in vitro*-exprimierten Proteins wurde das Gel schließlich getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen.

IV. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in *S. cerevisiae*

4.22 Herstellung von Hefe-Nährmedien

Da die Zusammensetzung und Qualität der Nährmedien ausschlaggebend für den Erfolg von Experimenten mit transformierten Hefezellen ist, soll an dieser Stelle kurz auf die Herstellung dieser Medien eingegangen werden. Die Nährmedien wurden in Anlehnung an das Handbuch für das *MATCHMAKER Two-Hybrid System 2* (Clontech) hergestellt.

Zur positiven Wachstumsselektion von transformierten Hefezellen wurden je nach Bedarf verschiedene Mangelmedien benötigt. Als Basis für jedes Mangelmedium wurde ein synthetisches Minimalmedium (SD-Medium) verwendet, das die erforderlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen bereitstellte. Durch Zugabe eines Gemisches essentieller Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen (DO-Lösung, *dropout*), in dem jeweils auf die Komponenten verzichtet wurde, auf deren Synthese durch die verwendeten Auxotrophie-Marker in den Transformanten selektiert werden sollte, wurde das Medium den erforderlichen Selektionsbedingungen angepasst.

Feste Agarnährböden wurden unter Verwendung von 2 % (w/v) Agar hergestellt.

10 × SD-Medium 6,7 % (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren (Difco)
 20 % (w/v) Glucose

10 × DO-Lösung	Adenin Hemisulfatsalz	200 mg/l
	L-Arginin HCl	200 mg/l
	L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/l
	L-Isoleucin	300 mg/l
	L-Leucin	1000 mg/l
	L-Lysin HCl	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Threonin	2000 mg/l
	L-Tryptophan	200 mg/l
	L-Tyrosin	300 mg/l
	Uracil	200 mg/l
	L-Valin	1500 mg/l

4.23 Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen mittels Lithiumacetat (Ausubel *et al.*, 1994)

LiAc-Puffer	0,1 M LiAc
	10 mM Tris/HCl pH 7,8
	1 mM EDTA

Die Lithiumacetat-Methode ermöglicht eine schnelle und effiziente Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA wie auch die simultane Kotransformation mehrerer Plasmid-Konstrukte, die im Idealfall 10^5 Transformanten/ μg Plasmid-DNA liefert.

Für die Transformation von Hefezellen im kleinen Maßstab wurden 25 ml YEPD-Vollmedium in einem 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt (240 UpM). Die Hefekultur wurde zentrifugiert (2000 UpM, 3 min), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 25 ml H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 UpM, 3 min) wurde der Überstand verworfen, das Zellpräzipitat in 25 ml LiAc-Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei 30 °C geschüttelt (240 UpM). Währenddessen wurden die einzelnen Transformationsansätze in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen vorbereitet. Dazu wurden jeweils 5 μl hitzedenaturierte Carrier-DNA (10 mg/ml Heringssperma-DNA) mit 1 μg Plasmid-DNA pro zu transformierendem Konstrukt vermischt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (2000 UpM, 3 min), und das Pellet wurde in 2 ml LiAc-Puffer gelöst. Pro Transformationsansatz wurden 200 μl Zellsuspension zu dem DNA-Gemisch gegeben und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 220 μl 60 % (w/v) PEG3350 pro Ansatz und gründlichem Durchmischen wurden die Ansätze mindestens 1 Stunde bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 5 Minuten appliziert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze zentrifugiert (4500 UpM, 2 min) und die pelletierten Zellen in 1 ml H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 150 μl H₂O aufgenommen, auf den erforderlichen Mangelmedium-Agarplatten ausplattiert und mindestens 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.24 Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems (Chien *et al.*, 1991; MATCHMAKER Two-Hybrid System 2, Clontech)

Das MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 von Clontech erlaubt die Isolierung von cDNAs, die potentielle Interaktionspartner eines speziellen Proteins codieren. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf der Rekonstitution des hefespezifischen Transkriptionsfaktors GAL4. Die Expression zweier rekombinanter Fusionsproteine, von denen eines mit der DNA-Bindedomäne

(DBD), das andere mit der Transaktivierungsdomäne (AD) des GAL4-Aktivators fusioniert ist, kann durch direkte Wechselwirkungen der beiden zu testenden Peptide zur Bildung eines chimären, jedoch funktionellen GAL4-Aktivators führen. Die Verwendung von Reportergenen, deren Transkription der Kontrolle durch das spezifische, GAL4-responsive Promotorelement UAS (*upstream activating sequence*) unterliegt, erlaubt die phänotypische Detektion der Protein-Protein-Interaktion.

Zwei unterschiedliche Klonierungsvektoren, pAS2-1 (*TRP1*) und pACT2 (*LEU2*), ermöglichen die konstitutive Expression eines GAL4-DBD-Fusionsproteins (pAS2-1) und eines GAL4-AD-Fusionsproteins (pACT2). Zum Durchmustern einer cDNA-Bibliothek wird das zu untersuchende Gen (Köder) in der Regel mit der DNA-Bindedomäne fusioniert, während die cDNAs der zu durchmusternden Bibliothek (Beute) als AD-Fusionsproteine exprimiert werden. Als UAS-kontrollierte, genomisch integrierte Reportergene werden zum einen der Auxotrophiemarker *HIS3* wie auch *lacZ* verwendet.

Zum Durchmustern einer pACT2-cDNA-Bibliothek wurde zunächst das pAS2-1-Köderplasmid in Hefezellen transformiert. 2 ml SD/-Trp-Medium wurden mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und ü.N. bei 30 °C schüttelnd inkubiert (250 UpM). Daraufhin wurden 200 ml SD/-Trp-Medium mit dieser Vorkultur inokuliert und wiederum ü.N. bei 30 °C geschüttelt. Nach der Bestimmung der OD₆₀₀ am nächsten Tag wurden 500 ml YEPD-Vollmedium mit einem Volumen der Vorkultur angeimpft, daß die OD₆₀₀ ca. 0,2 betrug. Die Zellen wurden bei 30 °C auf dem Schüttler bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 (ca. 10⁷ Zellen/ml) für etwa 3-4 Stunden weiterinkubiert. Die gesamte Kultur wurde dann in 50 ml-Falcon-Röhrchen aliquotiert und abzentrifugiert (2000 UpM, 5 min). Jedes Zellpellet wurde in 5 ml LiAc-Puffer resuspendiert und die Suspensionen wurden in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen zusammengeführt. Die Zellen wurden sedimentiert, in jew. 12,5 ml LISORB (LiAc-Puffer + 1 M Sorbitol) resuspendiert und für 30 Minuten bei 30 °C geschüttelt (250 UpM). In der Zwischenzeit wurde der Transformationsansatz vorbereitet. Dazu wurden 500 µl hitzedenaturierte Carrier-DNA (10 mg/ml Heringssperma-DNA) und 400 µl pACT2-cDNA-Bibliothek-DNA (250 ng/µl) mit 100 µl LISORB vermischt. Die Zellen wurden in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen zusammengeführt, abzentrifugiert (2000 UpM, 5 min) und in 4 ml LISORB resuspendiert. Für eine Negativkontrolle wurden 25 µl der Zellsuspension entnommen und auf SD/-Leu-Trp-His-Medium ausplattiert. Die übrige Zellsuspension wurde mit der DNA-Lösung vermischt und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden pro ml des Zell-DNA-Gemisches 1,325 ml LiAc-Puffer und 2,675 ml 60 % (w/v) PEG3350 zugegeben, so daß ein Gesamtvolumen von 30 ml entstand. Der gesamte Ansatz wurde für 10-12 Minuten bei 42 °C

unter gelegentlichem Schwenken einem Hitzeschock unterzogen. Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurden zu diesem Zeitpunkt 60 µl des Transformationsansatzes entnommen (s. 4.25). Zur Anreicherung der Kotransformanten wurde der übrige Ansatz zu 200 ml SD/-Leu-Trp-Medium gegeben und für 3 Stunden bei 30 °C auf dem Schüttler (250 UpM) inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2000 UpM, 5 min) und in insgesamt 8 ml SD/-His-Leu-Trp-Medium resuspendiert. Jeweils 400 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf einer SD/-His-Leu-Trp+3-AT-Selektionsplatte (Ø 150 mm) ausplattiert und für 7-10 Tage bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe eines Zahnstochers gepickt, auf frischen SD/-His-Leu-Trp+3-AT-Selektionsplatten ausgestrichen, bei 30 °C inkubiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

Die Verwendung von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) im Selektionsmedium, einem kompetitiven Inhibitor des HIS3-Proteins, erfolgte zur Inhibition des Wachstums von Transformanten mit autonomer HIS3-Expression. Da die autonome HIS3-Expression in Abhängigkeit von dem jeweiligen Hefe-Wirtsstamm und der verwendeten Plasmide variiert, wurde die erforderliche 3-AT-Konzentration (1-50 mM) in Vorversuchen mit Kotransformanten des rekombinanten pAS2-1-Köderplasmids und leerem pACT2-Beuteplasmid ermittelt.

4.25 Ermittlung der Transformationseffizienz und Abschätzung der durchmusterten, unabhängigen Klone

Voraussetzung für die Abschätzung der Anzahl der untersuchten Klone beim Durchmustern einer cDNA-Bibliothek ist die Ermittlung der Kotransformationseffizienz. Dazu wird ein definiertes Volumen des Transformationsansatzes entnommen und auf SD/-Leu-Trp-Medium, das lediglich auf die Anwesenheit von Beute- und Köderplasmid selektiert, ausplattiert. Nach 3-4tägiger Inkubation bei 30 °C werden die Kolonien (cfu) gezählt. Mit Hilfe der folgenden Formel kann nun die Kotransformationseffizienz ermittelt werden:

$$\text{cfu}/\mu\text{g DNA} = \frac{\text{cfu} \times \text{Gesamtvolumen d. Transformationsansatzes } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l}) \times \text{Menge der transformierten DNA } (\mu\text{g})}$$

Bei simultanen Kotransformationen ist die DNA-Menge des limitierenden Plasmids zu berücksichtigen, während bei sequentiellen Kotransformationen (s. 4.4.3) die DNA-Menge des zuletzt transformierten Plasmids einkalkuliert werden muß.

Die Kenntnis der Transformationseffizienz erlaubt anhand der folgenden Formel eine Abschätzung der Anzahl der durchmusterten, unabhängigen Primärklone:

$$\text{Anzahl der Primärklone} = \frac{\text{Transformationseffizienz (cfu/}\mu\text{g)}}{\text{Menge der eingesetzten pACT2-Beute-Plasmid-DNA (}\mu\text{g)}}$$

4.26 Mini-Präparation von Hefe-Gesamt-DNA zur Gewinnung von Plasmid-DNA

(Ausubel *et al.*, 1994)

Hefe-Digestions-Mix	0,1 M EDTA (pH 8,0) 14 mM β -Mercaptoethanol	Hefe-Miniprep-Mix	0,5 M Tris/HCl (pH 8,0) 0,25 M EDTA 2,5 % (w/v) SDS
----------------------------	---	--------------------------	---

Die Verwendung von Hefe-Gesamt-DNA erlaubt die Transformation von *E. coli* zur Gewinnung von rekombinanten Hefe/*E. coli*-Schaukelvektoren.

Dazu wurden 3 ml SD/Mangelmedium, welches die Selektion auf das gewünschte Plasmid erlaubte, mit einer Einzelkolonie angeimpft und ca. 24 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert (250 UpM). 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (13000 UpM, 1 min). Die Zellen wurden in 250 μ l Hefe-Digestions-Mix resuspendiert und nach Zugabe von 12,5 μ l Zymolase (15 mg/ml) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zymolasebehandlung diente der enzymatischen Perforation der Zellwand, wodurch sog. Spheroplasten entstanden, die durch die nachfolgende Zugabe von 50 μ l Hefe-Miniprep-Mix und einer 30minütigen Inkubation bei 65 °C lysiert wurden. Durch die Zugabe von 63 μ l 5 M KAc und einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden unlösliche Proteine und Zelltrümmer präzipitiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (13000 UpM, 4 °C, 10 min) wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 720 μ l abs. EtOH gemischt. Durch Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C, 5 min) wurde die Gesamt-DNA pelletiert und schließlich in 120 μ l H₂O auf dem Schüttler bei 37 °C gründlich gelöst. Zur Entfernung kopräzipitierter RNA wurde der Ansatz mit 5 μ l RNase A (10 mg/ml) vermischt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 120 μ l Isopropanol wurde die Gesamt-DNA erneut präzipitiert und durch Zentrifugation (13000 UpM, 10 min) pelletiert. Die DNA wurde zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen, kurz getrocknet und schließlich in 30 μ l H₂O gelöst. Für die Transformation elektrokompenter Bakterien wurden 2,5 μ l dieser DNA-Lösung verwendet.

4.27 Kolorimetrischer Nachweis der *lacZ*-Reporterogenaktivität in Einzelkolonien auf festen Nährböden (X-Gal Agarose Overlay Assay)

(<http://www.sacs.ucsf.edu/home/HerskowitzLab/protocols/xgalagar.html>, 2001)

Overlay-Stock-Lösung 0,5 M KHPO₄-Puffer (pH 7,0)
 6 % (v/v) Dimethylformamid
 0,1 % (w/v) SDS

Der sog. X-Gal Agarose Overlay Assay ist ein unkompliziertes Verfahren, das einen kolorimetrischen, semiquantitativen Nachweis der *lacZ*-Reporterogenaktivität einzelner Hefekolonien ermöglicht. Besonders vorteilhaft ist, daß die zu analysierenden Klone direkt auf der Agarplatte dieser schnellen Analyse unterzogen werden können.

Pro Platte wurden 10 ml Agaroselösung vorbereitet. Dazu wurden 0,5 % (w/v) Low Melting-Agarose in Overlay-Stock-Lösung durch Erwärmen bei 70 °C gelöst. Nach Zugabe von X-Gal (Endkonzentration 0,5 mg/ml) und β-Mercaptoethanol (0,5 µl pro ml Agaroselösung) wurde die warme Lösung vorsichtig auf die bewachsene Agarplatte gegossen. Nach der Polymerisation der Agarose wurden die Platten bis zur Entwicklung der Blaufärbung für 2-12 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Bedarf konnten gewünschte Kolonien bis zu 5 Tagen nach der Behandlung mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers aus dem Topagar isoliert und auf frischen Agarplatten ausgestrichen werden.

4.28 Quantifizierung der *lacZ*-Reporterogenaktivität in Flüssigkulturen

(Ausubel *et al.*, 1994)

Suspensionspuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5)	Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,0)
	0,05 % (v/v) Triton X-100		40 mM NaH ₂ PO ₄
			10 mM KCl
			1 mM MgSO ₄

ONPG-Lösung 80 ml Z-Puffer wurden mit folgenden Reagenzien versetzt:
 64 mg ONPG
 200 µl 0,5 M DTT
 50 µl 10 % (w/v) SDS
 216 µl β-Mercaptoethanol

Im Rahmen der Hefe 2-Hybrid Analyse ermöglicht die quantitative Bestimmung der *lacZ*-Reporterogenaktivität in kotransformierten Hefezellen eine Aussage über das Maß der Interaktion zweier koexprimierter Proteine. Die Spaltung des chromogenen Substrates ONPG (*o*-Nitrophenyl-β-D-Galactosid) durch die β-Galaktosidase liefert außer Galaktose auch das gelbe *o*-Nitrophenol als Produkt. Da das ONPG-Substrat in hohem Überschuß angeboten wird, verhält sich die Menge von produziertem *o*-Nitrophenol, dessen Absorption bei 420 nm gemessen werden kann, proportional zur β-Galaktosidase-Aktivität (Miller, 1972).

2 ml SD/Mangelmedium, welches die Selektion auf die gewünschten Plasmide erlaubte, wurden mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und ca. 48 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert (250 UpM). Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte, um alle Proben, die parallel bearbeitet werden sollten, in der späten *log*-Phase und so mit einer ähnlichen Zelldichte zu synchronisieren. Mit 200 µl dieser Vorkultur wurden 2 ml frisches SD/Mangelmedium angeimpft und ca. 24 Stunden weiterinkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 wurde für jede Kultur die genaue OD₆₀₀ bestimmt und jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden pelletiert (13000 UpM, 3 min), und der Überstand wurde vorsichtig, ohne das Pellet zu stören, abgesaugt. Die Zellen wurden in 200 µl Suspensionspuffer auf dem Schüttler gelöst und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben konnten direkt weiterbearbeitet oder bei -80 °C gelagert werden.

Nach dem langsamen Auftauen der Proben auf Eis (30-60 min) wurde jeweils 1 ml frisch hergestellte ONPG-Lösung zugegeben und kräftig geschüttelt. Die Proben wurden bei 30 °C im Wasserbad inkubiert und in 15minütigen Intervallen auf eine sichtbare Gelbfärbung überprüft. Trat in einem Zeitraum von 15 Minuten bis 4 Stunden eine sichtbare Gelbfärbung auf, so wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 500 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt und die Inkubationsdauer dokumentiert. Die Proben wurden zur Sedimentation unlöslicher Bestandteile abzentrifugiert (13000 UpM, 1 min) und die OD₄₂₀ des Überstandes wurde spektrophotometrisch gemessen. Als Negativreferenz wurde eine Probe ohne Hefezellen mitgeführt.

Die Berechnung der relativen β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel, die die Zelldichte (OD₆₀₀) und das eingesetzte Volumen der Kultur (V) zu Beginn des Versuchs sowie die Absorption des Reaktionsproduktes *o*-Nitrophenol (OD₄₂₀) und die Reaktionsdauer (t) einkalkuliert:

$$\beta\text{-Gal Units} = \frac{\text{OD}_{420}}{\text{OD}_{600}} \times \frac{1000}{t_{(\text{min})} \times V_{(\text{ml})}}$$

V. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* und histologische Methoden

4.29 P-Element Keimbahntransformation von *Drosophila*

(Rubin & Spradling, 1982; Spradling & Rubin, 1982)

a) Vorbereitung der Embryonen

200 bis 300 *white*-Fliegen wurden 3-5 Tage nach dem Schlüpfen auf mit Hefe bestrichenen Apfelsaftagar-Platten (\varnothing 5 cm) bei 18 °C gehalten. Die für die Injektion vorgesehenen Embryonen wurden durch das Wechseln der Apfelsaftagar-Platten in 30minütigen Intervallen gewonnen. Die Eier wurden mit einem Pinsel vorsichtig in ein feinmaschiges Metallsieb überführt, mit 0,7%iger NaCl-Lösung gewaschen und schließlich in einer im Verhältnis 1:1 mit H₂O verdünnten Klorix-Lösung (Colgate Palmoliv, Hamburg) für ca. 1 Minute dechorionisiert. Nach gründlichem Spülen mit 0,7 % NaCl wurden die Embryonen mit einem Pinsel auf einen rechteckigen Apfelsaftagar-Block überführt und für die Injektion mit Hilfe einer Präpariernadel derart orientiert, daß der anteriore Pol zur Blöckchenkante hin zum Liegen kam. Die aufgereihten Embryonen wurden nun auf einem mit Klebstoff (in 10 ml Heptan gelöster Klebstoff von 10 cm Tesa-Packband) bestrichenen Deckgläschen fixiert, indem das Deckgläschen mit leichtem Druck auf die Embryonen gesetzt wurde. Die Embryonen wurden dann je nach Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur 8 bis 12 Minuten in einem Exsikkator über Kieselgel getrocknet, um den Innendruck der Embryonen zu verringern. Danach wurden die Embryonen mit Voltalef-Öl überschichtet, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern.

b) Mikroinjektion der Embryonen

10 × Injektionspuffer 1 mM NaHPO₄ (pH 7,4)
 50 mM KCl

20 µl der zu injizierenden und in 1 × Injektionspuffer gelösten DNA (0,5 µg/µl) wurden mit 5 µl des ebenfalls in 1 × Injektionspuffer gelösten Helferplasmids pπ25.7wc (0,5 µg/µl) vermischt und zentrifugiert (13000 UpM, 30 min, 4 °C), um störende Schwebeteilchen zu sedimentieren. Mit 1 µl dieser DNA-Lösung wurde die Injektionsnadel von hinten befüllt. Bei der Injektionsnadel handelte es sich um eine Borosilikat-Glaskapillare (\varnothing 1,2 mm) mit Innenfilament, die in einem Kapillarziehgerät manuell ausgezogen wurde. Diese Kapillare wurde mit dem Drucksystem der Mikroinjektionsapparatur verbunden und am Mikromanipulator befestigt. Zum Öffnen der Kapillare wurde der vordere Teil unter dem Mikroskop (200fache Vergrößerung) am Rand des Deckgläschens abgebrochen. Nach gezieltem Einführen der Nadel in das posteriore Ende der Embryonen wurde die DNA-Lösung injiziert. Embryonen, bei denen

bereits die Bildung der Polzellen stattgefunden hatte und die somit einer Transformation der Keimbahnzellen unzugänglich waren, wurden mit Hilfe der Injektionsnadel seitlich aufgerissen und somit abgetötet.

Nach der Injektion wurde das Deckgläschen mit den Embryonen erneut mit Voltalef-Öl überschichtet, in eine feuchte Petri-Schale mit Apfelsaftagar überführt und bei 25 °C inkubiert. Nach ca. 24 Stunden wurden die geschlüpften Larven mit einer Präpariernadel abgesammelt und in Fliegenflaschen mit Zuchtmedium transferiert. Bis zum Schlupf der adulten Fliegen wurden die Tiere bei 25 °C gehalten.

c) Selektion transformierter Fliegen

(Klemenz *et al.*, 1987)

Die Selektion transformierter Fliegen wird durch die Verwendung des *white*-Gens (rote Augenfarbe) als dominantem Selektionsmerkmal ermöglicht. Da die Insertion der P-Element-Konstrukte in der Keimbahn der injizierten Embryonen erfolgt, kann das Insertionsereignis erst in der G1-Generation beobachtet werden.

Die injizierten Tiere (G0-Generation) wurden unmittelbar nach dem Schlüpfen abgesammelt und in Einzelzuchten mit *white*-Fliegen gekreuzt. In der daraus resultierenden G1-Generation konnten transformierte Individuen anhand der orange- bis rotfarbenen Augen erkannt werden. Jedes transgene Tier wurde nun wiederum mit *white*-Fliegen verpaart und die entstehenden heterozygoten Nachkommen wurden untereinander weitergekreuzt. Die homozygoten Nachkommen, die in der Regel an der dunkleren Augenfarbe zu erkennen sind, wurden dann zur Etablierung einer stabilen transgenen Linie weitergezüchtet.

4.30 Hitzeschockbehandlung von *Drosophila*-Embryonen und -Larven

Zur Induktion Hitzeschockpromotor-regulierter FLP-Rekombinase- oder GAL4-Expression in Embryonen oder Larven wurden die Kunststoff-Kulturgefäße, die die Tiere des gewünschten Stadiums enthielten, für eine Stunde in einem 37-38 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dabei wurde der Stopfen so weit in das Kunststoffröhrchen hineingedrückt, daß auch Larven die aus dem Nahrungsbrei herauskrochen unterhalb der Wasseroberfläche gehalten wurden. Vor und nach der Hitzeschockbehandlung wurden die Tiere bei 25 °C inkubiert.

4.31 Selektion Neomycin-resistenter Fliegen

(Steller & Pirotta, 1985; Xu & Rubin, 1993)

Durch die Verfütterung des Neomycin-Analogons Geneticin (Gibco Life Tech.) kann auf die Anwesenheit von P-Elementen, die einen *neo^R*-Selektionsmarker tragen und somit Neomycin-Resistenz verleihen, selektiert werden.

Zur Selektion von Fliegen, die ein P-Element mit einem *neo^R*-Selektionsmarker enthielten, wurde die Parentalgeneration zur Eiablage für 24-48 Stunden auf frische, mittelgroße Futterflaschen gesetzt und bei 25 °C inkubiert. Nach der Entfernung der Elterntiere wurden mit Hilfe eines Zahnstochers 10-20 Löcher in den Futteragar gebohrt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Geneticin-Lösung zu gewährleisten. Nach der Zugabe von 15 µl Geneticin-Lösung (50 mg/ml) pro ml Futteragar, wurden die Flaschen bei 25 °C so lange weiterinkubiert bis die Neomycin-resistenten Tiere schlüpften.

4.32 Antikörperfärbung an fixierten *Drosophila*-Embryonen

(Lawrence & Johnston, 1989)

a) Sammeln von Fliegenembryonen

Apfelsaftagar	25 % (v/v)	Apfelsaft
	1,25 % (w/v)	Saccharose
	2,5 % (w/v)	Trockenhefe
	0,2 % (w/v)	Nipagin
	2,7 % (w/v)	Agar

Zur Eiablage wurden die Fliegen auf mit Apfelsaftagar gefüllte Petrischalen (Ø 5 cm) gesetzt. Zur Fütterung wurde auf den Apfelsaftagar zusätzlich eine Spatelspitze in Wasser angerührte Hefe gestrichen. Die Embryonen wurden dann mit einem Pinsel und 0,7%iger NaCl-Lösung abgesammelt.

b) Fixierung von Embryonen

PBS	130 mM	NaCl
	7 mM	Na ₂ HPO ₄
	3 mM	NaH ₂ PO ₄
PBT	0,1 % (v/v)	Tween 20 in PBS

Embryonen des gewünschten Entwicklungsstadiums (Stunden nach Eiablage) wurden mit einem feinen Pinsel von den Ablageschälchen in ein feinmaschiges Netzchen überführt, in NaCl-Lösung (0,7 %) gewaschen und in einer im Verhältnis 1:1 mit H₂O verdünnten Klorix-Lösung

(Colgate Palmoliv, Hamburg) für ca. 1 Minute dechorionisiert. Nach gründlichem Spülen mit 0,7 % NaCl wurden die Embryonen mit einem Pinsel in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Fixierung erfolgte für 10 Minuten in 500 µl 4 % Paraformaldehyd/PBS und 500 µl Heptan unter kräftigem Schütteln auf einem Schüttler. Nach dem Absetzen der Embryonen an der Phasengrenze wurden beide Phasen weitestgehend abgenommen und die Embryonen zur Beseitigung des restlichen Formaldehyds zweimal mit je 500 µl Heptan gewaschen. Zur Entfernung der Vitellinmembran wurden 500 µl frisches Heptan und 500 µl Methanol zugegeben und 1 Minute kräftig geschüttelt. Der Überstand und die nicht absinkenden Embryonen wurden verworfen, während die verbleibenden Embryonen dreimal mit jeweils 1 ml Methanol gewaschen wurden. Zuletzt wurden die fixierten Embryonen mit Methanol überschichtet und bei 4 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

c) Antikörperfärbung

(Vectastain, ABC Kit Elite PK-6100 Standard; Lawrence & Johnston, 1989)

Die Antikörperfärbung ganzer Embryonen erfolgte mit Hilfe des "Vectastain Elite ABC Kits" und beruht auf einem Verfahren, das von Lawrence & Johnston (1989) entwickelt wurde. Das Prinzip der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) besteht in der Verwendung eines unmarkierten Erstantikörpers, der durch einen biotinylierten Zweitantikörper detektiert wird. Der Zweitantikörper geht im weiteren eine hochaffine Bindung mit einem Avidin-Peroxidase-Komplex ein. Während der Avidinanteil die spezifische Bindung an den Biotin-Anteil des Zweitantikörpers vermittelt, katalysiert der Peroxidaseanteil die Reduktion von Wasserstoffperoxid und bewirkt dadurch die Oxidation des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB). Die Oxidation des Chromogens resultiert in einer Absorptionsänderung und führt somit zu einem Farbumschlag, der durch die Zugabe zweiwertiger Übergangsmetallionen (Ni^{2+} oder Co^{2+}) in Form von NiCl_2 bzw. CoCl_2 zusätzlich verändert werden kann.

Nach Entfernen des Methanols wurden die Embryonen dreimal 20 Minuten in PBT unter leichtem Schwenken rehydriert. Anschließend wurde die Erstantikörperlösung (1:500 bis 1:5000 in PBT) appliziert und bei 4 °C über Nacht leicht geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Erstantikörperlösung verworfen, und die Embryonen wurden dreimal 20 Minuten in PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen für 1 Stunde in 0,5 ml 2%igem Ziegen- bzw. Pferdeserum in PBT (je nach Herkunft des Zweitantikörpers) geschwenkt, um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers abzuschwächen. Währenddessen wurde der Zweitantikörper (1:100) in PBT/2 % Serum an fixierten Wildtypembryonen zur Absättigung unspezifischer Bindungen präadsorbiert. Der so vorbehandelte Zweitantikörper wurde in der gewünschten

Endverdünnung (1:100 bis 1:500) zu den Embryonen gegeben, und der Ansatz wurde für 45 Minuten unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Zweitantikörperlösung wurden die Embryonen dreimal je 20 Minuten in PBT gewaschen. Während dieser Waschschrte wurde der Farbkomplex aus Avidin (10 µl Lösung A) und biotinylierter Meerrettichperoxidase (10 µl Lösung B) in 500 µl PBT angesetzt und für 30 Minuten bei RT vorinkubiert. Das PBT wurde nun von den Embryonen abgezogen und 500 µl Farbkomplex-Lösung wurden zugegeben; die Inkubation fand für 30 Minuten unter leichtem Schwenken statt. Anschließend wurde der Komplex verworfen und die Embryonen dreimal 10 Minuten in PBT gewaschen. Schließlich wurden die Embryonen in ein silikonisiertes Blockschälchen überführt, und es wurden 600 µl PBT, 30 µl DAB (10 mg/ml) und 20 µl NiCl₂ (1% w/v) zugegeben. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 5 µl H₂O₂ (0,3 % v/v) gestartet und unter dem Binokular verfolgt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Färbelösung abgenommen und die Embryonen mehrfach mit PBT gewaschen.

Für eine dauerhafte Aufbewahrung wurden die Embryonen in einer Alkoholreihe schrittweise dehydriert (30 %, 70 %, 96 % Ethanol) und anschließend in Methylsalicylat bei 4 °C gelagert. Für die Betrachtung unter dem Mikroskop wurden die Embryonen auf einem Objektträger in DPX (Fluka) eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach der Aushärtung des Einbettungsmediums konnten die Präparate dauerhaft gelagert werden.

4.33 Histochemische X-Gal-Blaufärbung an larvalen und adulten Geweben

(Glaser *et al.*, 1986)

Fixierlösung	0,1 M NaPO ₄ , pH 7,4 0,7 % (v/v) Glutaraldehyd	X-Gal-Färbelösung	10 mM NaPO ₄ , pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 3,1 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 3,1 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,3 % (v/v) Triton X-100
Faure'sche Lösung	30 % (w/v) Gummi arabicum 100 % (w/v) Chloralhydrat 40 % (v/v) Glycerin		

Für den Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität wurden larvale Organe und adulte Gonaden in 0,7 % NaCl präpariert, in ein Blockschälchen mit Fixierlösung überführt und für 20 Minuten langsam geschwenkt. Nach der Fixierung wurden die Gewebe mehrfach mit PBS gewaschen und schließlich in ein Blockschälchen mit 2 ml Färbelösung transferiert. Durch Zugabe von 25 µl einer 8%igen X-Gal-Lösung (in DMF) pro ml Färbelösung wurde die Farbreaktion gestartet und unter Lichtabschluß bei RT oder 37 °C so lange fortgeführt, bis eine ausreichend intensive Blaufärbung zu beobachten war. Durch mehrfaches Waschen in PBT wurde die Reaktion

abgestoppt und die Gewebeproben wurden in einem Tropfen Faure'scher Lösung dauerhaft eingebettet.

4.34 *in situ*-Hybridisierung an fixierten *Drosophila*-Embryonen, Larven und adulten Ovarien und Testes mit DIG-markierten RNA-Sonden

(O'Neill & Bier, 1994, modifiziert)

Ribofix-Lösung	50 mM EGTA (pH 8,0) 25 % (v/v) Formaldehyd (16 %, Ultrapure EM Grade, Polysciences) in 1 × PBS
20 × SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat
Hybridisierungslösung (HS)	50 % (v/v) Formamid 25 % (v/v) 20 × SSC (pH 7,0) 0,1 % (v/v) Heparin (50 mg/ml) 0,01 % (v/v) Tween 20
Färbepuffer	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl (pH 9,5) 50 mM MgCl ₂ 1 mM Levamisol 0,1 % (v/v) Tween 20

Embryonen wurden wie unter 4.32 beschrieben dechorionisiert und in ein Rollrandgläschen mit 2,5 ml Ribofix-Lösung überführt. Nach Zugabe von 2,5 ml Heptan wurden die Embryonen 25 Minuten unter kräftigem Schütteln fixiert. Nach Entfernen der Fixierlösung wurden die Embryonen mehrfach in Heptan gewaschen und schließlich in 2,5 ml Heptan und 2,5 ml Methanol für eine Minute durch kräftiges Schütteln devitellinisiert. Nach zweimaligem Waschen in Methanol wurden die Embryonen dreimal in Ethanol (96 %) gewaschen und schließlich in EtOH bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für *in situ*-Hybridisierungen an larvalen bzw. adulten Geweben wurden dritte Larven bzw. narkotisierte adulte Fliegen in PBS mit Hilfe von Dumont-Pinzetten aufpräpariert, und die interessierenden Organe (Imaginalscheiben, ZNS, Ovarien, Testes etc.) wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit PBS gesammelt. Das PBS wurde abgenommen und 100 µl Ribofix-Lösung, 300 µl Heptan und 10 µl DMSO wurden zugegeben. Schließlich wurden die Organe 20 Minuten auf dem Schüttler fixiert. Die Fixierlösung wurde abgenommen, und die Organe wurden zweimal 5 Minuten in einer Mischung von 500 µl Heptan und 500 µl Methanol geschüttelt. Abschließend wurde zweimal in Methanol gewaschen, und die fixierten Organe konnten in Methanol bei 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden für fixierte Embryonen wie auch fixierte Larvale und adulte Organe gleichermaßen durchgeführt. Nach Abziehen des Alkohols wurden die Embryonen fünfmal 5 Minuten in PBT (PBS/0,3 % Tween 20) rehydriert und 20 Minuten in PBS/4 % Paraformaldehyd unter leichtem Schwenken zwischenfixiert. Die Embryonen wurden dreimal 2 Minuten in PBT gewaschen und schließlich in 995 µl PBT aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurde das Reaktionsgefäß 30 Sekunden in der Hand geschwenkt und 35 Sekunden wurden zum Absinken der Embryonen einkalkuliert, so daß eine Gesamtinkubationsdauer von 65 Sekunden resultierte. Der Überstand wurde sofort verworfen, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Glycin (20 mg/ml) und 900 µl PBT abgestoppt. Nach dreiminütigem Schwenken wurden die Embryonen zweimal 5 Minuten in PBT gewaschen und nochmals 8 bis 10 Minuten in 1 ml PBS/4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Embryonen wurden fünfmal 5 Minuten in PBT gewaschen, 10 Minuten in 1 ml 1:1 PBT/Hybridisierungslösung (HS) inkubiert und schließlich für weitere 10 Minuten in 1 ml HS geschwenkt. Die HS wurde erneuert, und der Ansatz wurde 1 Stunde bei 53-56 °C Hybridisierungstemperatur im Wasserbad präinkubiert. Währenddessen wurden 1,5 µl der (1:10 in H₂O verdünnten) DIG-markierten RNA-Sonde (vgl. 4.15.1) in 150 µl HS aufgenommen, 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und im Wasserbad auf Hybridisierungstemperatur eingestellt. Die HS wurde von den präinkubierten Embryonen abgenommen und durch die Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 53-56 °C über Nacht.

Am folgenden Tag wurden die Embryonen dreimal 20 Minuten in 1 ml vorgewärmter HS bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Anschließend wurde in 1 ml 80 % HS/20 % PBT, in 1 ml 60 % HS/40 % PBT und in 1 ml 20 % HS/80 % PBT für jeweils 20 Minuten bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Es folgten fünf 20minütige Waschschrte in jeweils 1 ml PBT, wobei die Embryonen langsam auf Raumtemperatur angeglichen wurden. In der Zwischenzeit wurden fixierte Wildtypembryonen durch mehrfaches Waschen in PBT rehydriert und zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit einer 1:100 Verdünnung des anti-DIG-AP-Antikörpers inkubiert. Die präabsorbierte anti-DIG-Antikörperlösung wurde in einer Enverdünnung von 1:2000 in PBT auf die Embryonen gegeben, und es wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach viermaligem Waschen in PBT wurden die Embryonen einmal 5 Minuten und zweimal 10 Minuten in Färbepuffer inkubiert und schließlich in 1 ml frischem Färbepuffer in ein silikonisiertes Blockschälchen überführt. Durch die Zugabe von 3,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat wurde die Farbreaktion gestartet. Die Ansätze wurden unter Lichtabschluß entwickelt und zwischenzeitlich unter dem Binokular kontrolliert. Bei ausreichender Farbintensität wurde die Reaktion durch Waschen in PBT abgestoppt. Nach

mehrmaligem Waschen in absolutem EtOH konnten die Embryonen entweder in EtOH bei 4 °C gelagert oder in Epon eingebettet werden.

4.35 *in situ*-Hybridisierung an Polytänchromosomen aus larvalen Speicheldrüsen (Langer-Safer *et al.*, 1982; Schmidt, 1992)

20 × SSPE	3 M NaCl
	0,2 M NaH ₂ PO ₄
	0,02 M EDTA (pH 7,4)
20 × PBS	2,6 M NaCl
	0,14 M Na ₂ HPO ₄
	0,06 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
1 × PBT	0,1 % Triton-X-100 in 1 × PBS (v/v)

Die *in situ*-Hybridisierung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden an Polytänchromosomen aus larvalen Speicheldrüsen ermöglicht die cytogenetische Lokalisierung spezifischer Gensequenzen.

Um einen maximalen Polytänisierungsgrad der larvalen Speicheldrüsenchromosomen zu erzielen, wurden die Tiere bei 18 °C in Futterflaschen mit geringer Populationsdichte angezogen. Die Speicheldrüsen von 2-3 wandernden Larven des dritten Larvenstadiums wurden auf einem Objektträger in einem Tropfen 45%iger Essigsäure präpariert, soweit wie möglich von anhaftendem Fettkörpergewebe befreit und schließlich auf einen gelatinisierten Objektträger mit einem Tropfen frischer 45%iger Essigsäure überführt. Nach 2-3 Minuten wurde ein Deckgläschen (18×18 mm) luftblasenfrei aufgelegt und die überschüssige Essigsäure mit Hilfe eines Whatmanpapierstreifens abgesaugt. Durch mehrfaches Beklopfen und leichtes Verschieben des Deckgläschens mit einem Bleistift wurden die Chromosomen gespreitet. Nach Auflegen einer Lage Whatmanpapiers wurden die Chromosomen durch einen starken senkrechten Daumendruck gequetscht. Sofort nach dem Quetschen wurde das Präparat in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit Hilfe eines Skalpells wurde das Deckgläschen zügig abgesprengt, und das Präparat wurde in 96 % EtOH für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C entwässert. Danach wurden die Präparate luftgetrocknet und konnten bei 4 °C über einem Trockenmittel für mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Vor der Hybridisierung wurden die Präparate zunächst einer RNase-Behandlung unterzogen. Dazu wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt, mit 200 µl RNase A (200 µg/ml) in 2 × SSPE überschichtet und mit einem Deckgläschen (34×24 mm) abgedeckt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Deckgläschen abgespült und die

Objektträger 30 Minuten in $2 \times$ SSPE bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ hitzebehandelt. Nach einer kurzen Waschung der Präparate in $2 \times$ SSPE wurde die chromosomale DNA acetyliert. Dazu wurden 300 ml einer $0,1\text{ M}$ Triethanolamin/HCl-Lösung ($\text{pH } 7,5$) in eine Färbeküvette gegeben und auf dem Magnetprüher stark durchmischt. Zehn Sekunden nach der Zugabe von $375\text{ }\mu\text{l}$ Essigsäureanhydrid wurde der Rührer ausgeschaltet, und die Objektträger wurden sofort in die Lösung eingetaucht und für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgten zwei fünfminütige Waschschrirte in $2 \times$ SSPE und schließlich eine Ethanolreihe zur Dehydrierung. Dabei wurden die Präparate zweimal fünf Minuten in $70\text{ }\%$ EtOH und schließlich fünf Minuten in $96\text{ }\%$ EtOH inkubiert. Nach Lufttrocknung der Objektträger wurde die chromosomale DNA in einer frisch verdünnten $0,07\text{ M}$ NaOH-Lösung für 3 Minuten denaturiert. Nach zweimaligem Waschen in $2 \times$ SSPE wurden die Präparate nochmals einer Ethanolreihe unterworfen und abermals luftgetrocknet. Die wie unter 4.15.2 beschriebene Digoxigenin-markierte DNA-Sonde wurde mit $200\text{ }\mu\text{l}$ DIG2-Puffer (s. 4.15.3) versetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. $20\text{ }\mu\text{l}$ der Sonde wurden im kochenden Wasserbad denaturiert, auf das Präparat pipettiert, luftblasenfrei mit einem Deckgläschen ($18 \times 18\text{ mm}$) bedeckt und an den Rändern mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde das Deckgläschen vorsichtig entfernt und der Objektträger dreimal 20 Minuten in $2 \times$ SSPE bei $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewaschen. Nach zwei fünfminütigen Waschschrirten in $1 \times$ PBT wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt, mit jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ einer 1:200-Verdünnung des DIG-Peroxidase-Antikörpers in $1 \times$ PBS überschichtet und schließlich mit einem Deckgläschen ($22 \times 40\text{ mm}$) bedeckt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen abgespült und die Objektträger dreimal 5 Minuten in $1 \times$ PBT gewaschen. Schließlich wurden die Präparate wieder in eine feuchte Kammer überführt und mit jeweils 1 ml einer Lösung überschichtet, die $0,5\text{ mg/ml}$ Diaminobenzidin und $0,01\text{ }\%$ H_2O_2 in $1 \times$ PBT enthielt. Nach einer etwa einstündigen Inkubationsdauer wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob bereits Signale sichtbar waren. In diesem Fall wurden die Objektträger mehrfach in H_2O gewaschen, luftgetrocknet und 5 Minuten in Methanol fixiert. Die getrockneten Präparate wurden im Anschluß zur Darstellung des charakteristischen Bandenmusters der Chromosomen für 1-2 Minuten in einer 1:20 verdünnten Giemsa-Lösung gefärbt. Die Objektträger wurden schließlich 10 Minuten gewässert. Die getrockneten Präparate wurden mit einem Tropfen Euparal und einem Deckgläschen eingebettet und schließlich unter dem Mikroskop ausgewertet.

5. Ergebnisse

I. Funktionsanalyse des *alien/CSN2*-Gens *in vivo*

Die Charakterisierung genspezifischer Mutanten liefert grundlegende Informationen über die Bedeutung eines Gens für den Gesamtorganismus. Die phänotypischen Folgen von Verlust, Fehlfunktion oder Fehlexpression eines Gens erlauben Rückschlüsse auf dessen entwicklungsbiologische Funktion. Die Analyse entwicklungsrelevanter Gene in *Drosophila melanogaster* wird insbesondere durch eine Vielzahl genetischer Marker und durch ein effizientes Transformationssystem erleichtert.

Da aufgrund der intensiven *alien/CSN2*-Genaktivität eine essentielle, entwicklungsrelevante Funktion vermutet werden kann, wurde mittels genetischer Methoden versucht, eine *alien/CSN2*-spezifische Mutante zu generieren. Alternativ wurde der Versuch unternommen, unter Verwendung verschiedener Techniken RNAi-induzierte *alien/CSN2*-Phänokopien zu erzeugen. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Genfunktion *in vivo* ist die Über- bzw. Fehlexpression. Um der Frage nach den entwicklungsbiologischen Konsequenzen einer erhöhten *alien/CSN2*-Genaktivität nachzugehen, wurde das Alien/CSN2-Protein mit Hilfe des GAL4-UAS-Systems in verschiedenen Stadien und Geweben ektopisch exprimiert.

5.1 Das *alien/CSN2*-Gen wird in allen Entwicklungsstadien von *Drosophila* exprimiert

Die genaue Kenntnis des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters ist eine unabdingbare Voraussetzung für die nähere Charakterisierung der entwicklungsbiologischen Funktion eines Gens. Zur Feststellung des *alien/CSN2*-Expressionsmusters wurden ganze Embryonen, verschiedene larvale Gewebe aus dritten Larven und adulte Gonaden mit einer DIG-markierten *alien/CSN2-antisense*-RNA-Sonde hybridisiert (Abb. 5.1). In sehr frühen Embryonalstadien, noch vor Beginn der zygotischen Transkription, werden große Mengen maternaler *alien/CSN2*-Transkripte gleichmäßig im Embryo detektiert. Mit dem Fortschreiten der Embryogenese ist zunächst eine starke Expression entlang des gesamten Keimstreifs zu beobachten, wobei sich im Mesoderm ein segmentales Muster andeutet. Im weiteren nimmt das Gesamt-Expressionsniveau ab, so daß in späten, schlupfreifen Embryonen *alien/CSN2*-Transkripte vornehmlich im ZNS, in den Hirnhemisphären, im Darm und in den Gonaden detektiert werden. In späten dritten Larven setzt sich die Expression des *alien/CSN2*-Gens im larvalen Gehirn und auch in den Gonaden fort. Des weiteren zeigen alle Imaginalscheiben eine gleichmäßige, starke *alien/CSN2*-Expression. Im larvalen Darm, in den Speicheldrüsen und in der somatischen Muskulatur konnten hingegen keine *alien/CSN2*-Transkripte nachgewiesen werden. Die beiden einzig untersuchten Organe aus Adulten, Ovar und Testis, exprimieren beide das *alien/CSN2*-Gen. Während der Follikelreifung ist bereits in jungen Eikammern eine *alien/CSN2*-Expression in den Nährzellen zu beobachten, die bis zum Untergang der Nährzellen gegen Ende der Oogenese anhält. Im somatischen Follikelepithel konnten keine *alien/CSN2*-Transkripte detektiert werden.

Aufgrund dieses weitgefächerten Expressionsmusters kann eine Beteiligung des *alien/CSN2*-Gens an einer Vielfalt entwicklungsrelevanter Prozesse postuliert werden. Diese Hypothese ist insbesondere für die Suche nach einer *alien/CSN2*-spezifischen Mutante von Bedeutung. Es kann durchaus angenommen werden, daß das *alien/CSN2*-Gen zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt bzw. in einem bestimmten Gewebe eine essentielle Funktion übernimmt. Für den Verlust der *alien/CSN2*-Genfunktion kann demnach embryonale, larvale oder auch pupale Letalität postuliert werden. Für den Fall eines nicht-letalen Phänotyps könnten außerdem morphologische Defekte bei den adulten Tieren, weibliche und/oder männliche Sterilität sowie Maternaleffekte erwartet werden.

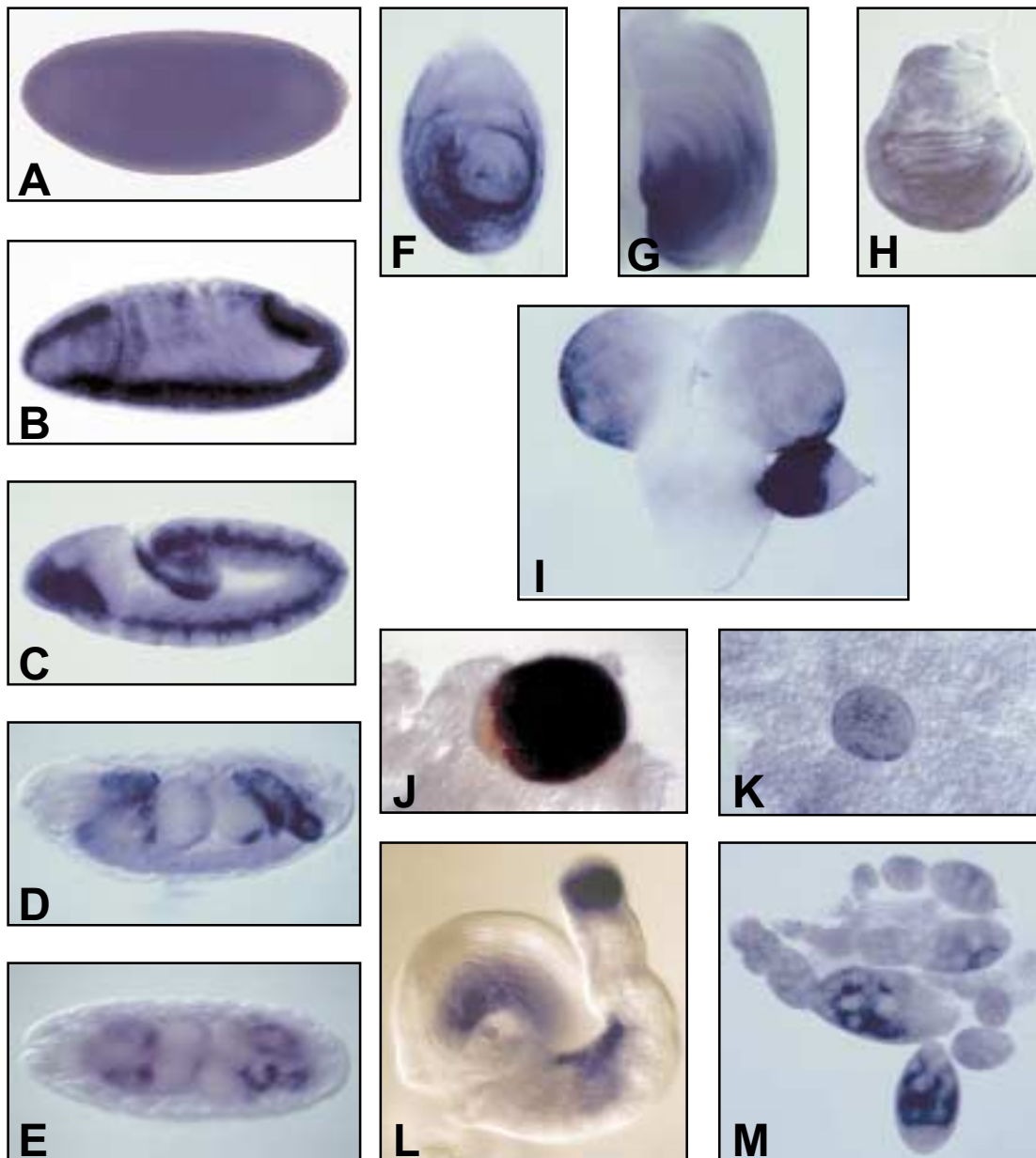


Abb. 5.1 Das *alien/CSN2*-Expressionmuster während der Entwicklung von *Drosophila*. *in situ*-Hybridisierungen mit einer DIG-markierten *alien/CSN2*-antisense-RNA-Sonde zur Detektion von *alien/CSN2*-Transkripten. Parallel durchgeführte Kontrollansätze mit einer DIG-markierten *alien/CSN2*-sense-RNA-Sonde zeigten keine spezifische Färbung. **(A-E)** *alien/CSN2*-Expression während der Embryogenese. **(A)** Lateralansicht eines Embryos im Blastodermstadium. **(B)** Lateralansicht eines Embryos während der Keimstreifstreckung. **(C)** Lateralansicht eines Embryos mit extendiertem Keimstreif. **(D, E)** Schlupfreifer Embryo, **(D)** Lateralansicht, **(E)** Dorsalansicht. **(F-K)** *alien/CSN2*-Expression in späten dritten Larven. **(F, G)** Beinmaginalscheiben. **(H)** Flügelimaginalscheibe. **(I)** Larvales Gehirn mit anhaftender Beinmaginalscheibe. **(J)** Larvaler Testis. **(K)** Larvales Ovar. **(L)** Adulter Testis. **(M)** Adultes Ovar. Erläuterungen s. Text.

5.2 Genetische, cytologische und molekulare Charakterisierung *alien/CSN2*-defizienter Fliegenlinien

Die Verfügbarkeit chromosomaler Deletionen, die den *alien/CSN2*-Genlocus einschließen, stellt einen entscheidenden Vorteil für die nachfolgende Suche nach einer *alien/CSN2*-spezifischen Mutante dar. Derartige Defizienzen repräsentieren Nullmutationen für die betroffenen Gene und ermöglichen somit die nachfolgende kreuzungsgenetische Isolierung genspezifischer Allele.

Die *alien/CSN2*-Transkriptionseinheit ist auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms (2L) bei Position 29F/30A lokalisiert (Goubeaud *et al.*, 1996) und ist im haploiden Genom als einfache Kopie (*single copy gene*) vorhanden. Weder das Durchmustern der *Drosophila* Sequenzdatenbanken (*Berkeley Drosophila Genome Project*) noch die Analyse von genomischen Restriktionsfragmenten in Southern Blot Experimenten (s. u.) lieferten Hinweise auf weitere *alien/CSN2*-Genkopien. Zur Identifizierung *alien/CSN2*-defizienter Fliegenlinien wurde auf die Defizienzensammlung des *Bloomington Stock Center* zurückgegriffen. Folgende Stämme, deren Bruchpunkte so kartiert waren, daß eine chromosomale Deletion im Bereich 29F/30A erwartet werden konnte, wurden für die entsprechenden Analysen herangezogen:

Bloomington Stock Nr.	distaler Bruchpunkt	proximaler Bruchpunkt	
BL 2892	29C 01-02 30D 01-02	30C 08-09 31A 01-02	(Defizienz 1) (Defizienz 2)
BL 384	29D 01-02	30C 04-D01	
BL 368	30A 01-02	30D 01-02	
BL 3702	30A 03-05	30C 05	

Jede der vier Defizienzen ist im homozygoten Zustand embryonal letal, so daß die defizienten Chromosomen mit Hilfe eines *CyO*-Balancerchromosoms in heterozygoten Fliegen stabil gehalten werden müssen. Kreuzungsgenetische Untersuchungen zeigten, daß sich jede der vier Defizienzen allelisch zu den übrigen drei Fliegenlinien verhält, woraus folgt, daß es sich um überlappende Defizienzen handelt. Weitere Komplementationstests zeigten, daß jede der Defizienzen allelisch zu einer Mutation im *numb*-Gen (*numb¹*) ist, das an Position 30B lokalisiert wurde (Uemura *et al.*, 1989). Diese Beobachtung bestärkte die Annahme, daß die genannten Defizienzen auch den nahegelegenen *alien/CSN2*-Locus umfassen könnten.

Zur Klärung der Frage, ob das *alien/CSN2*-Gen in den fraglichen Linien nun tatsächlich deletiert ist, wurden Polytäanchromosomen aus den Speicheldrüsen heterozygoter Larven mit einer DIG-

markierten *alien/CSN2*-cDNA Sonde hybridisiert. Polytänchromosomen bestehen aus mehr als 1000 eng aneinanderliegender Chromatiden, wobei die homologen maternalen und paternalen Chromatiden Seite an Seite zum Liegen kommen. Da Balancerchromosomen durch ihre multiplen Inversionen bei der Präparation und Untersuchung von Polytänchromosomen äußerst störend sind, wurden die heterozygoten Defizienzen (*Df*), die zuvor mit einem *CyO*, *P{ActGFP}* Balancerchromosom umbalanciert worden waren, mit wildtypischen *OregonR* Fliegen gekreuzt. Die daraus resultierende F1-Generation bestand zur einen Hälfte aus heterozygoten *+/CyO, P{ActGFP}*-Tieren, die durch die ubiquitäre GFP-Reporterexpression in den lebenden Larven erkannt und aussortiert werden konnten. Die andere Hälfte der Nachkommen bestand aus Tieren des Genotyps *+/Df*, die durch das Fehlen der GFP-Fluoreszenz als solche identifiziert werden konnten. *in situ*-Hybridisierungen mit einer *alien/CSN2*-cDNA Sonde an Polytänchromosomen dieser Tiere, die bezüglich des 2. Chromosoms ein defizientes Chromosom gegenüber einem Wildtypchromosom tragen, sollten im Falle einer *alien/CSN2*-Defizienz ein nur über die wildtypische Hälfte des Riesenchromosoms verlaufendes Signal detektieren. In diesem Sinne wurden Polytänchromosomen aus heterozygoten *BL368/+*, *BL384/+*, *BL2892/+* und *BL3702/+* Larven untersucht. In Chromosomenpräparationen aus Tieren des Genotyps *BL368/+*, *BL384/+* und *BL2892/+* wurden mit Hilfe einer *alien/CSN2*-spezifischen Sonde ausschließlich halbseitige Hybridisierungssignale detektiert (Abb. 5.2). Im Bereich der Defizienzen wurden durch den Verlust eines ganzen Chromosomenabschnitts häufig Paarungslücken zwischen den polytänisierten homologen Chromatiden beobachtet. Die Region des Wildtypchromosoms, die in der gegenüberliegenden Defizienz deletiert war, bildete wegen der fehlenden Paarungsmöglichkeit eine Schleife, auf der dann das Hybridisierungssignal zu erkennen war. Auch in Chromosomenpräparationen aus Tieren des Genotyps *BL3702/+* wurden derartige Paarungslücken gefunden; das *alien/CSN2*-Hybridisierungssignal wurde allerdings auf beiden Chromosomen detektiert (Abb. 5.2). Demnach repräsentieren die Fliegenlinien BL 368, BL 384 und BL 2892 *alien/CSN2*-Defizienzen, BL 3702 hingegen nicht.

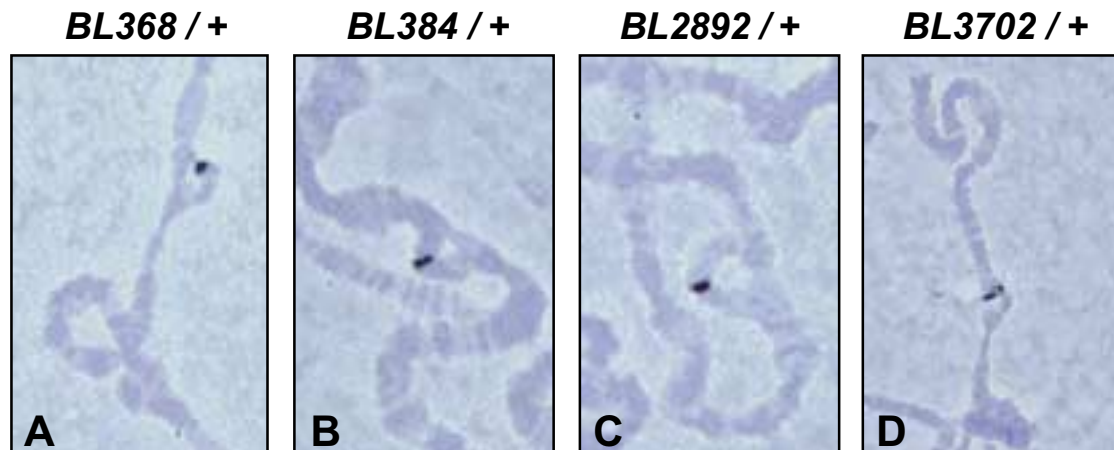


Abb. 5.2 *alien/CSN2*-genspezifische *in situ*-Hybridisierung an defizienten Polytänchromosomen.

Polytänchromosomen aus heterozygoten Larven des Genotyps *BL368/+* (A), *BL384/+* (B), *BL2892/+* (C) und *BL3702/+* (D) wurden mit einer DIG-markierten *alien/CSN2*-cDNA Sonde hybridisiert. Die chromosomalen Deletionen der defizienten Chromosomen stören die ordentliche Aneinanderlagerung der homologen Bereiche der gegenüberliegenden Wildtypchromosomen, so daß es zur Ausbildung von Paarungslücken kommt. In Chromosomenpräparationen aus Larven des Genotyps *BL368/+* (A), *BL384/+* (B) und *BL2892/+* (C) werden lediglich halbseitige Hybridisierungssignale an Position 29F/30A auf dem Wildtypchromosom detektiert, während in *BL3702/+*-Präparaten das Wildtyp- wie auch das defiziente Chromosom ein Hybridisierungssignal zeigen (D).

Um die Ergebnisse der cytogenetischen Untersuchungen molekulargenetisch zu verifizieren, wurde eine Southern Blot Analyse an genomischer DNA der defizienten Fliegenlinien durchgeführt. Da die adulten Tiere der defizienten Stämme immer heterozygot für das defiziente Chromosom (*Df*) sind und aufgrund der Anwesenheit eines Balancerchromosoms immer eine Wildtypkopie der deletierten Region tragen, mußte die genomische DNA aus homozygoten Embryonen isoliert werden. Um die homozygoten Embryonen selektieren zu können, wurden heterozygote *Df/+* Fliegen untereinander gekreuzt und in 12stündigen Intervallen auf frische Ablageschälchen gesetzt. Jede Ablage wurde für mindestens 24 Stunden bei 25 °C weiterinkubiert, um zu gewährleisten, daß alle homozygoten (+/+) und heterozygoten (*Df/+*) Geschwister das erste Larvenstadium erreicht hatten und geschlüpft waren. Die homozygot defizienten (*Df/Df*) und damit embryonal letalen Nachkommen konnten dann als ungeschlüpfte Embryonen abgesammelt werden.

Die genomische DNA wurde mit *BamHI* restriktionsenzymatisch gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Kontrolle wurde der Filter zunächst mit einer radioaktiv markierten *don juan*-cDNA Sonde inkubiert. Das *don juan*-Gen ist auf dem dritten Chromosom lokalisiert (Winhauer, 1995) und ist demnach auch in der genomischen DNA

der homozygot defizienten Embryonen nachzuweisen (Abb. 5.3)¹. Nach Entfernung der hybridisierten *don juan*-Sonde wurde dasselbe Filter mit einer *alien/CSN2*-cDNA Sonde inkubiert, die in der Wildtypsituation ein 5 kb großes *Bam*HI-Fragment detektiert, welches das vollständige *alien/CSN2*-Gen beinhaltet (Abb. 5.4). Das völlige Fehlen eines Hybridisierungssignales in den Spuren, die genomische DNA aus homozygoten Embryonen der Defizienzen BL 368, BL 384 und BL 2892 enthalten, demonstriert, daß das *alien/CSN2*-Gen hier vollständig fehlt. Im übrigen dokumentiert dieses Experiment, daß zumindest außerhalb der untersuchten Defizienzen keine weitere *alien/CSN2*-Genkopie im *Drosophila*-Genom vorhanden ist. Genomische DNA aus homozygoten Embryonen der Defizienz BL 3702 liefert ein wildtypisches Signal und enthält demnach einen intakten *alien/CSN2*-Genlocus.

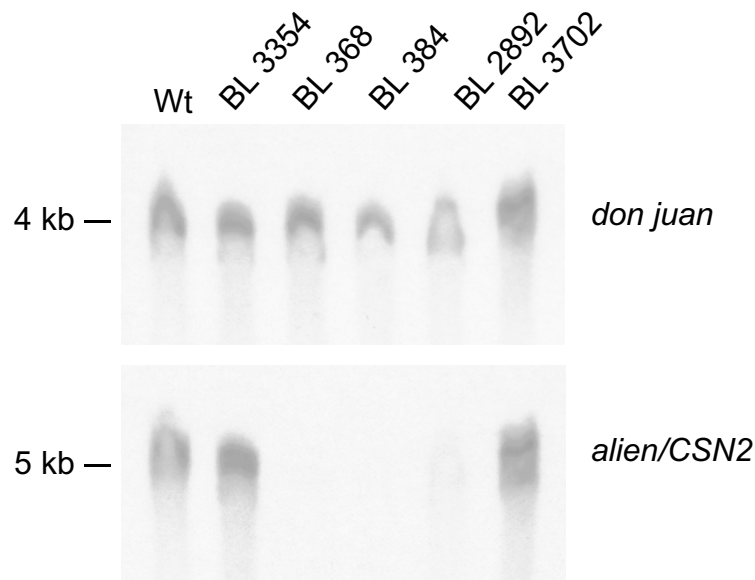


Abb. 5.3 Southern Blot Analyse an genomischer DNA aus homozygot defizienten Embryonen.

Genomische DNA aus wildtypischen *white* Embryonen (Wt) und homozygoten Embryonen der Fliegenlinien BL 3354, BL 368, BL 384, BL 2892 und BL 3702 wurde mit *Bam*HI restriktionsenzymatisch geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Autoradiographie nach Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten *don juan*-cDNA Sonde detektiert in allen Spuren ein *don juan*-spezifisches 4 kb Fragment (oben). Die Rehybridisierung desselben Filters mit einer *alien/CSN2*-cDNA-Sonde detektiert ausschließlich in genomischer DNA aus *white* Embryonen und aus homozygoten BL 3354 (*Df*(3R)84A06-B01; 84D04-D09) bzw. BL 3702 Embryonen ein 5 kb *alien/CSN2*-spezifisches Fragment (unten).

¹Anzumerken ist, daß auch in der genomischen DNA aus homozygoten Embryonen der Fliegenlinie BL 3354 (*Df*(3R)84A06-B01; 84D04-D09), die als *don juan*-Defizienz beschrieben wurde (Blümer, 2000) und als Kontrolle dienen sollte, ein *don juan*-spezifisches Fragment detektiert wird. Da die übrigen Ergebnisse für sich sprechen, mindert diese unerwartete Beobachtung die Aussagekraft des Gesamtexperiments jedoch in keiner Weise.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die cytologische und die molekulargenetische Charakterisierung der untersuchten Defizienzen übereinstimmend zeigen, daß das *alien/CSN2*-Gen in den Fliegenlinien BL 368, BL 384 und BL 2892 deletiert ist, während BL 3702 keine *alien/CSN2*-Defizienz repräsentiert (Abb. 5.4).

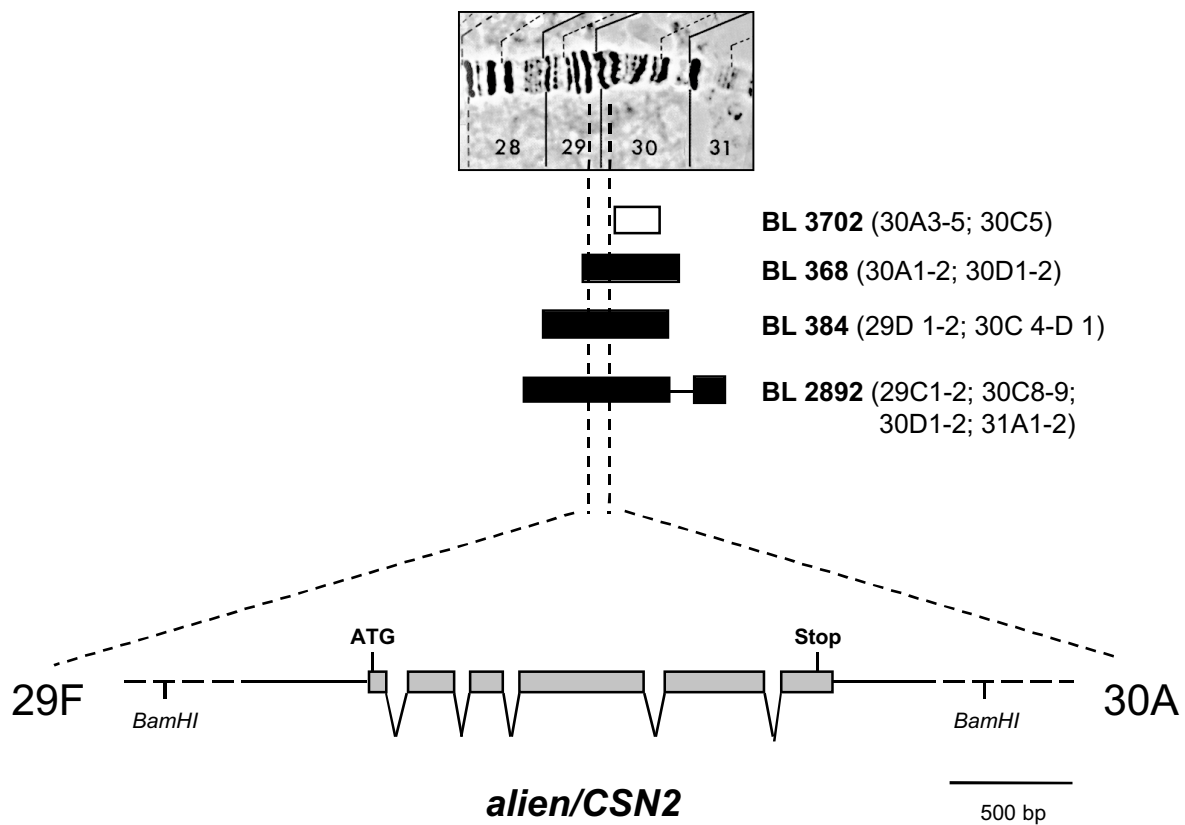


Abb. 5.4 Molekulare und genetische Karte des *alien/CSN2*-Genlocus an Position 29F/30A.

Die hier maßstabsgetreu dargestellte Exon/Intron-Struktur des *alien/CSN2*-Gens ergibt sich aus dem Vergleich der vollständigen cDNA-Sequenz (Goubeaud *et al.*, 1996; Lier, 1998) mit der korrespondierenden genomischen Sequenz aus dem BAC-Klon BACR48E15 (GeneBank Nr. AC008182). Die ungefähren Positionen der flankierenden *Bam*HI-Schnittstellen, die ein 5 kb Fragment definieren, sind angegeben (gestrichelte Linie nicht maßstabsgetreu). Cytologische und molekulargenetische Untersuchungen zeigen, daß das *alien/CSN2*-Gen in den Defizienzen BL 368, BL 384 und BL 2892 (schwarze Balken) deletiert ist. Die mit diesen Defizienzen überlappende Defizienz BL 3702 (weißer Balken) enthält hingegen einen intakten *alien/CSN2*-Genlocus.

5.3 P-Element Remobilisation zur Mutagenisierung des *alien/CSN2*-Gens

Der Einsatz gentechnisch veränderter P-Element-Transposons bietet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten zur genetischen Manipulation und Analyse von *Drosophila*. P-Elemente integrieren sequenzunspezifisch in die DNA und stellen somit wirksame Insertionsmutagene dar. Durch die Zufälligkeit des Integrationsortes sind ungerichtete P-Element-Insertionen jedoch nicht für die Mutagenese eines einzelnen Zielgens geeignet. Die Remobilisation von bereits integrierten P-Elementen resultiert hingegen vornehmlich in lokalen Transpositionsereignissen, einem sog. *Local Hop* (Tower *et al.*, 1993; Zhang & Spradling, 1993). Remobilisierte P-Elemente reintegrieren bevorzugt in der Nähe der ursprünglichen Insertionsstelle, selten weiter als 100 kb entfernt. Demnach erhöht die lokale Transposition erheblich die Wahrscheinlichkeit, einen benachbarten Genlocus zu treffen.

Für die Mutagenisierung des *alien/CSN2*-Gens mittels lokaler Transposition bot sich die Remobilisation zweier benachbarter P-Elemente an. Die Insertionsstellen der P-Elemente *P2042* und *EP2569* waren im Zuge des *Drosophila* Genomprojekts lokalisiert worden und kartierten im Promotorbereich der *rolling stone (rost)*-Transkriptionseinheit, 224 bp (*P2042*) bzw. 180 bp (*EP2569*) stromaufwärts des *rost*-Startcodons (Abb. 5.5). Zur Mobilisation der P-Elemente, die beide durch einen *white*⁺-Marker erkennbar sind, wurde zunächst eine Transposasequelle ($\Delta 2-3$, Robertson *et al.*, 1988) eingekreuzt, was zur Entstehung sog. Jumpstarter-Männchen in der F1-Generation führt. In der Keimbahn dieser Tiere, die das zu mobilisierende P-Element in *trans* zu der Transposasequelle tragen, können nun Transpositionsereignisse stattfinden. In den Nachkommen dieser Jumpstarter-Männchen kann dann aufgrund der genetischen Marker auf Verlust (weiße Augenfarbe, *w*) oder Vorhandensein (rote Augenfarbe, *w*⁺) des P-Elements selektiert werden. Da jedes *white*⁺-Tier das Resultat eines unabhängigen *Local Hop*-Ereignisses sein kann, wurde von jedem Individuum eine bezüglich des zweiten Chromosoms isogene Linie etabliert. Die Frage, ob in einer der so etablierten Linien tatsächlich eine Reintegration des P-Elements in den *alien/CSN2*-Locus stattgefunden hatte, mußte im Anschluß mit Hilfe molekularbiologischer Methoden geklärt werden.

Das erste *Local Hop*-Experiment wurde mit der Fliegenlinie *P2042* durchgeführt, die homozygot letal war und demnach über ein *CyO*-Balancerchromosom gehalten wurde. Aus der Nachkommenschaft von 81 unabhängigen Jumpstarter-Männchen (1-20 Nachkommen pro Jumpstarter-Männchen) wurden insgesamt 480 potentielle *Local Hop*-Linien etabliert, die alle weiterhin homozygot letal waren. Grundsätzlich konnte jeder dieser Linien das P-Element entweder weiterhin an der ursprünglichen Insertionsstelle tragen oder eine Neuintegration aufweisen. Neuintegrationen können in einigen Fällen durch den Einfluß lokaler Enhancer eine

von der Ausgangs-P-Element-Linie abweichende *white*⁺-Reporterexpression, also Augenfarbe aufweisen. Insgesamt 77 der 480 untersuchten Linien, also 16 % zeichneten sich durch eine veränderte, zumeist dunklere Augenfarbe aus, so daß von einer effizienten Remobilisation des *P2042*-Transposons ausgegangen werden konnte. Des weiteren konnte in 22 der insgesamt 480 Linien (4,5 %) eine interchromosomale Transposition von *P2042* auf das dritte oder das X-Chromosom festgestellt werden. Um nun zu untersuchen, ob bei einer der 480 Linien tatsächlich eine Integration des P-Elements in den *alien/CSN2*-Locus stattgefunden hatte, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Zur Verringerung des Arbeitsaufwandes wurden zur Präparation genomischer DNA jeweils 25 heterozygote *P/CyO*-Fliegen aus vier Fliegenlinien gepoolt. Diese DNA-Gemische wurden mit *BamHI* restriktionsenzymatisch behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle einer Integration des ca. 11 kb großen P-Elements in den *alien/CSN2*-Locus sollte eine *alien/CSN2*-cDNA-Sonde außer dem 5 kb großen wildtypischen Fragment zusätzlich aberrante Restriktionsfragmente detektieren. Da das P-Element (*P{lacW}*) selbst über eine endogene *BamHI*-Schnittstelle verfügt, wurden je nach Integrationsort und -orientierung des P-Elements verkürzte oder längere Restriktionsfragmente erwartet. Die Southern Blot Analyse zeigte jedoch, daß keine der 480 Linien eine P-Element-Insertion in dem untersuchten genomischen Bereich des *alien/CSN2*-Gens trug.

An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß im nachhinein gezeigt werden konnte, daß die Letalität der Fliegenlinie P2042 nicht von der P-Element-Insertion im Promotorbereich des *rost*-Gens verursacht wurde, sondern auf eine zweite unbekannt Mutation (*second hit*) auf demselben Chromosom zurückzuführen war. Nach Entkopplung der *P2042*-Insertion durch meiotische Rekombination konnte die Fliegenlinie P2042 als homozygot vitale Fliegenlinie gehalten werden (Dr. A. Holz, pers. Mitteilung). Mit der Identifikation dieses unbekannt Letalfaktors konnte nun die durchgängige Letalität der 480 potentiellen *Local Hop*-Linien wie auch der von Dr. A. Holz parallel untersuchten Exzisions- (*Jump Out*-) Linien erklärt werden. Da die Letalität nicht von *P2042* verursacht wurde, konnten durch die Remobilisation des P-Elements natürlich auch keine Revertanten generiert werden. Aufgrund des mutanten Hintergrundes können für dieses *Local Hop*-Experiment keine Aussagen darüber gemacht werden, wieviele neue Mutationen durch die lokale Transposition von *P2042* erzeugt wurden.

Ein weiteres *Local Hop*-Experiment wurde ausgehend von der homozygot vitalen P-Element-Linie EP2569 durchgeführt. In diesem Fall wurden aus der Nachkommenschaft von 54 unabhängigen Jumpstarter-Männchen insgesamt 432 potentielle *Local Hop*-Linien etabliert, von denen ebenfalls 16 %, nämlich 68 Linien durch eine veränderte Augenfarbe auffielen. In 29

Linien (7 %) konnte eine interchromosomale Transposition nachgewiesen werden. Insgesamt resultierten 11 letale, 3 semiletale und 418 vitale Linien. Da das *alien/CSN2-Gen* auch während der Spermatogenese und der Oogenese exprimiert wird, konnte für den Verlust der *alien/CSN2-Genfunktion* nicht nur Letalität, sondern alternativ auch weibliche und/oder männliche Sterilität postuliert werden. Aus diesem Grund wurden die homozygot vitalen Linien auf Sterilität getestet. Unter den 418 vitalen Linien konnten eine weiblich sterile und eine weiblich und männlich sterile Fliegenlinie identifiziert werden.

Aufgrund der Vitalität und Fertilität der Ausgangs-Linie EP2569 konnte davon ausgegangen werden, daß die neu entstandenen Mutationen, Folgen der P-Element-Remobilisation waren. Während die letalen, semiletalen und sterilen Mutanten im folgenden näher untersucht wurden, wurde auf eine molekulare Analyse der übrigen 416 vitalen, fertilen Linien verzichtet. Jede der neu generierten mutanten Fliegenlinien wurde wie oben beschrieben im Southern Blot auf eine Insertion des ca. 8 kb großen *P{EP}*-Transposons in den *alien/CSN2-Genlocus* untersucht. In keiner der Linien konnte jedoch eine P-Insertion in *alien/CSN2* nachgewiesen werden.

Parallel durchgeführte Komplementationsanalysen bestätigten die Ergebnisse der Southern Blot Experimente. Es zeigte sich, daß sich die 11 letalen und die 3 semiletalen Mutationen in 10 Komplementationsgruppen einordnen ließen, d.h. es wurden insgesamt 10 verschiedene Genloci mutagenisiert. In den drei Fällen, wo jeweils zwei bzw. drei mutante Linien allelisch zueinander waren und demnach eine Komplementationsgruppe bildeten, handelte es sich um Geschwisterlinien, die von ein und demselben Jumpstarter-Männchen abstammten. Erstaunlicherweise verhielt sich nur eine der Komplementationsgruppen allelisch zu den Defizienzen BL 368 und BL 384, die den *alien/CSN2-Locus* und eine Reihe weiterer benachbarter Gene deletieren (s. 5.2). Da sich diese Komplementationsgruppe jedoch ebenfalls allelisch zu Defizienz BL 3702 verhielt, die den *alien/CSN2-Locus* nicht deletiert, konnte gefolgert werden, daß diese Mutation zwar in dem gemeinsamen Überlappungsbereich der genannten Defizienzen kartierte, jedoch unmöglich das *alien/CSN2-Gen* betreffen konnte.

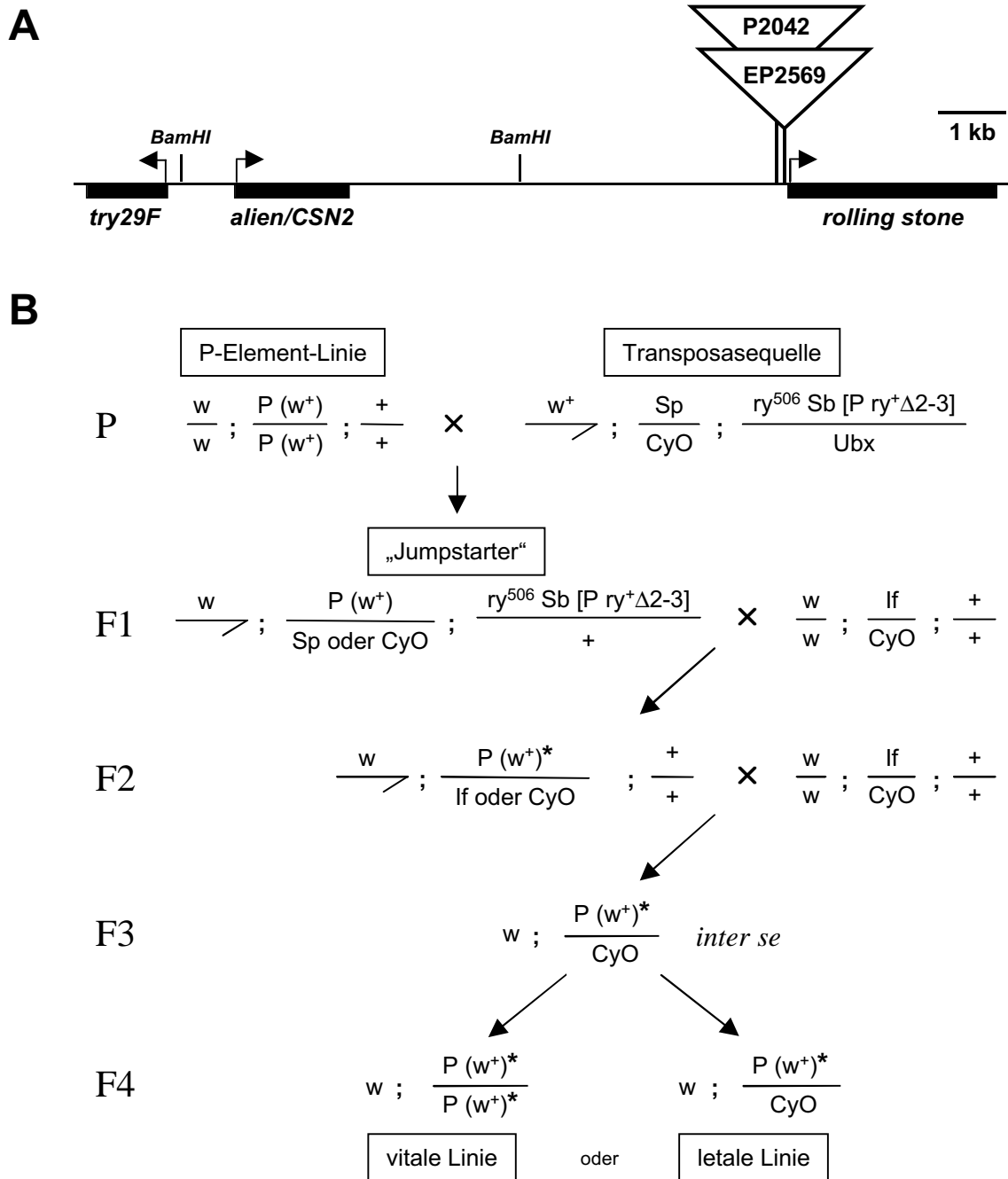


Abb. 5.5 Schematische Darstellung der Remobilisierung der P-Elemente P2042 und EP2569 zur Mutagenisierung des alien/CSN2-Gens. (A) Die Karte der alien/CSN2-genomischen Region zeigt die lineare Anordnung und Orientierung (Pfeile) der Transkriptionseinheiten try29F, alien/CSN2 und rolling stone. Die P-Elemente P2042 und EP2569, die zur Mutagenisierung des alien/CSN2-Locus remobilisiert wurden, inserieren 224 bp bzw. 180 bp stromaufwärts des rolling stone-Startcodons. **(B)** Allgemeines Kreuzungsschema zur Remobilisierung eines P-Elements auf dem zweiten Chromosom. Es sind nur die relevanten Genotypen und Chromosomen dargestellt. Die Kreuzung der Ausgangs-P-Element-Linie [P(w⁺)] mit einem Transposase-exprimierendem Stamm ($\Delta 2-3$) führt in der F1-Generation zur Entstehung von Jumpstarter-Tieren. Die in der Keimbahn dieser Tiere auftretenden Transpositionereignisse werden durch Kreuzung mit einem Balancerstamm (If/CyO) an die einzelnen Nachkommen der F2-Generation weitergegeben. Jedes in der F2-Generation auftretende rotäugige Tier repräsentiert ein potentielles Local Hop-Ereignis [P(w⁺)*]. Zur Vermehrung des P(w⁺)*-Chromosoms wird jedes vermeintliche Local Hop-Tier einzeln mit mehreren Balancertieren verpaart. Ausgehend von den in der F3-Generation entstehenden Geschwistertieren wird dann ein isogener Stock (F4-Generation) etabliert. Treten in diesem Stock geradflügelige, also homozygote P(w⁺)*-Tiere auf, wurde keine letale Mutation erzeugt. Treten hingegen ausschließlich heterozygote P(w⁺)*-Tiere auf, wurde eine homozygot letale Mutation erzeugt.

5.4 Injektion doppelsträngiger RNA und Expression eines symmetrisch transkribierten Transgens zur Erzeugung von *alien/CSN2*-Phänokopien mittels RNA-Interferenz (RNAi)

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) beruht auf dem gezielten Abbau endogener Transkripte nach der Applikation sequenzspezifischer, doppelsträngiger RNA-Moleküle. Diese Form des posttranskriptionellen Gen-Silencings wurde erstmalig in *Caenorhabditis elegans* beobachtet (Fire *et al.*, 1998) und seither bei einer Vielzahl eukaryotischer Organismen erfolgreich angewendet (Übersicht in Hutvágner & Zamore, 2002). Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Expression eines Zielgens *in vivo* derart vermindert werden kann, daß der Effekt einem Funktionsverlust des Gens gleichkommt. Die resultierenden physiologischen oder morphologischen Störungen simulieren den mutanten Phänotyp und werden als Phänokopie bezeichnet. Die besondere Bedeutung der RNAi-Methode besteht also in der Möglichkeit, die Konsequenzen des Funktionsverlustes einzelner Gene *in vivo* zu studieren und dadurch die Frage nach der Genfunktion zu klären. Damit stellt die RNAi-Methode eine vielversprechende, revers-genetische Alternative zur klassischen Mutagenese des *alien/CSN2*-Gens dar.

5.4.1 Injektion doppelsträngiger *alien/CSN2*-RNA in *Drosophila* Embryonen

Die gebräuchlichste Technik zur Erzeugung RNAi-induzierter Phänokopien von embryonal exprimierten Genen in *Drosophila* ist die Injektion *in vitro*-synthetisierter doppelsträngiger RNA (dsRNA) in Embryonen. Die Spezifität der RNA-Interferenz wird durch die Sequenz der dsRNA erzielt, die zumindest über einen Bereich von 80-150 bp mit mRNA-spezifischen Exonsequenzen des Zielgens übereinstimmen muß (Tuschl *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten eine Reihe von genspezifischen Phänokopien in *Drosophila* generiert werden, wie z. B. für *frizzled*, *even-skipped* und *fushi tarazu* (Kennerdell & Carthew, 1998), *nautilus* (Misquitta & Paterson, 1999) oder *discs lost* (Bhat *et al.*, 1999).

Zur Erzeugung *alien/CSN2*-spezifischer Phänokopien wurden ausgehend von der vollständigen *alien/CSN2*-cDNA (in pBS KS+, Klon 327) zunächst einzelsträngige *sense* (ssRNA)- und *antisense* (asRNA)-Transkripte synthetisiert, die im Anschluß miteinander hybridisiert wurden (Abb. 5.6). Die so gewonnene *alien/CSN2*-dsRNA wurde in wildtypische *white*-Embryonen des synzytialen Blastodermstadiums injiziert. In drei unabhängigen Injektionsexperimenten wurden jeweils 199, 264 bzw. 43 Embryonen injiziert (n = 506). Um abschätzen zu können, in welchem Maß die mechanische und physiologische Manipulation die Überlebensrate der injizierten

Embryonen beeinträchtigt, wurde in einem Kontrollexperiment (n = 240) eine Lösung gleicher Zusammensetzung injiziert, die jedoch durch die falsche Kombination von linearisiertem Template und T3- bzw. T7-Polymerase keine *alien/CSN2-in vitro*-Transkripte bzw. dsRNA enthielt.

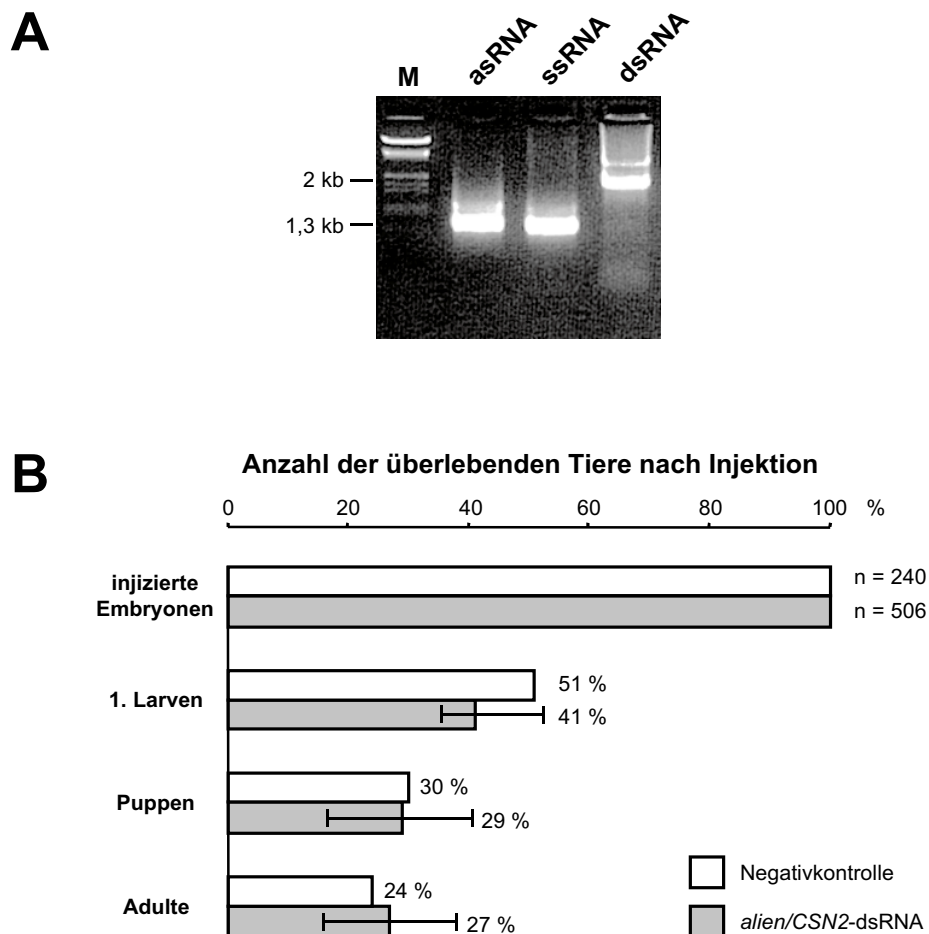


Abb. 5.6 Die Injektion doppelsträngiger *alien/CSN2*-RNA bewirkt keine signifikante Letalität.

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung *in vitro*-synthetisierter *alien/CSN2*-RNA in einem 1%igen Agarosegel. Es wurde jeweils 1/10 VT eines 50 µl-Transkriptionsansatzes zur Herstellung einzelsträngiger *sense* (ssRNA)- und *antisense* (asRNA)-Transkripte aufgetragen. Jeweils 30 µl dieser beiden Ansätze wurden zur Generierung doppelsträngiger *alien/CSN2*-RNA gemischt. 1/12 VT dieses Hybridisierungsansatzes (dsRNA), der für die Injektionsexperimente verwendet wurde, wurde aufgetragen. Das veränderte Laufverhalten der dsRNA bestätigt eine effiziente Hybridisierung der beiden gegenläufigen Transkripte. Als Längenstandard (M) wurden 50 ng λ (*EcoRI/HindIII*)-DNA aufgetrennt. (B) Graphische Darstellung der Anzahl überlebender Tiere (in %) nach Injektion doppelsträngiger *alien/CSN2*-RNA bzw. einer RNA-freien Kontrollösung. Die drei unabhängigen *alien/CSN2*-dsRNA-Injektionsexperimente wurden zusammengefasst und gemittelt. Die Fehlerbalken markieren die in den Einzelexperimenten ermittelten Minima bzw. Maxima, die Prozentzahl gibt den Mittelwert an. Für das einmalig durchgeführte Kontrollexperiment sind die absoluten Werte (in %) angegeben.

Aufgrund der starken Abundanz maternaler *alien/CSN2*-Transkripte in der Oocyte und der zygotischen Expression des *alien/CSN2*-Gens insbesondere während der frühen Embryogenese wurde für den Verlust der *alien/CSN2*-Genfunktion ein embryonal letaler Phänotyp postuliert. Vergleicht man jedoch anhand des Auftretens lebensfähiger Larven des ersten Larvenstadiums die Überlebensrate *alien/CSN2*-dsRNA-injizierter Embryonen mit der Überlebensrate der Kontrolltiere, so stellt sich heraus, daß die Injektion doppelsträngiger *alien/CSN2*-RNA keine signifikante embryonale Letalität verursacht (Abb. 5.6). Auch in späteren Entwicklungsstadien, d. h. während der Larvalentwicklung oder der Metamorphose, kann aufgrund der gleichartigen Überlebensrate von *alien/CSN2*-dsRNA- und Kontroll-injizierten Tieren keine extensive Letalität beobachtet werden. Die adulten Tiere zeigten keinerlei Störungen und erwiesen sich in Sterilitätstests als vollkommen fertil.

An dieser Stelle bleibt festzuhalten, daß das Ausbleiben eines phänotypisch erkennbaren RNAi-Effekts zum einen so interpretiert werden kann, daß die *alien/CSN2*-Genfunktion unter Laborbedingungen keine essentielle entwicklungsbiologische Rolle spielt oder aufgrund redundanter Gene kompensiert werden kann. Zum anderen muß jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Injektionsexperimente unter suboptimalen Bedingungen durchgeführt wurden, die die Entstehung von RNAi-Effekten grundsätzlich beeinträchtigen. Zur Klärung dieser Frage hätte parallel eine Positivkontrolle mit einem Gen bekannter Funktion und eindeutig embryonalem Phänotyp durchgeführt werden müssen.

5.4.2 Expression eines symmetrisch transkribierten Transgens zur Erzeugung doppelsträngiger *alien/CSN2*-RNA *in vivo*

Die Erzeugung von RNAi-induzierten Phänokopien durch die Injektion doppelsträngiger RNA unterliegt gewissen Einschränkungen. Die Tatsache, daß jeder injizierte Embryo einzeln manipuliert werden muß und die transienten Effekte durch Wiederholung ganzer Versuchsreihen reproduziert werden müssen, erfordert einen hohen experimentellen Aufwand. Eine weitere Schwierigkeit stellt die mit diesem Vorgehen verbundene Stadienspezifität dar. Die Injektion von doppelsträngiger RNA in Embryonen inaktiviert zwar die zygotische wie auch die maternale Genexpression, ist aber für die Analyse larval oder adult exprimierter Gene in *Drosophila* ungeeignet (Misquitta & Paterson, 1999). Demgegenüber ermöglichen stabile Transgene, die die Expression bzw. Formierung von doppelsträngiger RNA *in vivo* erlauben, eine leicht reproduzierbare und stadien- bzw. gewebespezifische Induktion von RNAi-Effekten. Diese Strategie wurde inzwischen in *C. elegans* (Tavernarakis *et al.*, 2000), *Drosophila* (Fortier &

Belote, 2000; Lam & Thummel, 2000; Piccin *et al.*, 2001; Giordano *et al.*, 2002) und *Arabidopsis* (Chuang & Meyerowitz, 2000) zur Erzeugung von Phänokopien erfolgreich angewendet.

Das Prinzip der induzierbaren RNA-Interferenz beruht auf der Expression sogenannter *Inverted Repeats* (IR), d.h. eines rekombinanten, palindromischen cDNA-Fragments. Aufgrund der Selbstkomplementarität innerhalb der transkribierten RNA kommt es zur Ausbildung eines intramolekularen RNA-Doppelstrangs, der mit großer Effizienz RNA-Interferenz verursacht. Ein häufiges Problem bei der Herstellung solcher Transgene ist die schwierige Klonierbarkeit derartiger Konstrukte in *E. coli*. Offenbar sind palindromische DNA-Sequenzen in *E. coli* außerordentlich instabil, so daß wiederholt von der "Unklonierbarkeit" von geplanten *inverted repeat* Konstrukten berichtet wird (Fortier & Belote, 2000; Tavernarakis *et al.*, 2000; Piccin *et al.*, 2001). So blieben auch zahlreiche Versuche, ein entsprechendes *alien/CSN2*-IR-Konstrukt zu klonieren, erfolglos. Trotz verschiedenster Modifikationen, wie z. B. der Verwendung unterschiedlich langer Fragmente (0,7-1 kb), der umgekehrten Orientierung beider Fragmente (3'-Ende an 3'-Ende oder 5'-Ende an 5'-Ende) oder dem Gebrauch eines speziellen *E. coli* Stamms mit eingeschränkter Rekombinationsmaschinerie (SURE, Stratagene), konnte kein positiver Klon isoliert werden. Auch die Trennung der beiden gegenläufigen cDNA-Fragmente durch Einführung eines separierenden, unspezifischen Sequenzabschnitts (sog. *Spacer*) (60-70 bp Vektorsequenz) begünstigte das Klonierungsvorhaben nicht.

Als Alternative zur Expression eines palindromischen *alien/CSN2*-Konstrukts bot sich die gleichzeitige, doppelseitige Transkription eines einzelnen *alien/CSN2*-cDNA-Fragmentes an; eine Strategie, die auch zur Erzeugung von *white* Phänokopien angewendet wurde (Giordano *et al.*, 2002). Die symmetrische Transkription des *sense*- und des *antisense*-Stranges sollte durch die unmittelbare räumliche Nähe der beiden entstehenden Transkripte eine effiziente Hybridisierung der komplementären RNAs und somit RNAi begünstigen.

Zur Herstellung eines derartigen Konstruktes wurde zunächst mit Hilfe der genspezifischen Oligonukleotide "5'*art.BglIII*" und "3'*art.EcoRI*" und der *alien/CSN2*-cDNA (Klon 327) ein 1024 bp umfassendes *alien/CSN2*-PCR-Fragment amplifiziert und in pCRII-TOPO ligiert (Klon 334). Unter Verwendung der vektorspezifischen Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* wurde das partielle *alien/CSN2*-cDNA-Fragment freigesetzt und in 5'-3'-Orientierung stromabwärts der GAL4-Bindestellen in die *BglIII/XhoI*-Klonierungsstelle des Transformationsvektors pUAST ligiert (Klon 338). Im Vergleich zur vollständigen cDNA ist dieses Fragment sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich verkürzt, so daß die codierenden Bereiche für die Aminosäuren 1-56 und

397-444 deletiert sind. Damit sollte vermieden werden, daß bei der nachfolgenden Expression ein vollständiges Transkript bzw. ein funktionsfähiges Protein entstehen kann.

Um eine bilaterale Transkription zu gewährleisten, wurde eine zweite, invertierte UAS-Promotorsequenz stromabwärts des bereits klonierten *alien/CSN2*-Fragments eingefügt. Dazu wurde zunächst mit Hilfe der Primer "pUAST-MCS-UAS" und "pUAST-UAS-blunt" der ca. 450 bp lange Promotorbereich aus dem pUAST-Vektor amplifiziert und in pCR-Blunt ligiert (Klon 339). Nach *KpnI*-Restriktion wurde das Promotorfragment in den linearisierten Vorklon 338 ligiert, so daß letztendlich das Transformationskonstrukt "UAS-alien-SAU" (Klon 341) erhalten wurde (Abb. 5.7).

Die Transformation dieses Konstrukts lieferte mehrere unabhängige transgene Fliegenlinien (Stämme 341-1, 341-2 u.s.w.), in denen das "UAS-alien-SAU"-Transgen entweder auf Chromosom 2 oder 3 lokalisiert wurde. Zur Induktion der symmetrischen *alien/CSN2*-Transkription wurden homozygote 341-Fliegen mit einer Reihe stadien- und gewebespezifischer GAL4-Aktivatorlinien gekreuzt, um in den Nachkommen die Folgen der erwarteten RNAi-Effekte untersuchen zu können (GAL4-UAS-System s. Kap. 5.5). Allerdings führte weder die Verwendung embryonaler Treiberlinien, wie der ubiquitären *daGAL4*-Linie oder einer mesodermspezifischen *twistGAL4*-Linie, noch der Gebrauch verschiedener larvaler Treiberlinien (BL 1774, BL 1782, BL 1795, BL 1878), die GAL4 u. a. in den Imaginalscheiben und im larvalen zentralen Nervensystem exprimieren, zu erkennbaren Störungen oder verminderter Vitalität in den transheterozygoten Nachkommen. Auch die *nosGAL4*-induzierte Expression des "UAS-alien-SAU"-Konstrukts in der Keimbahn blieb folgenlos, wie die anhaltende Fertilität der Transheterozygoten zeigte.

Da das Ausbleiben der erwarteten Entwicklungsstörungen verschiedene Ursachen haben konnte, wurde zunächst kontrolliert, ob das "UAS-alien-SAU"-Konstrukt in einfacher Kopie überhaupt eine ausreichende, simultane Synthese von *alien/CSN2-sense*- und *antisense*-Transkripten erlaubte. Die *in situ*-Hybridisierung von DIG-markierten einzelsträngigen *alien/CSN2-sense* bzw. *antisense*-Sonden an transheterozygoten *UAS-alien-SAU/twistGAL4* Embryonen zeigt, daß beide Transkripte in so starkem Maße koexprimiert werden, daß die Färbereaktion bereits nach kurzer Zeit abgestoppt werden konnte, so daß mit der *antisense*-Sonde das endogene *alien/CSN2*-Transkript nur ansatzweise detektiert wurde (Abb. 5.7). Demnach ist das "UAS-alien-SAU"-Konstrukt durchaus funktionell und erlaubt zumindest die gleichzeitige Synthese beider Einzeltranskripte, die zur Bildung doppelsträngiger RNA-Moleküle beitragen sollten.

Da Giordano *et al.* (2002) durch Erhöhung der Kopienzahl eines symmetrisch transkribierten *white*-Transgens eine Verstärkung des Silencing-Effektes erzielen konnten, wurde mittels

Kreuzungsgenetik der Stamm "341-8C; 341-6A" etabliert, der insgesamt zwei Kopien des "UAS-alien-SAU"-Transgens auf dem zweiten und dem dritten Chromosom trug. Trotz der Verdopplung der Gendosis konnten jedoch nach Kreuzung dieses Stammes mit verschiedenen embryonalen und larvalen Treiberlinien (s. o.) weiterhin keine Entwicklungsstörungen beobachtet werden.

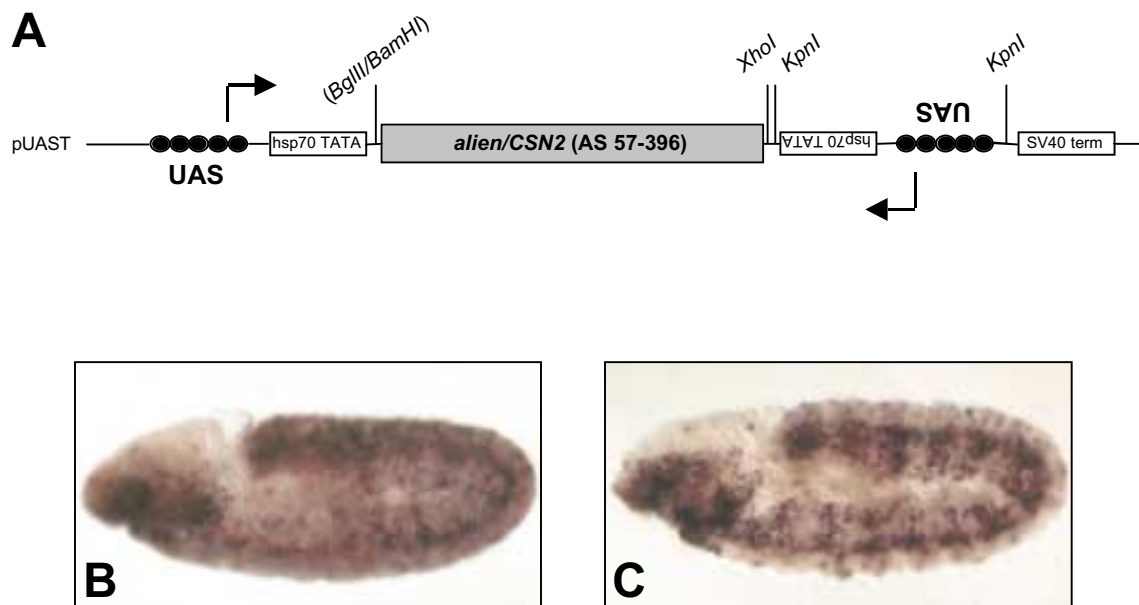


Abb. 5.7 Symmetrische Expression eines *alien/CSN2*-Fragmentes *in vivo*.

(A) Schematische Darstellung des "UAS-alien-SAU"-Konstrukts (Klon 341), das zur Herstellung transgener Fliegen verwendet wurde. Die beidseitig des *alien/CSN2*-Fragments lokalisierten UAS-Sequenzen ermöglichen die gleichzeitige Transkription des *sense*- wie auch des *antisense*-Stranges (Pfeile). Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben (s. Text). (B, C) *in situ*-Hybridisierung von DIG-markierten, einzelsträngigen *alien/CSN2-antisense*- (B) bzw. *sense*- (C) RNA-Sonden an Embryonen des Genotyps *UAS-alien-SAU/twistGAL4*. Beide Transkripte werden in Embryonen des verlängerten Keimstreifstadiums simultan in einem *twist*-spezifischen, mesodermalen Muster exprimiert (Ansicht von lateral). Die etwas ausgeprägtere Hybridisierung der *antisense*-Sonde ist wahrscheinlich auf das endogene *alien/CSN2* Expressionsmuster zurückzuführen (B).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Ausbleiben von sichtbaren *alien/CSN2*-RNAi-Effekten bietet die bereits nach den RNAi-Injektionsexperimenten formulierte Hypothese, daß ein Funktionsverlust des *alien/CSN2*-Gens keine entwicklungsbiologischen Störungen in *Drosophila* bewirkt. Da jedoch bislang kein Alien/CSN2-spezifischer Antikörper verfügbar ist, der für den immunhistochemischen Nachweis des Alien/CSN2-Proteins in *whole mount*-Färbungen eingesetzt werden könnte, konnte auch nicht direkt geprüft werden, ob die angewandten RNAi-Strategien tatsächlich einen Verlust des Alien/CSN2-Proteins bewirkten. Zur Klärung dieser Frage sollte anhand eines Alien/CSN2-GFP-Fusionsproteins indirekt

überprüft werden, ob die symmetrische Expression des *alien/CSN2*-Fragmentes das Silencing eines *alien/CSN2-GFP*-Fusionsgens bewirken kann.

Ausgehend von Fliegenlinien mit jeweils einem lokalisierten "UAS-*alien*-SAU"-Transgen bzw. einem "UAS-*Alien*-GFP"-Transgen (s. Kap. 5.5) wurde kreuzungsgenetisch ein Fliegenstamm etabliert, der beide Transgene auf unterschiedlichen Chromosomen trug. Durch Kreuzung dieser Linie mit der GAL4-Treiberlinie *Sgs 58 AB*, wurden beide Konstrukte gleichzeitig in larvalen Speicheldrüsen exprimiert. Im Falle eines effizienten Silencing-Effekts der doppelsträngigen *alien/CSN2*-RNA, sollte auch das rekombinante *alien/CSN2-GFP*-Fusionstranskript degradiert werden und daraufhin keine GFP-Fluoreszenz mehr nachzuweisen sein. Kürzlich konnten Azevedo *et al.* (2002) in einem ähnlichen Experiment den Silencing-Effekt von *Rar1*-dsRNA anhand eines *Rar1-GFP*-Fusionsgens in transgenen Pflanzenzellen demonstrieren. Vergleicht man jedoch die GFP-Fluoreszenz in Speicheldrüsenzellen, die beide Transgene exprimieren, mit der GFP-Fluoreszenz in Speicheldrüsenzellen, die nur das *Alien/CSN2-GFP*-Fusionsprotein exprimieren, so wird deutlich, daß die symmetrische Expression der *alien/CSN2-sense*- und *antisense*-Transkripte keine erkennbare Verminderung der *Alien/CSN2-GFP*-Expression zur Folge hat (Abb. 5.8). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß auch für das endogene *alien/CSN2*-Transkript kein Silencing-Effekt erzielt werden konnte.

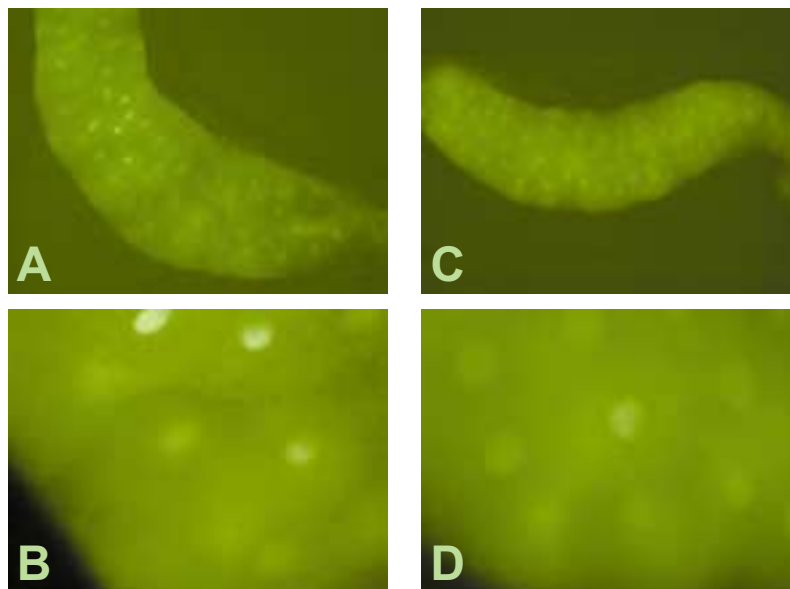


Abb. 5.8 Die symmetrische Expression von komplementären *alien/CSN2*-ssRNAs hat keinen RNAi-Silencing-Effekt auf ein *alien/CSN2-GFP*-Fusionsgen. (A) Ektopische Expression des *Alien/CSN2-GFP*-Fusionsproteins in den Speicheldrüsen dritter Larven (*UAS-Alien-GFP*; *Sgs 58 AB*). (B) Ausschnittsvergrößerung aus (A). (C) Koexpression des *Alien/CSN2-GFP*-Fusionsproteins und des "UAS-*alien*-SAU"-Transgens in den Speicheldrüsen dritter Larven (*UAS-Alien-GFP*; *UAS-alien-ssRNA/Sgs 58 AB*). (D) Ausschnittsvergrößerung aus (C). Die gleichartige Intensität der GFP-Fluoreszenz in beiden Fällen zeigt, daß die symmetrische Expression komplementärer *alien/CSN2*-RNAs keinen hemmenden Einfluß auf das Expressionsniveau des *alien/CSN2-GFP*-Fusionsgens hat.

Zusammenfassend kann man festhalten, daß die symmetrische Transkription eines *alien/CSN2*-Fragmentes zwar eine effiziente Synthese von *sense*- und *antisense*-Transkripten ermöglicht, jedoch offensichtlich keinen RNAi-Effekt hat. Offensichtlich kommt es trotz der verfügbaren Mengen an einzelsträngigen RNAs nicht zur ausreichenden Bildung doppelsträngiger RNA-Moleküle. Die Frage nach den entwicklungsbiologischen Folgen eines Funktionsverlustes des *alien/CSN2*-Gens in *Drosophila* bleibt demnach weiterhin ungeklärt.

5.5 Die ektopische Expression des Alien/CSN2-Genprodukts in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben von *Drosophila* verursacht keine spezifischen Entwicklungsstörungen

Das GAL4-UAS-System ermöglicht die gezielte, d. h. zeit- und gewebespezifische Induktion von beliebigen Genprodukten in *Drosophila* (Brand & Perrimon, 1993; Brand *et al.*, 1994). Die Methode beruht auf der transienten stadien- bzw. gewebespezifischen Expression des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4, der seinerseits die Expression von Transgenen in Gang setzt, die unter der Kontrolle eines GAL4-responsiven UAS-Promotorelements (*upstream activating sequence*) stehen. Die beiden genetischen Elemente liegen als separate Konstrukte in unterschiedlichen transgenen Fliegenstämmen vor und werden erst durch Kreuzung der GAL4-Aktivatorlinie (Treiber) mit der UAS-Linie (Effektor) in der resultierenden Filialgeneration kombiniert.

Zur GAL4-induzierbaren Expression des vollständigen Alien/CSN2-Proteins wurde die vollständige *alien/CSN2*-cDNA als *EcoRI*-Fragment aus Klon 327 isoliert und in 5'-3'-Orientierung stromabwärts des UAS-Promotors eines *EcoRI*-linearisierten pUAST-Vektors eingefügt (Klon 329, Abb. 5.9). Außerdem wurde ein Transformationskonstrukt generiert, das die GAL4-induzierbare Expression eines Alien/CSN2-GFP-Fusionsproteins ermöglichen sollte. Dazu wurde zunächst der codierende Bereich der *alien/CSN2*-cDNA aus Klon 327 mit Hilfe des vektorspezifischen Oligonukleotids "T7" und des genspezifischen, modifizierten Oligonukleotids "alien3'art.HindIII" amplifiziert. Dieses 3'-deletierte Fragment, das um die letzten beiden Aminosäure-codierenden Triplets und das Stop-Codon verkürzt war, wurde nun mit Hilfe der artifiziell eingefügten *HindIII*-Schnittstelle nach *HindIII/Sall*-Restriktion in den Vektor pBS-hGFP-S65T ligiert, so daß ein *alien/CSN2-GFP*-Fusionsgen entstand (Klon 328), welches im Anschluß als *EcoRI/XbaI*-Fragment gerichtet in pUAST integriert wurde (Klon 330, Abb. 5.9). Die Transformation dieser beiden Konstrukte lieferte mehrere unabhängige transgene "UAS-Alien"-Fliegenlinien (Stämme 329-1, 329-2 u.s.w) wie auch "UAS-Alien-GFP"-Fliegenlinien

(330-1, 330-2 u.s.w), in denen die Transgene entweder auf dem zweiten, dem dritten oder dem X-Chromosom lokalisiert wurden.

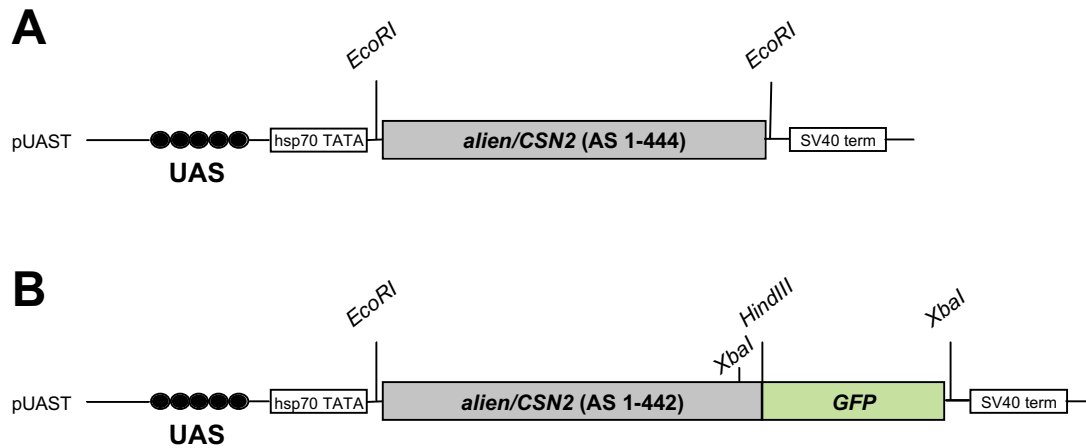


Abb. 5.9 Schematische Darstellung der Konstrukte zur ektopischen Alien/CSN2-Expression in *Drosophila*. (A) Das "UAS-Alien"-Konstrukt (Klon 329) enthält die vollständige *alien/CSN2*-cDNA zur GAL4-induzierbaren Alien/CSN2-Expression. (B) Das "UAS-Alien-GFP"-Konstrukt (Klon 330) enthält ein *alien/CSN2-GFP*-Fusionsgen zur GAL4-induzierbaren Expression eines Alien/CSN2-GFP-Fusionsproteins. Relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben (nähere Erläuterungen s. Text).

Zur ektopischen Expression des Alien/CSN2- bzw. des Alien/CSN2-GFP-Proteins wurden homozygote 329- bzw. 330-Fliegen mit einer Reihe stadien- und gewebespezifischer GAL4-Aktivatorlinien gekreuzt, um in den Nachkommen die Konsequenzen der verstärkten *alien/CSN2*-Genaktivität analysieren zu können. Allerdings führte weder die Verwendung embryonaler Treiberlinien, wie der ubiquitären *daGAL4*-Linie oder einer mesodermspezifischen *twistGAL4*-Linie, noch der Gebrauch verschiedener larvaler Treiberlinien (BL 1774, BL 1782, BL 1795, BL 1878), die GAL4 u.a. in den Imaginalscheiben und im larvalen zentralen Nervensystem exprimieren, zu morphologischen Aberrationen oder verminderter Vitalität in den transheterozygoten Nachkommen. Dieselben Beobachtungen wurden nach ubiquitärer Alien/CSN2-Induktion in verschiedenen Entwicklungsstadien mittels Hitzeschock-induzierter GAL4-Expression gemacht. Tiere des Genotyps *UAS-Alien; hsGAL4* entwickelten sich nach einer Hitzeschockbehandlung während der Embryogenese, während des ersten, zweiten oder dritten Larvenstadiums oder während der Metamorphose in gleicher Weise wie ihre nicht-Hitzeschock-behandelten Geschwistertiere. Auch die *nosGAL4*-induzierte, keimbahnspezifische Expression des "UAS-Alien"-Konstrukts blieb folgenlos, wie die anhaltende Fertilität der Transheterozygoten zeigte.

Aus diesen Experimenten kann geschlußfolgert werden, daß eine Erhöhung der Alien/CSN2-Dosis sowohl in den Geweben, die eine endogene Alien/CSN2-Expression zeigen, wie auch in Geweben, in denen das Alien/CSN2-Protein ektopisch exprimiert wurde, keine Auswirkungen auf Wachstum oder Differenzierung hat. Das gleiche gilt für die Expression des Alien/CSN2-GFP-Fusionsproteins, die dank der Fluoreszenz im lebenden Gewebe beobachtet werden konnte (vgl. Kap. 5.4.2, Abb. 5.8). Aufgrund des C-terminalen GFP-Anteils hätte durchaus eine strukturelle Variante des Alien/CSN2-Anteils entstehen können, die mit dem endogenen Alien/CSN2-Protein konkurriert. Die für diesen Fall erwarteten dominant-negativen Effekte konnten jedoch nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die ektopische Expression von Alien/CSN2 keine weiteren Hinweise zur entwicklungsbiologischen Funktion des *alien/CSN2*-Gens liefert.

II. Interaktionsanalyse des Alien/CSN2-Proteins *in vitro*

Da die Versuche, das *alien/CSN2*-Gen zu mutagenisieren oder mittels posttranskriptionellem Gen-Silencing zu phänokopieren, ergebnislos blieben und somit nicht zur Aufklärung der entwicklungsbiologischen Funktion des *alien/CSN2*-Gens in *Drosophila* beitragen konnten, wurde in einem molekularbiologischen Ansatz nach den Wechselwirkungen des Alien/CSN2-Proteins gefragt. Die Identifikation neuer Interaktionspartner sollte Aufschluß darüber geben, an welchen molekularen Prozessen Alien/CSN2 partizipiert.

Das Hefe 2-Hybrid Verfahren ermöglicht sowohl die Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken nach potentiellen Interaktionspartnern als auch die gezielte Analyse der Wechselwirkung zwischen zwei bekannten Proteinen (Chien *et al.*, 1991; Fields & Sternglanz, 1994). Einzige Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist das Vorhandensein codierender cDNAs, die eine effiziente Expression der entsprechenden Genprodukte in *S. cerevisiae* erlauben. Damit stellte das Hefe 2-Hybrid Verfahren ein geeignetes System für die Suche nach direkten Interaktionspartnern von Alien/CSN2 dar und wurde für die Durchmusterung einer embryonalen cDNA-Bibliothek wie auch für die gezielte Interaktionsanalyse angewendet.

5.6 Das Durchmustern einer embryonalen cDNA-Bibliothek liefert 92 potentielle Interaktionspartner für Alien/CSN2

Aufgrund der starken maternalen und zygotischen Expression des *alien/CSN2*-Gens bot sich die Durchmusterung einer embryonalen cDNA-Bibliothek an, die den Entwicklungszeitraum zwischen null und sechs Stunden nach Eiablage abdeckte. Für die Durchmusterung dieser pACT-cDNA-Bibliothek wurde die komplette *alien/CSN2*-cDNA (AS 1-444) durch *EcoRI*-Restriktion aus Klon 327 isoliert und in den Hefe-Expressionsvektor pAS2-1 ligiert (pAS2-1-*alien/CSN2*), so daß ein Fusionsgen entstand, das die konstitutive Expression des Fusionsproteins GAL4-DBD-Alien/CSN2 erlaubte (s. Abb. 5.11). Unter Verwendung des Hefestamms CG1945, der aufgrund eines genomisch integrierten, GAL4-responsiven *HIS3*-Reportergens, eine positive Wachstumsselektion auf Histidin-freiem Medium erlaubt, wurde zunächst getestet, ob GAL4-DBD-Alien/CSN2 autonom das *HIS3*-Reportergen aktivieren kann. Es zeigte sich, daß GAL4-DBD-Alien/CSN2 in Anwesenheit der pACT2-codierten GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) ab einer Konzentration von 1 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) keine autonome Reportergenaktivierung bewirkt.

Zur Durchmusterung der pACT2-cDNA-Bibliothek wurde ausgehend von einer bereits mit dem pAS2-1-*alien/CSN2*-Plasmid transformierten CG1945-Kolonie eine Hefekultur angeimpft, die dann mit den Plasmiden der pACT2-cDNA-Bibliothek kotransformiert wurde. Insgesamt wurden $1,3 \times 10^5$ Kotransformanten auf Histidin-freiem, 1 mM 3-AT-Medium und $1,3 \times 10^5$ Kotransformanten auf Histidin-freiem, 5 mM 3-AT Medium ausplattiert. Auf diese Weise konnten nach der ersten Selektionsrunde 81 Kolonien von den 1 mM 3-AT- und 25 Kolonien von den 5 mM 3-AT-Platten isoliert werden, die daraufhin auf frischen Histidin-freien 1 bzw. 5 mM 3-AT-Platten ausgestrichen wurden. Von den insgesamt 92 Kolonien, die diese zweite Selektionsrunde überstanden, wurden Flüssigkulturen in Leucin-freiem Medium angesetzt, um eine Anreicherung der pACT2-cDNA-Bibliothek-Plasmide zu erreichen. Durch den mangelnden Selektionsdruck auf das pAS2-1-*alien/CSN2*-Plasmid ging dieses während des Wachstums der Flüssigkulturen allmählich verloren. Die aus diesen Flüssigkulturen gewonnene Gesamt-DNA wurde für die Transformation von elektrokompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen verwendet und ermöglichte die Isolierung von insgesamt 92 unabhängigen pACT2-cDNA-Bibliothek-Plasmiden, die zunächst durch *XhoI*-Restriktion verifiziert wurden.

Zur weiteren Analyse wurden die klonierten cDNAs aus den 92 pACT2-cDNA-Bibliothek-Plasmiden unter Verwendung des Oligonukleotids "pACT2-3'AD" vom 3'-Ende her ansequenziert und mit Hilfe des FlyBlast-Programms BLASTN (www.fruitfly.org) identifiziert (s. Tab. 5.I). Die Sequenzanalyse erlaubte bereits, beinahe zwei Drittel der isolierten cDNAs als eindeutig falsch positiv einzustufen. Dazu gehörten in erster Linie cDNAs, die für bekannte Proteine codierten, aber in der falschen Orientierung in den pACT2-Vektor kloniert waren und somit kein entsprechendes GAL4-AD-Fusionsprotein liefern konnten. Für andere cDNA-Fragmente konnte im gesamten *Drosophila*-Genom keinerlei Homologie gefunden werden. Eine andere Fraktion der als falsch positiv eingestuften Klone codierte für mitochondriale bzw. ribosomale Proteine, die in einer Reihe unabhängiger Hefe 2-Hybrid Versuche mit unterschiedlichen Köderproteinen immer wieder isoliert wurden (Auflistung klassischer falsch positiver Beuteproteine unter www.fccc.edu/research/labs/golemis). Das übrige Drittel der insgesamt 92 isolierten Klone stellte zunächst potentielle Alien/CSN2-Interaktionspartner dar. Etwa die Hälfte dieser cDNA-Klone zeigten Sequenzhomologien zu ESTs oder vorhergesagten Genen, die Proteine mit bislang unbekannter Funktion codierten. Diese Klone wurden verwahrt aber keiner weiteren Analyse unterzogen. Von den übrigen 15 cDNA-Klonen wurden die interessantesten Kandidaten ausgewählt und gezielt auf Interaktion mit Alien/CSN2 getestet (s. Kap. 5.7).

Klassifizierung der isolierten Klone	Anzahl der isolierten Klone ($\Sigma = 92$)	Bemerkungen
ribosomale Proteine	7	} 61 % Falschpositive
mitochondriale Proteine	13	
bekannte Proteine, aber in falscher Orientierung	29	
Homologie zu genomischen Sequenzen, aber kein ORF	4	
keinerlei Homologie im <i>Drosophila</i> -Genom	4	
vorhergesagte Gene ohne bekanntes EST	4	CG4537, CG10496, CG15877, CG15896
ESTs mit unbekannter Funktion	16	GHO2289, GHO9031 (×2), GH11085, GMO1350, LPO6868, LD09414, LD12037, LD12131, LD19516, LD24104, LD29292, LD30467, LD33828, SDO2024, SDO5496
Proteasom-Untereinheiten	5	<ul style="list-style-type: none"> • Pros54 (= Rpn10) (*) • p42A (= Rpn7) (*) • p42B (= Rpn6) × 3 (*)
Kinasen	2	<ul style="list-style-type: none"> • Grapes Protein Kinase (*) • p38a MAP-Kinase (Erk2) (*)
Proteinsynthese	2	<ul style="list-style-type: none"> • eIF3p40, Translationsinitiationsfaktor mit MPN-Domäne (*) • eEF2b, Translationselongationsfaktor
Transkriptionsfaktoren	1	<ul style="list-style-type: none"> • dTAF_{II}250, RNA Polymerase II Untereinheit (*)
Andere	5	<ul style="list-style-type: none"> • Protein Phosphatase 2A, Pp2A-29B(*) • RM 62, RNA Helicase • Astray, O-Phosphoserin-Phosphohydrolase • Innexin 3, Strukturprotein • OHO31, Importin

Tab. 5.I Ergebnisse der Sequenzanalyse und Klassifizierung der cDNAs, die als vermeintlich Alien/CSN2-interagierende Klone im Hefe 2-Hybrid Verfahren isoliert wurden. Die Identifizierung der cDNAs erfolgte mit Hilfe des FlyBlast-Programms BLASTN (www.fruitfly.org). 61 % der Kandidaten konnten bereits anhand der Sequenzanalyse als eindeutig falsch positiv eingestuft werden. Von den übrigen potentiellen Alien/CSN2-Interaktionspartnern wurde ein Teil in weiterführenden Untersuchungen getestet (*). Drei unabhängige pACT-cDNA-Bibliothek-Plasmide codierten die Proteasom-Untereinheit Rpn6. Nähere Erläuterungen s. Text. Abk.: EST, expressed sequence tag.

5.7 Drei N-terminal verkürzte Varianten der Proteasom-RP-Untereinheit Rpn6 interagieren mit Alien/CSN2 in der Hefe 2-Hybrid Analyse

Zur Verifizierung der physikalischen Interaktion von Alien/CSN2 mit den isolierten Kandidatenproteinen wurde geprüft, ob diese Interaktionen in einem weiteren, unabhängigen Hefe 2-Hybrid Experiment reproduziert werden konnten. Diese weiterführenden Untersuchungen wurden auf die vielversprechendsten Beuteproteine beschränkt, wobei die Auswahl dieser näher zu untersuchenden Kandidatenproteine nach subjektiven Kriterien erfolgte.

Dabei wurde zum einen der charakterisierten Corepressorfunktion von Alien/CSN2 wie auch der Zugehörigkeit zum Signalosom-Komplex Rechnung getragen. Da der Mechanismus, der der Gen-Silencing-Funktion von Alien/CSN2 unterliegt, bislang unbekannt ist, konnte unter anderem davon ausgegangen werden, daß eine spezifische Wechselwirkung mit der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie ausschlaggebend für die reprimierende Funktion des Alien/CSN2-Proteins sein könnte. Aus diesem Grund wurde dTAF_{II}250, die größte RNA Polymerase II Untereinheit (Kokubo *et al.*, 1993), als vermeintlicher Interaktionspartner favorisiert. Des weiteren wurden die Proteasom-RP-Untereinheiten Rpn6, Rpn7 und Rpn10 (Hözl *et al.*, 2000) und die eIF3p40-Untereinheit des Translationsinitiationskomplexes (Lasko, 2000) aufgrund ihrer PCI-Komplex-Zugehörigkeit in die engere Wahl gezogen. Bereits bekannte Interaktionen zwischen Signalosom- und eIF3-Untereinheiten (Karniol *et al.*, 1998; Yahalom *et al.*, 2001) und Hinweise auf eine Interaktion der Proteasom-RP-Untereinheit Rpn6 mit der Signalosom-Untereinheit CSN1 in *Arabidopsis* (Kwok *et al.*, 1999) ließen vergleichbare Wechselwirkungen der hochkonservierten Komplexe untereinander auch in *Drosophila* vermuten.

Die übrigen Kandidatenproteine wurden aufgrund ihrer Beteiligung an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen und ihres mit Alien/CSN2 überlappenden Expressionsmusters ausgewählt. Dazu gehörte zum einen die regulatorische Untereinheit der Protein Phosphatase 2A (Pp2A-29B), die vornehmlich in proliferativen Geweben exprimiert wird und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Mayer-Jaekel & Hemmings, 1995). Als zwei weitere vielversprechende Kandidatenproteine wurden die Proteinkinasen p38a und Grapes ausgesucht. Während Grapes unter anderem als maternale Komponente die Kernteilungszyklen im syncytialen Blastodermstadium reguliert (Fogarty *et al.*, 1994), wirkt die MAP-Kinase p38a in verschiedenen Signalkaskaden mit, so z. B. bei der Determinierung von Zellschicksalen in Imaginalscheiben, bei der Festlegung von Zellpolaritäten während der Oogenese und im Zuge der Immunantwort (Übersicht in Martin-Blanco, 2000).

Um die direkte Interaktion von Alien/CSN2 mit den genannten Genprodukten bestätigen zu können, wurde das Köderplasmid pAS2-1-*alien/CSN2* mit den einzelnen pACT-Beuteplasmiden

in den Hefestamm SFY526 kotransformiert, der über ein genomisch integriertes *lacZ*-Reporter gen verfügt. Zur Kontrolle wurde jedes Beuteplasmid mit dem leeren pAS2-1-Plasmid kotransformiert. Ausgehend von mindestens sechs unabhängigen Kotransformanten wurde jeweils die relative β -Galaktosidaseaktivität in Flüssigkultur bestimmt.

Auf diese Weise wurde ausschließlich in Kotransformanten, die das pAS2-1-*alien/CSN2*-Köderplasmid und eines der drei *Rpn6*-codierenden pACT-Beuteplasmide enthielten, eine signifikante β -Galaktosidaseaktivität gemessen, die außerdem auch im X-Gal-Overlay-Assay bestätigt werden konnte (Abb. 5.10). Für die übrigen getesteten Genprodukte konnte hingegen keine spezifische *lacZ*-Reporter genexpression nachgewiesen werden. Zwar zeigten Kotransformanten, die das pAS2-1-*alien/CSN2*-Köderplasmid und das pACT-*Pp2A-29B*- bzw. das pACT-*dTAF_{II}250*-Beuteplasmid enthielten, eine messbare β -Galaktosidaseaktivität, welche aber im Vergleich zu den entsprechenden Negativkontrollen nicht signifikant erhöht war und demnach auf eine autonome Reporter genaktivierung zurückgeführt werden mußte.

Die vollständige Sequenzanalyse der drei pACT-*Rpn6*-Beuteplasmide, die ursprünglich als Klone 1-3, 1-6 und 1-8 isoliert worden waren, zeigte, daß es sich um drei partielle cDNAs handelte. Im Vergleich zu der vollständigen *Rpn6*-cDNA (LD18931, BDGP) waren die drei isolierten *Rpn6*-cDNA-Fragmente im 3'-Bereich völlig identisch, im 5'-Bereich jedoch verkürzt. Während die vollständige *Rpn6*-cDNA eine Folge von 422 Aminosäuren codiert, war in den isolierten pACT-*Rpn6*-Klonen der codierende Bereich für die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 84 (Klon 1-3), 1-100 (Klon 1-6) bzw. 1-82 (Klon 1-8) deletiert (Abb. 5.10).

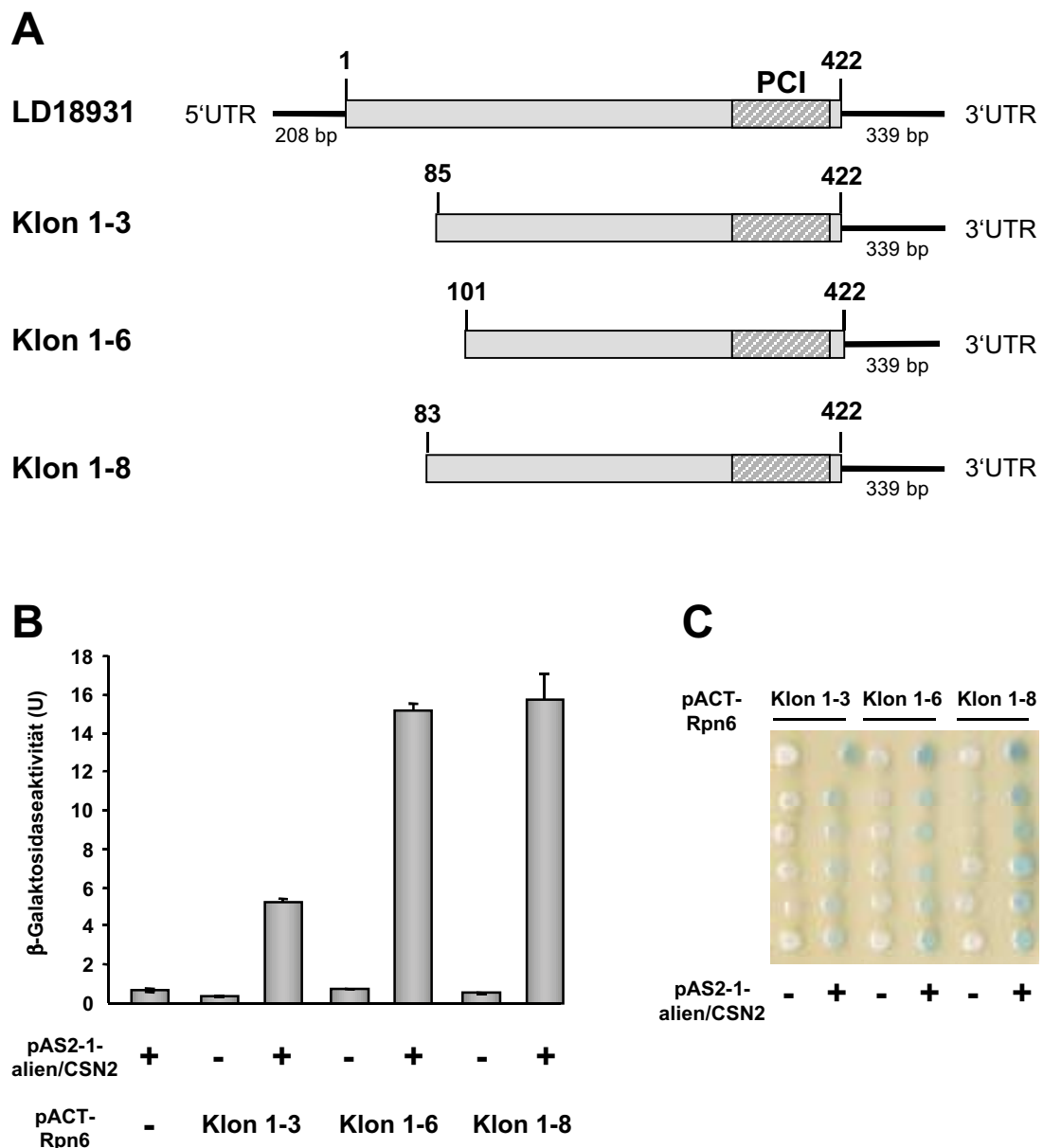


Abb. 5.10 Alien/CSN2 interagiert in der Hefe 2-Hybrid Analyse mit verschiedenen N-terminal verkürzten Rpn6-Varianten. (A) Schematische Darstellung der drei *Rpn6*-cDNAs, die im Zuge des Hefe 2-Hybrid Screens als Alien/CSN2-Interaktionspartner isoliert wurden. Im Vergleich zur vollständigen *Rpn6*-cDNA (LD18931), die sich aus 208 bp 5'UTR, einem 1269 bp ORF und 339 bp 3'UTR zusammensetzt, enthalten die drei pACT-Beuteplasmide Klon 1-3, 1-6 und 1-8 jeweils ein 5'-deletiertes *Rpn6*-cDNA-Fragment. Die von den einzelnen Fragmenten codierten Aminosäuren sind angegeben, und der die PCI-Domäne codierende Bereich ist schraffiert. (B) Die Koexpression von GAL4-DBD-Alien/CSN2 und den drei unvollständigen GAL4-AD-Rpn6-Varianten in der Hefe bewirkt im Vergleich zu den Negativkontrollen eine signifikante *lacZ*-Reportergenaktivierung ($p < 0,01$), die als β -Galaktosidaseaktivität (U) quantifiziert wurde. In den Negativkontrollen wurde jeweils der entsprechende leere Vektor (-) kotransformiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. (C) Die X-Gal-Overlay-Analyse von jeweils sechs unabhängigen Kotransformanten veranschaulicht die bereits in (B) quantifizierte β -Galaktosidaseaktivität bei Koexpression von GAL4-DBD-Alien/CSN2 und einer der drei verkürzten GAL4-AD-Rpn6-Varianten.

5.8 Die PCI-Domäne des Rpn6-Proteins trägt maßgeblich zur Alien/CSN2-Interaktion bei

Zur weiteren Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Alien/CSN2 und Rpn6 wurde zunächst geprüft, ob auch das vollständige Rpn6-Protein (AS 1-422) in der Hefe 2-Hybrid Analyse mit Alien/CSN2 interagiert. Dazu wurde unter Verwendung des genspezifischen, modifizierten Oligonukleotids "Rpn6Del.ATG+EcoRI", des vektorspezifischen Oligonukleotids "T7" und der vollständigen *Rpn6*-cDNA (LD18931) als Matrize, der komplette ORF und die 3'UTR amplifiziert, wobei das Startcodon ATG durch GTG und somit Methionin durch Valin ersetzt wurde. Dieses Fragment wurde zunächst in pCR-Blunt vorkloniert ("pCR-Blunt-Rpn6Del.ATG") und schließlich nach *EcoRI/XhoI*-Restriktion in den Vektor pACT2 ligiert, so daß ein *GAL4-AD-Rpn6*-Fusionsgen entstand ("pACT2-*Rpn6*"). Die Kotransformation dieses Konstrukts mit pAS2-1-*alien/CSN2* in SFY526-Hefezellen zeigte, daß auch das vollständige Rpn6-Protein mit Alien/CSN2 in der Hefe 2-Hybrid Analyse interagiert (Abb. 5.11).

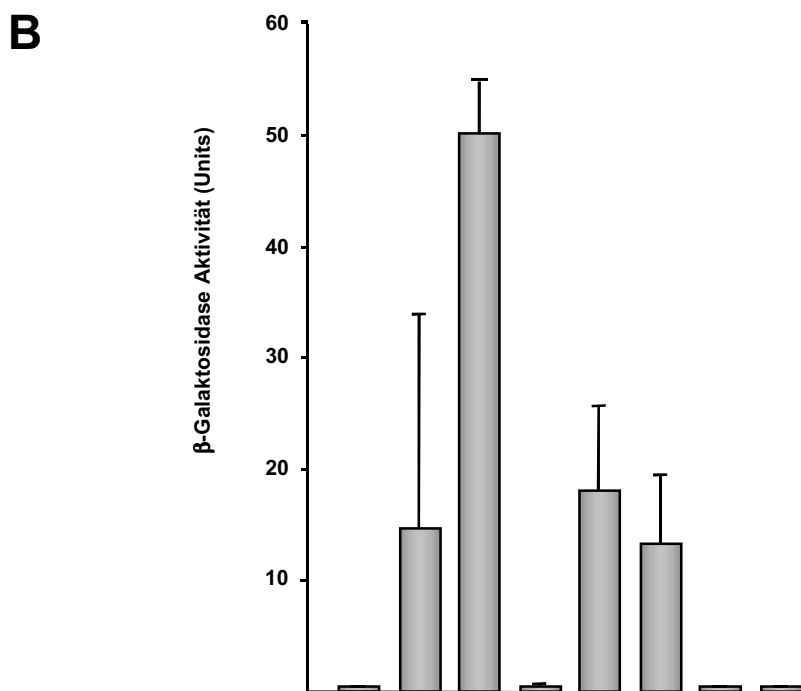
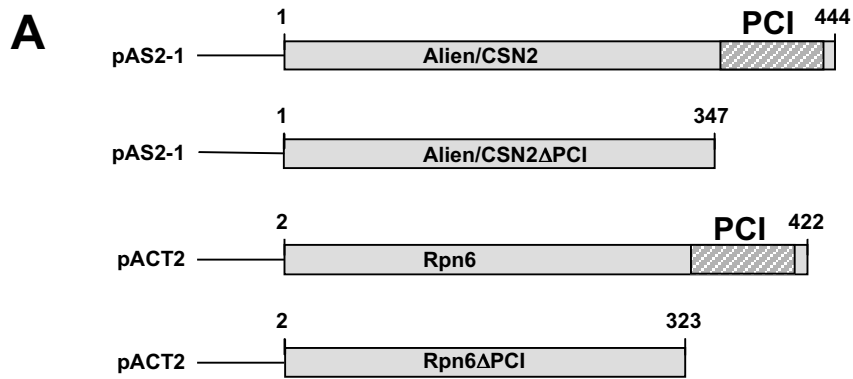
Aufgrund der im Zuge des Hefe 2-Hybrid Screens isolierten N-terminal deletierten Rpn6-Varianten war zu vermuten, daß vornehmlich die C-terminale Hälfte von Rpn6 zur Interaktion mit Alien/CSN2 beiträgt. Der C-Terminus von Rpn6 wie auch von Alien/CSN2 ist insbesondere durch das Vorhandensein einer PCI-Domäne charakterisiert (siehe auch Kap. 5.11). Für einige Proteasom-RP- und Signalosom-Untereinheiten konnte bereits gezeigt werden, daß die PCI-Domäne für die Inkorporierung der jeweiligen Untereinheit in den RP- bzw. in den Signalosom-Komplex verantwortlich ist (Fu *et al.*, 2001; Tsuge *et al.*, 2001).

Zur Klärung der Frage, inwiefern die PCI-Domänen von Rpn6 und Alien/CSN2 deren gegenseitige physikalische Interaktion beeinflussen, wurden die PCI-Domänen deletiert (Δ PCI) und diese verkürzten Proteine in der Hefe 2-Hybrid Analyse eingesetzt. Zur Expression eines *GAL4-AD-Rpn6* Δ PCI-Proteins wurde unter Verwendung der genspezifischen Oligonukleotide "Rpn6Del.ATG+EcoRI" (s.o.) und "Del.PCI-Rpn6" und der vollständigen *Rpn6*-cDNA (LD18931) als Matrize ein Fragment amplifiziert, das für die Aminosäuren 2-323 codierte. Nach der Vorklonierung in pCR-Blunt wurde das Fragment nach *EcoRI/XhoI*-Restriktion in den Vektor pACT2 ligiert, so daß ein *GAL4-AD-Rpn6* Δ PCI-Fusionsgen entstand ("pACT2-*Rpn6* Δ PCI"). Parallel wurde ein entsprechendes *alien/CSN2* Δ PCI-Fragment durch Einsatz des genspezifischen Oligonukleotids "Del.PCI-*alien*", des vektorspezifischen Oligonukleotids "T7" und der kompletten *alien/CSN2*-cDNA (Klon 327) als Template hergestellt. Nach der Vorklonierung in pCR-Blunt wurde das Fragment nach *EcoRI*-Restriktion in den Vektor pAS2-1

ligiert, so daß ein GAL4-DBD-Alien/CSN2 Δ PCI-Fusionsprotein exprimiert werden konnte, das die Aminosäuren 1-347 von Alien/CSN2 enthielt (Abb. 5.11).

Alien/CSN2 Δ PCI und Rpn6 Δ PCI wurden miteinander bzw. zusammen mit dem jeweils korrespondierenden vollständigen Partnerprotein in SFY526-Hefezellen exprimiert (Abb. 5.11). Durch den Vergleich der β -Galaktosidaseaktivität wird deutlich, daß die Deletion der PCI-Domäne von Rpn6 einen völligen Verlust der Interaktion mit Alien/CSN2 bewirkt. Daraus kann geschlossen werden, daß der die PCI-Domäne einschließende C-Terminus von Rpn6 essentiell ist für die Interaktion mit Alien/CSN2.

Das reziproke Experiment mit Alien/CSN2 Δ PCI konnte hingegen keine eindeutigen Hinweise auf die Funktionalität der PCI-Domäne von Alien/CSN2 liefern, da die Expression von GAL4-DBD-Alien/CSN2 Δ PCI eine starke, autonome Reporteragenaktivierung bewirkte. Zwar ist die mittlere β -Galaktosidaseaktivität in Kotransformanten, die Rpn6 und Alien/CSN2 Δ PCI koexprimieren, gegenüber der Alien/CSN2 Δ PCI-Negativkontrolle nur unwesentlich erhöht, so daß der Schluß nahe liegt, daß auch in diesem Fall keine signifikante Interaktion mehr stattfindet. Dennoch sollte diese Beobachtung eher als vorläufiges Indiz denn als deutliches Resultat beurteilt werden, da, wie die starken Standardabweichungen zeigen, die β -Galaktosidaseaktivität in Alien/CSN2 Δ PCI-Transformanten durchgehend starken Schwankungen unterlag. Die Frage nach der Relevanz der PCI-Domäne von Alien/CSN2 für die physikalische Interaktion mit Rpn6 kann demnach nicht zweifelsfrei beantwortet werden.



pAS2-1	Alien/CSN2	+		+	+			
	Alien/CSN2ΔPCI		+			+	+	
pACT2	Rpn6			+		+		+
	Rpn6ΔPCI				+		+	+

Abb. 5.11 Die PCI-Domäne von Rpn6 bewirkt die Interaktion mit Alien/CSN2 in der Hefe 2-Hybrid Analyse. (A) Schematische Darstellung der Hefe 2-Hybrid-Expressionskonstrukte, die für die kompletten und die deletierten Alien/CSN2- bzw. Rpn6-Proteine codieren. Angegeben sind die codierten Aminosäuren, die PCI-Domänen sind schraffiert. **(B)** Koexpression der Alien/CSN2- und Rpn6-Proteine in SFY526-Hefezellen. Die Deletion der PCI-Domäne von Rpn6 bewirkt den Verlust der Interaktion mit Alien/CSN2. Die Expression von Alien/CSN2ΔPCI verursacht eine variable, autonome *lacZ*-Reportergenexpression. In den Negativkontrollen wurde jedes Protein in Anwesenheit des entsprechenden leeren Partnervektors exprimiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

5.9 *in vitro*-exprimiertes Rpn6 bzw. Rpn6 Δ PCI bindet an ein GST-Alien/CSN2- bzw. GST-Alien/CSN2 Δ PCI-Fusionsprotein

Um die physikalische Assoziation von Alien/CSN2 und Rpn6 in einem weiteren, unabhängigen experimentellen Ansatz zu bestätigen, wurde Glutathion-Sepharose-gekoppeltes GST-Alien/CSN2 bzw. GST-Alien/CSN2 Δ PCI mit *in vitro*-exprimiertem, radioaktiv markiertem Rpn6 bzw. Rpn6 Δ PCI inkubiert. Für die bakterielle Expression der GST-Alien/CSN2-Fusionsproteine wurde zum einen die vollständige *alien/CSN2*-cDNA aus Klon 327 und zum anderen das *alien/CSN2 Δ PCI*-Fragment aus pCR-Blunt nach *EcoRI*-Restriktion in den pGEX-1-Vektor ligiert, so daß ein *GST-alien/CSN2*- bzw. ein *GST-alien/CSN2 Δ PCI*-Fusionsgen entstand. Zur Expression von Rpn6 und Rpn6 Δ PCI im Retikulocyten-Lysat wurden das Plasmid LD18931 (pBluescript) und das Fragment *Rpn6 Δ PCI* (pCR-Blunt) als Matrizen eingesetzt.

Nach Normalisierung der GST-Fusionsproteine und des unfusionierten GST-Proteins durch SDS-PAGE wurden die Proteine in gleichen Mengen an Glutathion-Sepharose-Kügelchen gebunden und mit jeweils 5 μ l *in vitro*-Translat inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Rpn6-Proteine autoradiographisch nachgewiesen (Abb. 5.12).

Anhand der Autoradiographie wird deutlich, daß *in vitro*-exprimiertes Rpn6 und Rpn6 Δ PCI gleichermaßen an GST-Alien/CSN2 und außerdem an GST-Alien/CSN2 Δ PCI binden. Da freies GST Rpn6 überhaupt nicht bindet, kann gefolgert werden, daß Alien/CSN2 und Alien/CSN2 Δ PCI spezifisch mit Rpn6 interagieren. Neben der Bande bei etwa 47 kDa, die hinsichtlich der Molekulargröße dem Signal der Input-Spur entspricht, erscheint des weiteren eine Zusatzbande bei ca. 36 kDa. Da dieses Signal weder in der Input-Spur noch nach Inkubation mit freiem GST auftaucht, handelt es sich dabei offensichtlich um ein spezifisches Reaktionsprodukt, das möglicherweise durch die Alien/CSN2-Rpn6-Interaktion entsteht.

Rpn6 Δ PCI, das im Retikulocytenlysate wesentlich effizienter exprimiert wurde als Rpn6, weist hingegen eine schwache Affinität zu GST auf. Im quantitativen Vergleich zu den beträchtlichen Rpn6 Δ PCI-Proteinmengen, die von den GST-Alien/CSN2-Proteinen gebunden werden, erweist sich dieser Anteil allerdings als unbedeutend. Daher muß auch für Rpn6 Δ PCI festgestellt werden, daß trotz Deletion der PCI-Domäne eine spezifische Interaktion mit Alien/CSN2 und Alien/CSN2 Δ PCI stattfindet. Vergleicht man die Mengen von gebundenem Protein mit der *in vitro*-Translat-Referenz in der Input-Spur, scheint Rpn6 Δ PCI sogar effizienter an GST-Alien/CSN2 und GST-Alien/CSN2 Δ PCI zu binden als Rpn6.

Diesen GST-Pulldown-Experimenten zufolge interagieren Alien/CSN2 und Rpn6 spezifisch miteinander, womit die wechselseitige Affinität der beiden Proteine, die bereits in der Hefe 2-Hybrid Analyse detektiert wurde, bestätigt werden konnte. Allerdings lieferte dieser experimentelle Ansatz keine weiteren Hinweise auf eine Notwendigkeit der PCI-Domänen. Während insbesondere Rpn6 nach Deletion der PCI-Domäne in der Hefe 2-Hybrid Analyse keine Interaktion mehr mit Alien/CSN2 zeigt, ist die PCI-Domäne für die Assoziation im GST-Pulldown-Experiment durchaus entbehrlich.

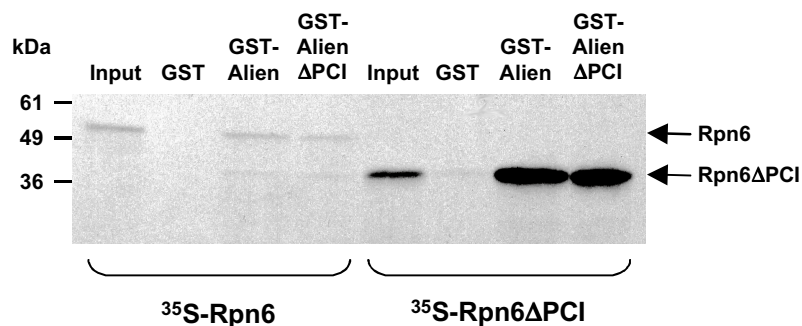


Abb. 5.12 *in vitro*-exprimiertes Rpn6 und Alien/CSN2 interagieren im GST-Pulldown-Experiment unabhängig von den PCI-Domänen. Autoradiographie zum Nachweis der ^{35}S -markierten Rpn6- bzw. Rpn6 Δ PCI-Proteine. GST-Alien/CSN2 und GST-Alien/CSN2 Δ PCI (Abk. Alien) binden Rpn6 und Rpn6 Δ PCI spezifisch, freies GST-Protein hingegen nicht. In der Input-Spur wurde jeweils 1/10 VT des *in vitro*-Translationsansatz-Volumens, das für die Inkubation eingesetzt wurde, aufgetrennt. Größenstandard: Benchmark Prestained Protein Ladder (Gibco). Nähere Erläuterungen s. Text.

5.10 Die Hefe 2-Hybrid Analyse liefert keine Hinweise auf eine Interaktion von Alien/CSN2 mit α Ftz-F1, β Ftz-F1 oder *Drosophila* p53

Um weitere Anhaltspunkte für die Beteiligung von Alien/CSN2 an entwicklungsbiologisch relevanten Prozessen zu gewinnen, wurden drei Kandidatenproteine, nämlich α Ftz-F1, β Ftz-F1 und Dmp53 getestet, für die aus verschiedenen Gründen eine Interaktion mit Alien/CSN2 postuliert werden konnte.

Das *Drosophila Ftz-F1*-Gen codiert die zwei Isoformen α Ftz-F1 und β Ftz-F1, die beide zur Superfamilie der Kernhormonrezeptoren gehören. Während α Ftz-F1 vornehmlich maternal und früh embryonal exprimiert wird und als Cofaktor von Fushi tarazu (Ftz) eine Rolle bei der

Segmentierung spielt, wird β Ftz-F1 erst gegen Ende der Embryogenese und während der Metamorphose exprimiert, wobei es an der Regulation der Ecdyson-induzierten Genkaskade beteiligt ist (Yu *et al.*, 1997; Broadus *et al.*, 1999). Im Zuge der funktionellen Charakterisierung von Alien als Corepressor mit Spezifität für verschiedene Kernhormonrezeptoren konnten Dressel *et al.* (1999) in einem GST-Pulldown-Experiment zeigen, daß ein GST-Alien-Fusionsprotein *in vitro*-exprimiertes α Ftz-F1 bindet. Da zum damaligen Zeitpunkt nur eine partielle *alien/CSN2*-cDNA zur Verfügung stand, die ein C-terminal verkürztes Alien/CSN2-Protein (AS 1-360) codierte, sollte die Interaktion von α Ftz-F1 und überdies von β Ftz-F1 nun mit dem vollständigen Alien/CSN2-Protein in der Hefe 2-Hybrid Analyse bestätigt werden. Dazu wurden α Ftz-F1 bzw. β Ftz-F1 als GAL4-AD-Fusionsproteine mit GAL4-DBD-Alien/CSN2 in SFY526-Hefezellen koexprimiert und die β -Galaktosidaseaktivität der Kotransformanten bestimmt. Weder für α Ftz-F1 noch für β Ftz-F1 konnte jedoch eine Interaktion mit Alien/CSN2 in der Hefe 2-Hybrid Analyse nachgewiesen werden.

Die Vermutung, daß Alien/CSN2 mit *Drosophila* p53 (Dmp53) interagieren könnte, stützte sich auf die Beobachtungen von Bech-Otschir *et al.* (2001), denen zufolge der humane Signalosom-Komplex p53 bindet und spezifisch phosphoryliert. Diese Signalosom-abhängige Phosphorylierung von p53 bewirkt, daß p53 einem raschen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt wird und repräsentiert somit eine wichtige Alternative zum MDM2-abhängigen p53-Degradationsmechanismus. Zwar wurde in Far-Western Blot-Experimenten CSN5/Jab1 als diejenige Signalosom-Untereinheit identifiziert, die die größte Affinität zu p53 zeigt, dennoch ist ebenso, wenn auch mit geringerer Intensität, eine Bindung von p53 an CSN2 zu erkennen (Fig. 3A in Bech-Otschir *et al.*, 2001).

Dmp53 ist im Vergleich zu p53 aus Vertebraten strukturell und auch funktionell hochkonserviert (Brodsky *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2000; Ollmann *et al.*, 2000). Der augenscheinlichste strukturelle Unterschied ist innerhalb der in Vertebraten p53-Proteinen hochkonservierten MDM2-interagierenden Region zu finden. Da im gesamten *Drosophila*-Genom bislang kein MDM2-Homolog identifiziert werden konnte, muß davon ausgegangen werden, daß in *Drosophila* bevorzugt andere Mechanismen für die Regulation der Proteinstabilität von Dmp53 verantwortlich sind, so z. B. die Signalosom-abhängige Phosphorylierung.

Auf der Grundlage der genannten Erkenntnisse wurde geprüft, ob Dmp53 mit Alien/CSN2 physikalisch interagiert. Zunächst wurde getestet, ob *in vitro*-exprimiertes Dmp53 an ein GST-Alien/CSN2-Fusionsprotein bindet. Dazu wurde das Dmp53-Protein ausgehend von der vollständigen cDNA in pRc/CMV und unter Verwendung der T7-Polymerase im

Retikuloctenlysat exprimiert und radioaktiv markiert und schließlich mit Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-Alien/CSN2 inkubiert. Die Autoradiographie zum Nachweis von ^{35}S -markiertem Dmp53 zeigt, daß Dmp53 spezifisch an Alien/CSN2 bindet (Abb. 5.13).

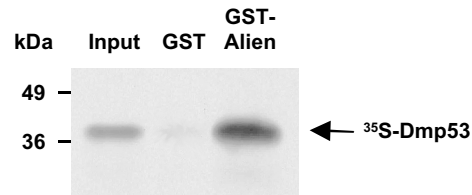


Abb. 5.13 *in vitro*-exprimiertes Dmp53 bindet an Alien/CSN2 im GST-Pulldown-Experiment. Autoradiographie zum Nachweis des ^{35}S -markierten Dmp53-Proteins. GST-Alien/CSN2 (Abk. Alien) bindet Dmp53 spezifisch, freies GST-Protein hingegen nicht. In der Input-Spur wurde 1/10 VT des *in vitro*-Translationsansatz-Volumens, das für die Inkubation eingesetzt wurde, aufgetrennt. Größenstandard: Benchmark Prestained Protein Ladder (Gibco).

Mit dem Ziel diese Wechselwirkung in der Hefe 2-Hybrid Analyse zu bestätigen, wurde die vollständige *Dmp53*-cDNA mit den modifizierten, genspezifischen Oligonukleotiden "5'p53Del.ATG" und "3'p53art.XhoI" amplifiziert, in pCR-Blunt vorkloniert und nach *EcoRI/XhoI*-Restriktion in pACT2 ligiert. Die Koexpression von GAL4-AD-Dmp53 und GAL4-DBD-Alien/CSN2 in SFY526-Hefezellen verursachte jedoch keine messbare β -Galaktosidase-Reporteraktivität, so daß die im GST-Pulldown-Experiment gezeigte Dmp53-Alien/CSN2-Interaktion in der Hefe 2-Hybrid-Analyse nicht reproduziert werden konnte.

III. Molekulare und funktionelle Analyse der 19S RP Proteasom-Untereinheit Rpn6

Die Identifikation der Proteasom-Untereinheit Rpn6 als Interaktionspartner von Alien/CSN2 warf die Frage nach der entwicklungsbiologischen Relevanz des *Rpn6*-Gens auf. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß bislang keine der acht Untereinheiten des Deckelkomplexes des 19S regulatorischen Proteasompartikels unter diesem Gesichtspunkt analysiert wurde, konnte erwartet werden, daß die Analyse des *Rpn6*-Expressionsmusters und die Charakterisierung einer *Rpn6*-spezifischen P-Element-Insertionsmutante grundlegende Hinweise auf die Funktion des Deckelkomplexes während der Entwicklung von *Drosophila* liefern würde.

5.11 Die 19S RP-Deckelkomplex-Untereinheit Rpn6 ist evolutionär hochkonserviert und ähnelt der Signalosom-Untereinheit Alien/CSN2

Das Rpn6-Protein, das auch unter dem Namen p42B bekannt ist, wurde in biochemischen Untersuchungen als integrale Komponente des Deckelkomplexes des 19S regulatorischen Proteasompartikels in *Drosophila* identifiziert (Haracska & Udvardy, 1996; Hölzl *et al.*, 2000). Die von der embryonalen *Rpn6*-cDNA LD18931 codierte Folge von 422 Aminosäuren ist identisch zur p42B-Proteinsequenz (Hölzl *et al.*, 2000).

Um eine Aussage über die evolutionäre Konservierung des Rpn6-Proteins treffen zu können, wurde die vollständige Rpn6-Proteinsequenz zur Suche nach homologen Proteinen in der GenBank-Datenbank verwendet (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Die Abfrage mit Hilfe des Suchprogramms BLASTP lieferte mehrere Proteine aus verschiedenen Organismen, die signifikante Sequenzähnlichkeiten zu *Drosophila* Rpn6 aufwiesen. Der multiple Sequenzabgleich mittels des Alignment-Programms ClustalX zeigt, daß alle getesteten Proteine über ihre gesamte Länge große Ähnlichkeiten aufweisen (Abb 5.14 A). Dabei wird deutlich, daß *Drosophila* Rpn6 der humanen 26S Proteasom-Untereinheit p44.5 mit 67 % Sequenzidentität am nächsten steht (Saito *et al.*, 1997). Weitere Proteine, wie das vorhergesagte Protein F57B9.10 aus *C. elegans* (GenBank Nr. NP498517) mit 53 % Sequenzidentität und die 19S Proteasom-Untereinheit 9 (AtS9) aus *Arabidopsis* mit 50 % Sequenzidentität (Kwok *et al.*, 1999), zeigen ebenfalls einen hohen Grad an Übereinstimmung zu *Drosophila* Rpn6. Auch Hefe-Proteine, nämlich das vorhergesagte Protein T50185 aus *S. pombe* mit 53 % Sequenzidentität und das Rpn6-Protein aus *S. cerevisiae* mit 44 % Sequenzidentität (Saito *et al.*, 1997; Glickman *et al.*, 1998b), zeichnen sich durch eine beachtliche Ähnlichkeit mit *Drosophila* Rpn6 aus.

Für alle der genannten Proteine wurde durch Abfrage der Protein-Datenbank Pfam im C-terminalen Bereich eine PCI-Domäne vorhergesagt, die jeweils ca. 80 Aminosäuren umfaßt (*Pfam database of protein domains and HMMs*; www.pfam.wustl.edu; Bateman *et al.*, 1999). Im multiplen Sequenzvergleich werden die PCI-Domänen der verschiedenen Rpn6-Proteine absolut deckungsgleich gruppiert, wobei in allen Fällen ein konservierter Histidin-Rest den N-terminalen und ein konservierter Leucin-Rest den C-terminalen Abschluß der PCI-Domäne markiert.

Außerdem wurde mit Hilfe des FlyBlast-Programms BLASTP das gesamte verfügbare *Drosophila*-Proteom nach *Drosophila* Rpn6-ähnlichen Proteinen durchmustert. Dabei stellte sich heraus, daß Alien/CSN2 die signifikanteste Übereinstimmung mit Rpn6 aufweist. Während die Sequenzähnlichkeiten anderer Proteasom-RP- und Signalosom-Untereinheiten, die im Suchergebnis erschienen, auf die PCI-Domäne beschränkt bleiben, zeigen Alien/CSN2 und Rpn6 eine 20%ige Sequenzidentität über die gesamte Länge der beiden Proteine (Abb. 5.14 B). In diesem Zusammenhang gewinnt die diskutierte Hypothese, daß der Proteasom-RP-Deckel- und der Signalosom-Komplex von einem gemeinsamen Vorläufer-Komplex abstammen, an Plausibilität. Aufgrund der relativ hohen Sequenzübereinstimmungen von *Drosophila* Rpn6 und Alien/CSN2 können die beiden Proteine durchaus als Paraloge klassifiziert werden.

A

Dm-Rpn6	1	-----MAGATLIFERACALSSVNRREEQDSSLLNKLVDRDQEG-----	AEENDEERIRIKECCGLQQ	53
Hs-p44.5	1	-----MAAAVVEFORAQSLLSIREASIDILHSIVKRDIQ-----	ENDEEAVQVKCECSILEL	53
Ce-F57B9.10	1	MRETSSTRREDTNNIGKAPEMSGCITMDTMTSLPHCNDQNVIRHLTNLVKSPAS-----	GDDDKKKECSIMEL	67
At-S9	1	-----MVSYRATTEITISLALEANSSEAITILYQVLEDPSS-----	SPEARIRIKEQAITNL	50
Sp-T50185	1	-----MSKSSLELANAVKSNDEKAIIDLYKEVLNK-----	GVSXDEKAVNEEQEQAILT	51
Sc-Rpn6	1	-----MSLPGSKLEEARLVNEKQYNEAEQVYLSLDDKSSQSSAAAASVDDKRRNEQETSILEL		61
Dm-Rpn6	54	GE L Y K Q E G K A K E L A D L I K V T R P F F L S S I S K A K A A K L V R S L V D M F L D M D A G T G - I E V Q L C K D C I E W A K Q E K R T F L R Q S L		129
Hs-p44.5	54	GS L L A K T G C A A E L G G L I K Y V R F F L N S I S K A K A A R L V R S L L D L F L D M E A A T G - C E V E L G L E C I E W A K S E K R T F L R Q A L		129
Ce-F57B9.10	68	GN I L A Q N K Q T E E L R N M I E Q T R P F L V S L C K A K A A K L V R D L V D L C L K I D D O D G D I K V G L V K E C I O W A T E Q N R T F L R Q T L		144
At-S9	51	C D R L T E E K R G E D L R K L L T K L R F F F S L I P K A K T A K I V R R I D A V A K I P G T T D - L C I T L C K E M V E W T R A E K R T F I R Q R V		126
Sp-T50185	52	S D L Y V R E N R H N D L A C L V Q Q S R F L M A N F S K A K S A K I V R T L I D K F S G E K K S L P - L C I E V A N D C I K W A I K E K R T F L R Q A L		127
Sc-Rpn6	62	G Q L Y V T M G A K D K L R E F I P H S T E Y M M Q F A K S K T V K V L K T L I E K F E Q V P D S L D - D C I F V G E K S I E F A K R E K R V F L K H S L		137
Dm-Rpn6	130	E A R I I A L Y F D T A L Y T E A L A L G A C L L R E L K K L D D K N L I V E V C L I E S K T Y H A L S N L P K A R A A L T S A R T A N A I Y C P P K V		206
Hs-p44.5	130	E A R I V S L Y F C T K R Y C E A L H L G S C L L R E L K K M D D K A L I V E V C L I E S K T Y H A L S N L P K A R A A L T S A R T A N A I Y C P P K L		206
Ce-F57B9.10	145	T A R L V R L Y N D L Q R Y T G A L P L A A D L I R E L K K V D D K V I V E V L E E S K A Y Y N L S N I G R A R A S L T G A R T A N A I Y V N P R M		221
At-S9	127	E A R L A A L L N E K E Y V E A L A L L S T L V K E V R R L D D K L L I V D I D L E S K L H F S L R N L P K A K A A L T A A R T A N A I Y V P P A Q		203
Sp-T50185	128	E T K L I S L Y Y D N S S Y T D A I N L I N T L L S E L K R M D D K M L L T V E H L L E S K V Y H A L R N I P K A R A S L T A A K T A N A V Y C P P M L		204
Sc-Rpn6	138	S I K L A T L H Y Q K Q Y K D S L A L I N D L R E F F K L D D D K P S L V D V H L I E S K V Y H K L R N L A K S K A S L T A A R T A N S I Y C P T Q T		214
Dm-Rpn6	207	O G A I D L Q S C I L H A A D E R D F K T A F S Y F Y E A F E G F D S V D S - - - V K A L T S L K Y M L L C K I M I G Q S D D V N - - Q L V S G K L A I		277
Hs-p44.5	207	Q A T I D M Q S C I I H A A E E K D W K T A Y S Y F Y E A F E G Y D S I D S - - - P K A I T S L K Y M L L C K I M L N T P E D V Q - - A L V S G K L A L		277
Ce-F57B9.10	222	Q A A I D L Q S C I L H A A D E K F K T A F S Y F Y E A F E G Y D S V D E K - - - V S A L T A L K Y M L L C K V M L D I P D E V N - - S L L S A K L A L		293
At-S9	204	O G T I D L Q S C I L H A E - E K D Y K T G S Y F F E A F E S F N A L G D - - - P R A V F S L K Y M L L C K I M V S Q A D D V A G N N L L K G - - - W		272
Sp-T50185	205	Q G N I D L Q S C I L H A D - D M D F K T A Y S Y F Y E A Y E G F T S L D D D - - - K K A L S S L K Y M L L S Q I M L N S V E V K - - S L L T G K H A I		275
Sc-Rpn6	215	V A E I D L M S G I L H C E - C K D Y K T A F S Y F F E S F E S Y H N L T T H N S Y E K A C Q V L K Y M L L S K I M L N L I D D V K - - N I L N A K Y T K		288
Dm-Rpn6	278	T - Y S G R D I C A M K S V A E A S H K R S L A D F O A A K E Y K K E L A E D V I V O A H L G T L Y D T M L E Q N L C R I I E P Y S R V Q V A H V A E S		353
Hs-p44.5	278	R - Y A G R Q T E A L K C V A C A S K N R S L A D F E K A L T D Y R A E L R D D P I I S T H L A K L Y D N L E Q N L I R V I E P F S R V Q I E H I S S L		353
Ce-F57B9.10	294	K - Y N G S D L C A M K A I A A A A Q K R S L K D F O V A F G S F P C E L Q M D P V V R K H F H S L S E R M L E K D L C R I I E P Y S F V Q I E H V A A Q		369
At-S9	273	T - T V G P D L C A M K A V A C A H S K R S L K L F E N A L R D Y K A O L E D D P I V H R L S S L Y D T L E Q N L C R I I E P F S R V E I A H I A E L		348
Sp-T50185	276	R - Y A G R D I E A M R A I A C A H E N R S L A D F E K A L O D Y K P E L A S D P I I R S H L S S L Y D N L E Q N L L R V I E P F S R V E V S H I A E L		351
Sc-Rpn6	289	E T Y C S R G I C A M K A V A E A Y N N R S L I D F N T A L K Q Y E K L M G D E L T R S H F N A L Y D T L L E S N L C K I I E P F E C V E I S H I S K L		365
Dm-Rpn6	354	I O I P M P O V F K K I S Q M I I D K K F S G I I D O G E G V I I V F F E T P V D K T Y E R V L E T I Q S M G K V V D T L Y Q A K A K K I S		422
Hs-p44.5	354	I K I S K A D V F R K I S Q M I I D K K F F G I I D O G E G V I I I F D E P P V D K T Y F A A I F T I O N M S K V V C S I Y N - K A K K I T		422
Ce-F57B9.10	370	I G I D R S K V F K K I S Q M I I D O K I S G S I D O G E G M I I V F F I A V P R E A Y Q T A I D T I H A M G V V D A I Y S - N A S K I N		438
At-S9	349	I G I P L D H V F K K I S Q M I I D K K F A G T I D O G A G C I I I F F D P K A D A I Y S A I F T I A N M G K V V C S I Y V - P V Q N H V P E K		421
Sp-T50185	352	I G I S T V O V F C K I S Q M I I D K I F Y C I I D O G S G C I I V Y D E P Q C R K T Y F A A I F V I K N M G T V V D L I I F N K A S A I I		421
Sc-Rpn6	366	I G L D T Q Q V E C K I S Q M I I D K I F Y C V L D Q C G W L Y V Y E T P N C D A T Y D S A L E L V G Q L N K V V D C L F E - K A S V L Y		434

B

Dm-Rpn6	1	-----MAGATLIFERAQALSSVNRREEQDSSLLNKLVDRDQEGAENDEERIRIKECCGLQQEGLYKQEGKAKE LADLI		70
Dm-CSN2	1	MSDNDDDDFMCDDEDEYGLEYSSEDSNSEPDVCLFNQYVNSKALKKEEPAKAAASAFQKVLDELNGEKGEWGFKALKQM		77
Dm-Rpn6	71	KVTR-----PFLSSISKAKAAKLVRSLVDMFLDMDAGTG---IEVQLCKDCIEWAKQEKRTFLRQSL		131
Dm-CSN2	78	KINFRLCNYDEMMRYKCLLTYIKSAVTRNHSEKINSILDYISISKNMALQNFYEITLDA LRDAKNDRLWFKIN		154
Dm-Rpn6	132	R L I A L Y F D T A L Y T E A L A L G A Q L L R E I K K L D C K N - - - - L L V E V Q L L E S K T Y H A L S N L P K A R A A L T S A R T A N A I Y C		202
Dm-CSN2	155	K L G K L Y F D R S D F T K L Q K I L K Q L H Q S C Q T D D G E D D L K K G T O L L E I Y A L E I Q M Y T V Q K N N K L K A L N I A I P H		231
Dm-Rpn6	203	P P K V C G A L D L C S G I L H A A D E R D F K T A F S Y F Y E A F E G F D S V D S V K A L T S L K Y M L L C K I M L G C S D D V N Q L V S G K L A I T Y		279
Dm-CSN2	232	P - L I N G V I R E C G G K M H L R - E G E F E K A H T D F F E A F K N Y D E S G S P R R T T C L K Y L V L A N M L M K S G - - I N P F D S Q E A K P Y K		304
Dm-Rpn6	280	S G R D I C A M K S V A E A S H K R S L A D F O A A K E Y K K E L A E D V I V O A H L G T L Y D T M L E Q N L C R I I E P Y S R V Q V A H V A E S I O L		356
Dm-CSN2	305	N D P E I L A M T N L V N S Y Q N N D I N E F E T I L R Q H R S N I M A D Q F L R E H I E D L L R N I R T Q V L K I R P Y K N I A I P I A N A I N I		381
Dm-Rpn6	357	P M P O V E K K L S C M I I D K K F S G I L D Q C E G V L I V F E E T P V D K T Y E R V L E T I Q S M G K V V D T L Y Q A K A K L S		422
Dm-CSN2	382	E P A E V E S L L V S C I L D D T I K G R I D Q V N Q V L C L D K I N S S A S R Y N A L E K W S N Q I Q S L Q F A V V Q K M A		444

Abb. 5.14 Rpn6 ist evolutionär hochkonserviert und weist Sequenzähnlichkeiten zu Alien/CSN2 auf. (A) Multipler Sequenzvergleich verschiedener Rpn6-Proteine mit Hilfe des Alignment-Programms ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Identische und ähnliche Aminosäurereste wurden anhand des SeqVu 1.0.1 Programms (Garvan Institute for Medical Research, Sydney, Australien) unter Verwendung der Kyte-Doolittle-Parameter ermittelt und sind grau unterlegt. Die kongruenten PCI-Domänen, die N-terminal von einem konservierten Histidin- und C-terminal von einem konservierten Leucin-Rest flankiert werden, (Pfeilspitzen) sind unterstrichen. *Drosophila melanogaster* (Dm), *Homo sapiens* (Hs), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Arabidopsis thaliana* (At), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). **(B)** Sequenzvergleich von *Drosophila* Rpn6 und *Drosophila* Alien/CSN2 unter Zuhilfenahme der gleichen Parameter wie in (A). Identische und ähnliche Aminosäurereste sind grau unterlegt, die deckungsgleichen PCI-Domänen sind unterstrichen.

5.12 Das *Rpn6*-Expressionsmuster überlappt mit *alien/CSN2*

Die in *in vitro*-Experimenten gezeigte physikalische Interaktion von Rpn6 und Alien/CSN2 lieferte erste Anhaltspunkte für eine direkte Wechselwirkung der beiden Proteine in *Drosophila*. Für ein funktionelles Zusammenspiel *in vivo* muß außerdem ein zumindest teilweise überlappendes Expressionsmuster der beiden Genprodukte erwartet werden. Da es sich in beiden Fällen um intrazelluläre Proteine handelt, stellt die zeitliche und räumliche Koexpression eine unabdingbare Voraussetzung für eine funktionelle Kooperation dar.

Zur Feststellung des *Rpn6*-Expressionsmusters wurden ganze Embryonen, verschiedene larvale Gewebe aus dritten Larven und adulte Gonaden mit einer DIG-markierten *Rpn6-antisense*-RNA-Sonde hybridisiert (Abb. 5.15). Wie auch *alien/CSN2* wird *Rpn6* während der Oogenese in den Nährzellen der reifenden Follikel exprimiert, was zu einer Anreicherung maternaler *Rpn6*-Transkripte im frühen Embryo führt. Überdies wird das *Rpn6*-Gen, anders als *alien/CSN2*, auch in den somatischen Follikelzellen der Eikammer transkribiert. Im Laufe der Embryogenese ist im gesamten Keimstreifen eine starke zygotische Expression von *Rpn6* zu beobachten, die jedoch gegen Ende der Embryonalentwicklung gleich dem Expressionsniveau von *alien/CSN2* eine fortschreitende Reduzierung erfährt. In späten Embryonen beschränkt sich die *Rpn6*-Expression vornehmlich auf das ZNS und die Hirnhemisphären, den Darm und die Gonaden. In späten dritten Larven wird das *Rpn6*-Gen ebenfalls in allen Imaginalscheiben und Teilen des Gehirns transkribiert. Im larvalen Darm, in den Speicheldrüsen und in der somatischen Muskulatur konnten hingegen keine *Rpn6*-Transkripte nachgewiesen werden. Ob *Rpn6* in den larvalen Gonaden und im adulten Testes exprimiert wird, konnte anhand der *in situ*-Hybridisierungs-Experimente nicht eindeutig geklärt werden, da diese Gewebe auch im Kontrollexperiment mit einer *Rpn6-sense*-RNA-Sonde zum Teil angefärbt wurden.

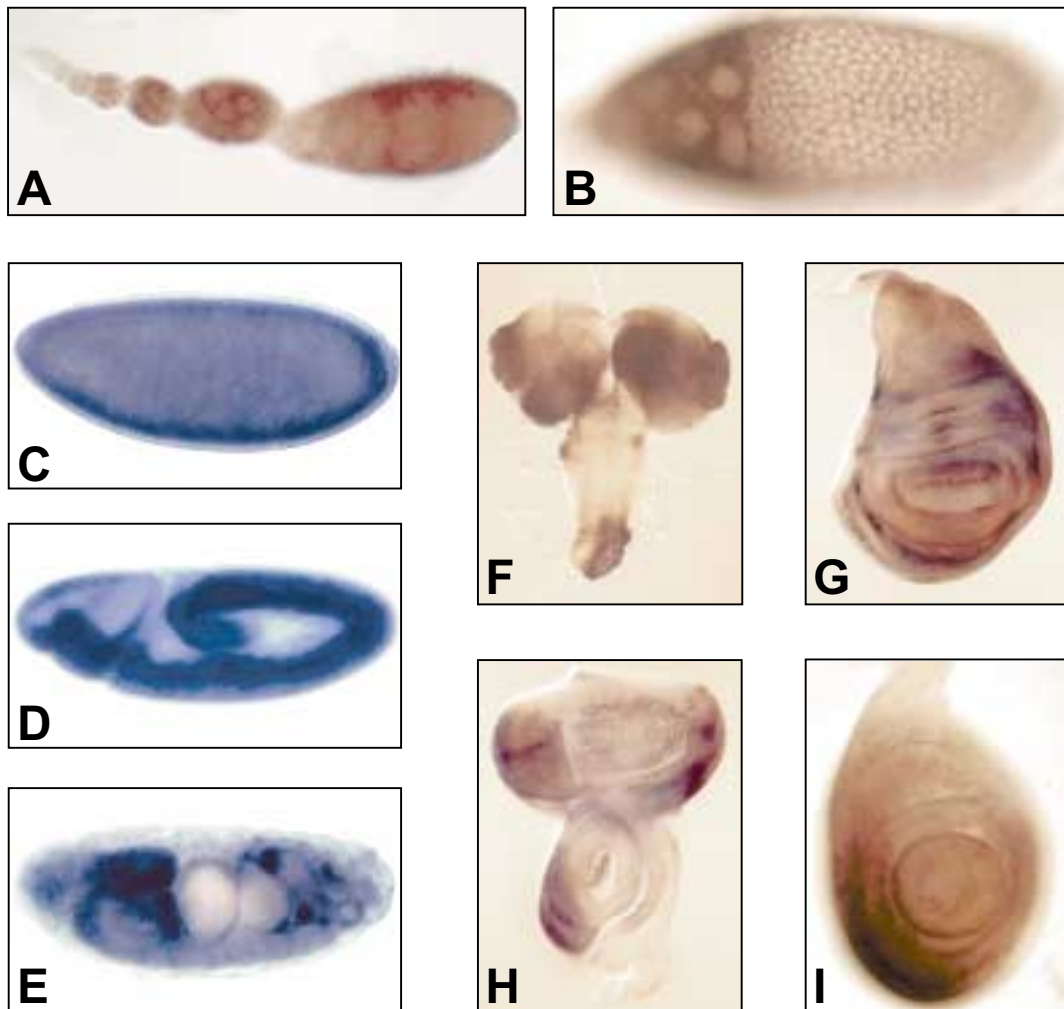


Abb. 5.15 Das *Rpn6*-Expressionmuster während der Entwicklung von *Drosophila*. *in situ*-Hybridisierungen mit einer DIG-markierten *Rpn6*-antisense-RNA-Sonde zur Detektion von *Rpn6*-Transkripten. Parallel durchgeführte Kontrollansätze mit einer DIG-markierten *Rpn6*-sense-RNA-Sonde zeigten keine spezifische Färbung. **(A)** Ovariolen. **(B)** Reifender Follikel mit *Rpn6*-Expression in den Nährzellen und den somatischen Follikelzellen. **(C-E)** *Rpn6*-Expression während der Embryogenese. **(C)** Lateralansicht eines Embryos im frühen Blastodermstadium. **(D)** Lateralansicht eines Embryos mit extendiertem Keimstreif. **(E)** Lateralansicht eines schlupfreifen Embryos. **(F-I)** *Rpn6*-Expression in späten dritten Larven. **(F)** Larvales Gehirn. **(G)** Flügelimaginalscheibe. **(H)** Augen-Antennen-Imaginalscheibe. **(I)** Beinimaginalscheibe. Erläuterungen s. Text.

5.13 Das P-Element *l(2)k00103* inseriert im 5'-untranslatierten Bereich von *Rpn6*

Die embryonale *Rpn6*-cDNA LD18931 setzt sich aus 208 bp 5'UTR, einem 1269 bp langen offenen Leserahmen und 339 bp 3'UTR zusammen. Zur Aufklärung der genomischen Organisation des *Rpn6*-Gens wurde die Sequenz der vollständigen *Rpn6*-cDNA für die Suche nach homologen Sequenzen im *Drosophila*-Genom verwendet. Mit Hilfe des FlyBlast-Programms BLASTN wurde zum einen der genomische Klon BACR07P02 (GenBank Nr. AC007580) identifiziert, der vom BDGP an Position 51C01-02 auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms kartiert worden war. Der Sequenzvergleich von cDNA und genomischer Sequenz offenbarte die Exon/Intron-Struktur des *Rpn6*-Genlocus. Demnach ist der offene Leserahmen auf vier Exons verteilt, die durch drei kleine Introns (zwischen 63 und 148 bp) separiert werden (Abb. 5.16).

Weiterhin führte die BLASTN-Suche zur Identifikation des P{*lacW*}-Elements *l(2)k00103*, dessen Insertionsstelle vom BDGP mittels inverser PCR und anschließender Sequenzierung ermittelt worden war (Spradling *et al.*, 1999), und das laut *Flybase*-Angaben einen rezessiv letalen Phänotyp verursachte. Der Sequenzvergleich zeigte, daß *l(2)k00103* im ersten Exon des *Rpn6*-Gens lokalisiert ist und zwar im 5'-untranslatierten Bereich, 184 bp stromaufwärts des Translationsstarts.

Nach Erhalt der Fliegenlinie BL 10465 (*Bloomington Stock Center*), die die P-Element-Insertionsmutation *l(2)k00103* trug und über ein *CyO*-Balancerchromosom stabil gehalten wurde, mußte allerdings festgestellt werden, daß es sich dabei um eine Mischpopulation handelte, die sich aus Fliegen mit hell- und dunkelorange-farbenen Augen zusammensetzte. Da die rote Augenfarbe der Tiere ausschließlich durch das *white*-Reportergen des P{*lacW*}-Elements verursacht wird, sollten jedoch alle Tiere eines isogenen Stammes die gleiche Augenpigmentierung aufweisen. Da erfahrungsgemäß die Intensität der Augenfarbe mit der Anzahl an *white*-Reportergenkopien korreliert, mußte vermutet werden, daß die dunkeläugigen Fliegen möglicherweise ein weiteres P-Element im Genom integriert haben könnten. Aus diesem Grund wurden Tiere mit hell- bzw. dunkelorange-farbenen Augen untereinander gekreuzt, so daß zwei separate Fliegenlinien BL 10465-H (hellorange) und BL 10465-D (dunkelorange) etabliert werden konnten. Bereits in der F1-Generation zeigte sich, daß alle Nachkommen die Augenfarbe ihrer Eltern hatten, und auch in den nachfolgenden Generationen blieb die Augenfarbe jeweils uniform. Dadurch wurde deutlich, daß es sich um zwei verschiedene 2. Chromosomen handelte, die jedoch aufgrund ihrer Allelie beide dieselbe Mutation tragen mußten.

Um sicherzugehen, daß es sich zumindest bei einer der beiden Fliegenlinien tatsächlich um die P{*lacW*}-Insertion in den *Rpn6*-Genlocus handelte, sollte mit Hilfe der P-Element-Rescue-

Methode der P-Element-Integrationsort molekular verifiziert werden. Dazu wurde genomische DNA aus adulten Fliegen der Linie BL 10465-H mit *EcoRI* restriktionsenzymatisch gespalten, ligiert und für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt. Auf diese Weise gelang es, ein ca. 12 kb langes genomisches Fragment zu klonieren, das unter Verwendung des vektorspezifischen P3'-Flügel-Oligonukleotids "Pry2" ansequenziert wurde. Die Sequenzanalyse bestätigte, daß das P{*lacW*}-Element in 5'-3'-Orientierung in der 5'UTR des *Rpn6*-Gens, 184 bp stromaufwärts des Translationsstarts inseriert ist und daß die Fliegenlinie BL 10465-H somit sicher über die *Rpn6*-spezifische P{*lacW*}-Insertion verfügt. Auf eine molekulare Charakterisierung der Fliegenlinie BL 10465-D wurde verzichtet.

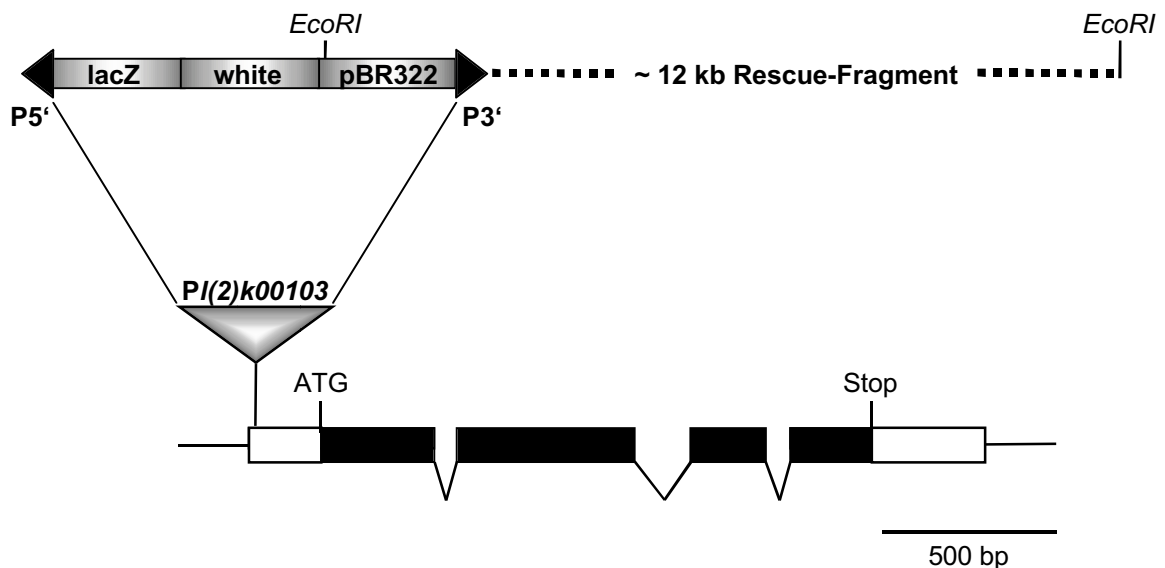


Abb. 5.16 Genomische Organisation des *Rpn6*-Genlocus und Lokalisation des P{*lacW*}-Elements *PI(2)k00103*. Der Sequenzvergleich der embryonalen *Rpn6*-cDNA mit dem genomischen Klon BACR07P02 zeigte, daß sich der codierende Bereich des *Rpn6*-Gens auf vier Exons verteilt, die durch drei Introns separiert werden (Aminosäuren-codierende Bereiche in schwarz, UTRs in weiß). Die P-Element-Rescue-Klonierung aus der Fliegenlinie BL 10465-H lieferte ein ca. 12 kb langes genomisches *EcoRI*-Fragment (gestrichelte Linie), das ausgehend vom P3'-Flügel ansequenziert wurde. Demnach ist *PI(2)k00103* in der 5'UTR, 184 bp stromaufwärts des Startcodons inseriert.

5.14 Das Enhancertrapmuster des P{lacW}-Elements *l(2)k00103* überlappt partiell mit dem *Rpn6*-Expressionsmuster

Bei der P-Element Insertion *l(2)k00103* handelt es sich um ein P{lacW}-Element, das zur Klasse der Enhancertrap-Transformationsvektoren gehört, die nicht nur als Insertionsmutagene, sondern auch zur Detektion genregulatorischer Enhancerelemente dienen. Je nach Integrationsort kann ein P-Element codiertes Reportergen unter die Kontrolle eines genspezifischen Enhancers geraten und so im Idealfall die räumliche und zeitliche Expression des endogenen Locus reflektieren (O'Kane & Gehring, 1987). Als Enhancertrapvektor enthält das P{lacW}-Element neben einem *white*⁺-Transformationmarker und bakteriellen pBR322-Vektorsequenzen zusätzlich ein mit einem Kernlokalisierungssignal fusioniertes *lacZ*-Reportergen (Bier *et al.*, 1989).

Um die *lacZ*-Reporterexpression der P-Element Insertion *l(2)k00103* zu charakterisieren, wurde an Embryonen der Fliegenlinie BL 10465-H eine β -Galaktosidase-Antikörperfärbung und an Geweben aus heterozygoten dritten Larven und an Gonaden aus heterozygoten Adulten eine histochemische X-Gal-Färbung durchgeführt (Abb. 5.17). Dabei stellte sich heraus, daß das β -Gal-Enhancertrapmuster die endogene *Rpn6*-Expression nur partiell widerspiegelt. In frühen Embryonen des zellulären Blastodermstadiums akkumuliert das β -Gal-Protein gleichmäßig in den Kernen der Blastoderm- und Polzellen und der im Dotter verbliebenen Kernäquivalente. Im vollverlängerten Keimstreifstadium ist eine ubiquitäre β -Gal-Expression zu beobachten, die allerdings von einer segmentalen β -Gal-Anreicherung dominiert wird. In späten Embryonen wird das β -Gal-Reporterprotein vornehmlich in den Hirnhemisphären, dem ZNS und im Darm detektiert. Während in Geweben aus heterozygoten dritten Larven überraschenderweise keine β -Gal-Expression nachgewiesen werden konnte, zeigten adulte Gonaden eine spezifische β -Gal-Aktivität. Im Laufe der Oogenese weisen insbesondere die Nährzellen eine starke β -Gal-Expression auf, während die Expression im somatischen Follikelepithel zwar detektierbar aber vergleichsweise schwach ist. Im adulten Testes beschränkt sich die β -Gal-Expression auf späte primäre Spermatozyten und postmeiotische Spermatoziden während in den proliferierenden Stammzellen bzw. den Spermatozoen keine β -Gal-Aktivität nachweisbar ist.

Im Vergleich zum endogenen *Rpn6*-Transkriptionsmuster bleibt festzuhalten, daß sowohl die embryonale als auch die keimbahnspezifische β -Gal-Aktivität in der Oogenese das endogene *Rpn6*-Vorkommen bestätigen (vgl. Kap. 5.12). Die β -Gal-Expression während der Spermatogenese legt den Schluß nahe, daß *Rpn6* möglicherweise auch in der männlichen Keimbahn exprimiert wird. Das völlige Fehlen larvaler β -Gal-Aktivität steht zwar im

Widerspruch zur extensiven *Rpn6*-Expression in dritten Larven, stellt aber die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungsexperimente keineswegs in Frage. Vielmehr muß davon ausgegangen werden, daß die Wirksamkeit der genregulatorischen Elemente, die für die larvale Expression verantwortlich zeichnen, in der *Pl(2)k00103*-Insertionslinie BL 10465-H gestört ist.

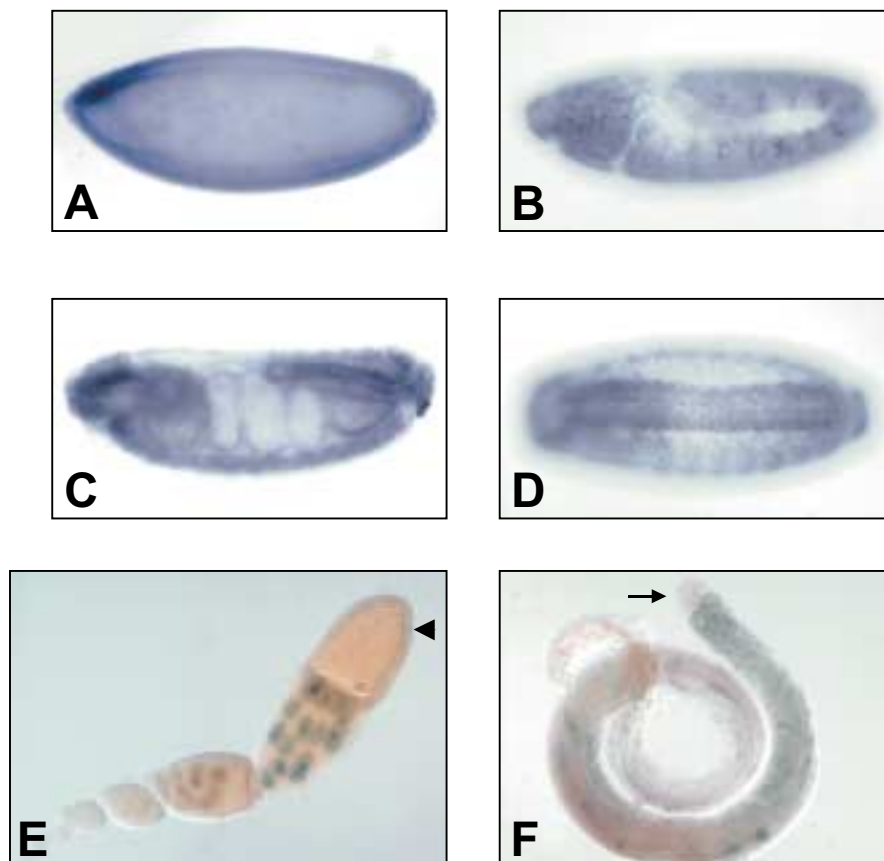


Abb. 5.17 Das β -Gal-Enhancertrapmuster der *Rpn6*-spezifischen $P\{lacW\}$ -Insertion *l(2)k00103* reflektiert partiell die endogene *Rpn6*-Expression. (A-D) Immunhistochemischer Nachweis der β -Gal-Expression in BL 10465-H-Embryonen mit Hilfe eines polyklonalen β -Gal-Antikörpers. (A) Lateralansicht eines Embryos im zellulären Blastodermstadium. (B) Lateralansicht eines Embryos mit extendiertem Keimstreif. (C) Lateralansicht eines Stadium 16-Embryos. (D) Ventralansicht eines Stadium 14/15-Embryos mit Fokus auf das ventrale ZNS. (E, F) Histochemischer X-Gal-Nachweis der β -Gal-Aktivität in Gonaden aus heterozygoten BL 10465-H-Fliegen. (E) Ovariolen. Das kernlokalisierte β -Gal-Reporterprotein ist vornehmlich in den Nuclei der Nährzellen und in geringerer Intensität auch im somatischen Follikulepithel nachweisbar (Pfeilspitze). (F) Testis. Die Aktivität des β Gal-Reporterproteins beschränkt sich auf die Kerne primärer Spermatocyten und reifender Spermatiden. Die apikale Testisspitze, in der die prämeiotischen Stammzellen und Spermatogonien lokalisiert sind, bleibt ungefärbt (Pfeil).

5.15 Die P-Element-Insertion *I(2)k00103* verursacht früh-larvale Letalität

Zur näheren Charakterisierung des Phänotyps der rezessiv letalen Fliegenlinie BL 10465-H wurde zunächst der Letalitätszeitpunkt festgestellt. Um das Risiko des Vorhandenseins einer zweiten unabhängigen Mutation auf dem *Pl(2)k00103*-Chromosom, die möglicherweise irreführende Zusatzeffekte bewirken könnte, zu minimieren, wurde zunächst das *Pl(2)k00103*-Chromosom durch meiotische Rekombination bereinigt. Dazu wurden heterozygote *+BL10465-H*-Weibchen über fünf Generationen mit *white*-Männchen gekreuzt, so daß in der weiblichen Meiose ungehindert Rekombinationsereignisse zwischen dem maternalen *Pl(2)k00103*-Chromosom und dem paternalen Wildtypchromosom stattfinden konnten. In den Nachkommen konnte anhand des *white*⁺-Augenmarkers auf die Anwesenheit des *Pl(2)k00103*-Elements selektiert werden. Schließlich wurden heterozygote *+BL10465-H*-Weibchen mit Männchen des Balancerstammes *w; If/CyO* gekreuzt. Die in der Tochtergeneration auftretenden *BL10465-H/CyO*-Geschwister wurden untereinander gekreuzt, um einen bereinigten BL 10465-H-Stamm zu etablieren. Da in diesem Stamm ausschließlich *CyO*-Tiere auftraten, konnte gefolgert werden, daß die Letalität mit dem P-Element segregiert war.

Zur Feststellung des Letalitätszeitpunktes wurden heterozygote *w; +BL10465-H*-Tiere untereinander gekreuzt, um störende Einflüsse des *CyO*-Balancerchromosoms zu vermeiden. Von der Nachkommenschaft dieser Kreuzung wurden 1000 Embryonen abgesammelt und bei 25 °C für mindestens 24 Stunden inkubiert, um den Schlupf der ersten Larven zu ermöglichen. Zur Kontrolle wurden parallel 1000 Embryonen des *white*-Fliegenstammes abgesammelt, um die natürliche Letalitätsrate der Laborzuchten bestimmen zu können. In beiden Fällen zeigte sich, daß ca. 2 % der Nachkommen embryonal letal waren. Da für eine Mutation mit embryonal letalem Phänotyp jedoch ein letaler Phänotyp bei 25 % der Embryonen postuliert werden muß, und die Letalität der Nachkommen heterozygoter *+BL10465-H*-Fliegen nicht die natürliche Letalitätsrate überstieg, konnte gefolgert werden, daß homozygote *BL10465-H*-Tiere embryonal vital sind und mindestens das erste Larvenstadium erreichen.

Zur weiteren Eingrenzung des Letalitätszeitpunktes homozygoter *BL10465-H*-Tiere wurde ein *BL10465-H/CyO, ActGFP*-Stamm etabliert, der den Vorteil bietet, daß heterozygote Balancertiere durch extensive GFP-Fluoreszenz von den homozygoten, nicht-fluoreszierenden *BL10465-H*-Tieren *in vivo* unterschieden werden können. Aus der Nachkommenschaft dieses Stamms wurden 100 dritte Larven abgesammelt und auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Alle getesteten Tiere zeigten die für das *ActGFP*-Reportergen-typische Fluoreszenz. Daraus konnte der Schluß gezogen werden, daß homozygote *BL10465-H*-Tiere das dritte Larvenstadium nicht erreichen und demnach bereits während des ersten bzw. zweiten Larvenstadiums zugrunde

gehen. Tatsächlich wurden unter den Nachkommen heterozygoter *+/BL10465-H*-Fliegen Larven des ersten bis zweiten Larvenstadiums beobachtet, die träge und unbeweglich auf den Ablageschälchen liegenblieben und schließlich verendeten. Von der äußeren Morphologie erschienen die Tiere jedoch normal und zeigten keine auffälligen Aberrationen, so daß keine Rückschlüsse auf eine direkte Ursache für die Letalität homozygoter *BL10465-H*-Larven gezogen werden konnten.

5.16 Die *Rpn6*-spezifische P-Element-Insertion *l(2)k00103* ist ursächlich für den larval letalen Phänotyp der Linie BL 10465-H

Um definitiv zu nachzuweisen, daß die *P{lacW}*-Insertion *l(2)k00103* in der 5'UTR des *Rpn6*-Gens und nicht etwa eine eng benachbarte Zweitmutation ursächlich für den larval letalen Phänotyp der Fliegenlinie BL 10465-H ist, sollte das P-Element remobilisiert und damit eine Rettung erzielt werden. Zur Mobilisation des *P{lacW}*-Elements, das durch einen *white*⁺-Marker erkennbar ist, wurde zunächst eine Transposasequelle in die bereinigte Fliegenlinie BL 10465-H eingekreuzt, um in der F1-Generation *l(2)k00103; Δ2-3* Jumpstarter-Männchen zu erhalten (vgl. Kap. 5.3). Aus der Nachkommenschaft von 16 unabhängigen Jumpstarter-Männchen (6 Nachkommen pro Jumpstarter-Männchen) wurden insgesamt 96 potentielle P-Element-Exzisions- (*Jump Out*-) Linien etabliert, die durch den Verlust des *white*⁺-Reportergens als solche identifiziert wurden. Da jedes weißäugige Tier das Resultat eines unabhängigen Exzisionsereignisses sein kann, wurde von jedem Individuum eine bezüglich des zweiten Chromosoms isogene Linie etabliert (Kreuzungsschema analog zu Abb. 5.5 B). So stellte sich heraus, daß 53 der *l(2)k00103-Jump Out*-Linien homozygot lebensfähig waren, während die übrigen 43 Linien trotz Verlust des P-Elements weiterhin homozygot letal blieben.

In Rückkreuzungsexperimenten der vitalen *Jump Out*-Linien mit der parentalen Ursprungslinie BL 10465-H zeigte sich erwartungsgemäß, daß alle *Jump Out*-Chromosomen die Insertionsmutation *l(2)k00103* komplementieren konnten. Um die Exzisionsereignisse zusätzlich molekular zu verifizieren, wurde exemplarisch in zwei unabhängigen, vitalen Linien der ursprüngliche Insertionsort des P-Elements analysiert. Dazu wurde aus genomischer DNA der vitalen *Jump Out*-Linien 2A und 20A die Region der ursprünglichen P-Element-Insertionsstelle mit Hilfe der flankierenden Oligonukleotide "5'(-541bp)-Rpn6P" und "3'(+55bp)-Rpn6P" amplifiziert (s. auch Abb. 5.19C), in pCRII-TOPO ligiert und schließlich sequenziert. Bereits die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zeigte, daß die beiden Amplifikate bezüglich ihrer Länge nicht von dem entsprechenden 596 bp langen Wildtyp-Fragment zu unterscheiden waren (Abb. 5.18). Die nachfolgende Sequenzanalyse lieferte den Beweis, daß in

beiden Fällen eine präzise Exzision des P-Elements stattgefunden hatte, aus der eine exakte Reversion der wildtypischen Nukleotidfolge resultierte.

Die geschilderten genetischen und molekularen Experimente belegen zweifelsfrei, daß zwischen der larvalen Letalität der Fliegenlinie BL 10465-H und der P-Element-Insertion *l(2)k00103* ein kausaler Zusammenhang besteht. Aufgrund der Lokalisation des P{*lacW*}-Elements in der 5'UTR des *Rpn6*-Gens, kann folgerichtig der Schluß gezogen werden, daß die P-Element-Insertion die Funktion des *Rpn6*-Gens nachhaltig stört. Die durch die beeinträchtigte *Rpn6*-Funktion hervorgerufene larvale Letalität veranschaulicht, daß dem *Rpn6*-Gen eine essentielle Funktion während der Entwicklung von *Drosophila* zuzuschreiben ist.

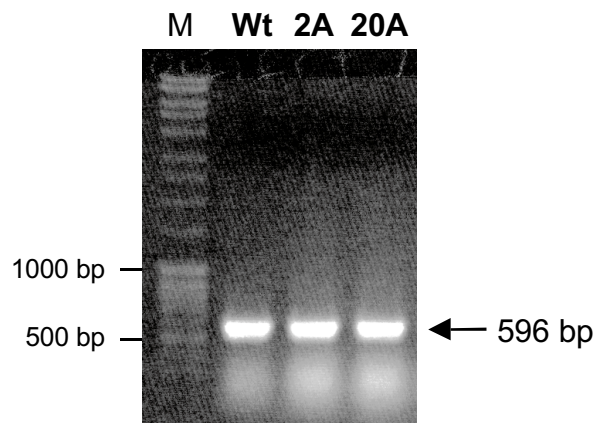


Abb. 5.18 Die molekulargenetische Analyse der vitalen *Jump Out*-Linien 2A und 20A belegt die vollständige und präzise Exzision des P{*lacW*}-Elements *l(2)k00103*. Aus genomischer DNA der vitalen *Jump Out*-Linien 2A und 20A wurde mit Hilfe flankierender Oligonukleotide ein die ursprüngliche P-Element-Insertionsstelle umfassendes 596 bp langes Fragment amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (1%iges Agarosegel, Größenstandard M: Mass Ruler DNA-Ladder Mix). Zur Kontrolle wurde das entsprechende Fragment aus genomischer DNA aus *white*-Fliegen (Wt) amplifiziert. Die Amplifikate aus 2A und 20A sind bezüglich ihrer Länge nicht vom Wildtyp-Fragment zu unterscheiden und zeigten in der nachfolgenden Sequenzanalyse eine exakte Reversion zur Wildtypsituation.

5.17 Die letalen *Jump Out*-Linien 2F und 20F repräsentieren neue *Rpn6*-spezifische Mutationen und zeichnen sich durch unterschiedliche Allelstärken aus

Die Remobilisation des P-Elements *l(2)k00103* lieferte neben den vitalen *Jump Out*-Linien zusätzlich 43 *Jump Out*-Linien, die weiterhin homozygot letal waren und deshalb mit einem *CyO*-Balancerchromosom gehalten werden mußten. Da die Exzision eines P-Elements nicht immer präzise und vollständig verläuft, sondern häufig nur einen Teil des P-Elements entfernt oder der Insertionsstelle unmittelbar benachbarte Bereiche deletiert (Delattre *et al.*, 1995), sollte getestet werden, ob es sich bei den letalen *Jump Out*-Ereignissen um neue *Rpn6*-spezifische Allele handelte. Dazu wurde jeweils eine letale Nachkommen-Linie pro Jumpstarter-Männchen mit der parentalen Ursprungslinie BL 10465-H rückgekreuzt. Keine der insgesamt 14 getesteten letalen *Jump Out*-Linien (zwei Jumpstarter-Männchen hatten ausschließlich vitale *Jump Out*-Nachkommen hervorgebracht) konnte die P-Element-Insertionsmutation *l(2)k00103* komplementieren, d.h. jede der getesteten letalen *Jump Out*-Linien repräsentierte ein neues *Rpn6*-spezifisches Allel.

5.17.1 Phänotypische Charakterisierung der *Jump Out*-Allele *rpn6*^{2F} und *rpn6*^{20F}

Da die Verfügbarkeit verschiedener Allele unter Umständen sehr hilfreich für die detaillierte Analyse der Genfunktion sein kann, wurden exemplarisch die allelischen *Jump Out*-Linien 2F (Allelbezeichnung *rpn6*^{2F}) und 20F (Allelbezeichnung *rpn6*^{20F}) phänotypisch und molekulargenetisch charakterisiert. Bei der Bestimmung des Letalitätszeitpunktes konnte, auf die gleiche Weise wie in Kap. 5.15 beschrieben, zunächst gezeigt werden, daß sowohl homozygote *rpn6*^{2F}- als auch *rpn6*^{20F}-Embryonen vollständig vital sind und das erste Larvenstadium erreichen. Nach der Etablierung der Stämme 2F/*CyO*, *ActGFP* und 20F/*CyO*, *ActGFP* wurden aus der Nachkommenschaft dieser Stämme jeweils 100 dritte Larven abgesammelt und auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Im Falle von *rpn6*^{2F} zeigten alle getesteten Tiere die für das *ActGFP*-Reportergen-typische Fluoreszenz, woraus gefolgert werden konnte, daß homozygote *rpn6*^{2F}-Tiere das dritte Larvenstadium nicht erreichen und demnach bereits während des ersten bzw. zweiten Larvenstadiums zugrunde gehen. So, wie bereits bei den Nachkommen heterozygoter +/BL10465-H-Fliegen beobachtet werden konnte, fanden sich auch unter den Nachkommen heterozygoter +/*rpn6*^{2F}-Tiere Larven des ersten bis zweiten Larvenstadiums ohne äußere Auffälligkeiten, die reglos auf den Ablageschälchen liegenblieben und starben.

Im Gegensatz dazu zeigten 19 der 100 zufällig abgesammelten dritten Larven der Linie *20F/CyO, ActGFP*, also ca. ein Fünftel, keine GFP-Fluoreszenz und waren somit homozygot für *rpn6^{20F}*. Da für den Fall larvaler Vitalität in diesem Stadium ein Auftreten heterozygoter Balancertiere und homozygoter Mutanten im Verhältnis 2:1 postuliert werden muß (homozygote *CyO*-Tiere sterben bereits spät embryonal bis früh larval), spricht die beobachtete Häufigkeit homozygoter *rpn6^{20F}*-Larven dafür, daß ein gewisser Anteil bereits während der Larvalentwicklung verendet. Um die weitere Entwicklung verfolgen zu können, wurden 20 homozygote *rpn6^{20F}*-Larven in eine Futterflasche transferiert und bei 25 °C inkubiert. Während eine gleiche Anzahl heterozygoter *rpn6^{20F}/CyO*-Kontrolltiere nach einigen Tagen als adulte Fliegen schlüpften, verpuppten sich überhaupt nur 16 der 20 homozygoten *rpn6^{20F}*-Larven und gingen spätestens während der Metamorphose zugrunde. Aufgrund der spät larvalen bis pupalen Letalität, die im Vergleich zu den beiden anderen *Rpn6*-Allelen eine erheblich verlängerte Überlebensspanne darstellt, kann gefolgert werden, daß es sich bei *rpn6^{20F}* um ein schwaches bzw. hypomorphes Allel handelt.

5.17.2 Molekulargenetische Charakterisierung der *Jump Out*-Allele *rpn6^{2F}* und *rpn6^{20F}*

Aufgrund des interessanten Befundes, daß es sich bei *rpn6^{2F}* und *rpn6^{20F}* um Allele handelte, die unterschiedlich starke Phänotypen hervorriefen, stellte sich die Frage nach der Art der erzeugten Mutationen. Zur molekulargenetischen Charakterisierung wurde genomische DNA der heterozygoten Fliegenlinien *2F/CyO, ActGFP* und *20F/CyO, ActGFP* in verschiedenen PCR-Experimenten eingesetzt. Zur Amplifikation des relevanten Bereiches wurden verschiedene Kombinationen von Oligonukleotiden eingesetzt, die stromaufwärts (5') und stromabwärts (3') der ursprünglichen P-Element-Insertionsstelle hybridisierten. Unter Verwendung der Oligonukleotide "5'(-1303bp)-Rpn6P" und "3'(+1532bp)-Rpn6P" gelang an genomischer DNA aus heterozygoten *2F/CyO, ActGFP*-Fliegen die Amplifikation eines ca. 0,9 kb langen Fragmentes, daß gegenüber dem erwarteten 2,8 kb langen Wildtypfragment erheblich verkürzt war (Abb. 5.19A). Die Sequenzierung des in pCRII-TOPO ligierten Fragments zeigte, daß es sich bei *rpn6^{2F}* um eine partielle Deletion des *Rpn6*-Gens handelt, die insgesamt 1901 bp umfaßt. Davon betroffen sind ca. 1200 Kilobasenpaare unmittelbar stromaufwärts der *Rpn6*-Transkriptionseinheit, das gesamte erste Exon und Intron und ca. 100 bp des zweiten Exons. Aufgrund der Tatsache, daß diese Defizienz neben putativ genregulatorischen Sequenzen, die gesamte 5'UTR und auch den für die Aminosäuren 1-145 codierenden Bereich deletiert, kann

gefolgert werden, daß es sich bei *rpn6*^{2F} definitiv um ein amorphes Allel bzw. ein Nullallel handelt.

Die molekulare Charakterisierung des *rpn6*^{20F}-Allels erwies sich als ungleich komplizierter. Keine der getesteten Oligonukleotid-Kombinationen, die die Amplifikation von Fragmenten ermöglichen sollten, die die ursprüngliche P-Element-Insertionsstelle überspannten, lieferte ein vom Wildtyp abweichendes, aberrantes Amplifikat. Um die wildtypischen Fragmente, die bei der Verwendung genomischer DNA aus heterozygoten *20F/CyO*, *ActGFP*-Fliegen aufgrund des intakten *Rpn6*-Locus des *CyO*-Chromosoms amplifiziert wurden, zu eliminieren, wurde schließlich genomische DNA aus homozygoten *rpn6*^{20F}-Larven eingesetzt. Auf diese Weise konnte zwar gezeigt werden, daß sowohl die Bereiche, die die ursprüngliche P-Element-Insertionsstelle unmittelbar flankierten, als auch der codierende Bereich des *Rpn6*-Gens völlig intakt und demnach von der P-Element-Exzision unberührt waren; eine PCR-Amplifikation über die Insertionsstelle hinweg blieb jedoch weiterhin unmöglich. Dies begründete die Vermutung, daß Reste des 10 kb großen P{*lacW*}-Elements am ursprünglichen Integrationsort verblieben sein könnten. Tatsächlich lieferten verschiedene Kombinationen von randständigen P-Element-spezifischen Oligonukleotiden mit *Rpn6*-Locus-spezifischen Oligonukleotiden Fragmente, die auch aus genomischer DNA der Ursprungslinie BL 10465-H amplifiziert werden konnten (Abb. 5.19B, Spur 1 und 2). Da sowohl Oligonukleotide mit Spezifität für den 5'-Bereich als auch für den 3'-Bereich des P-Elements die Erzeugung spezifischer Fragmente erlaubten, konnte gefolgert werden, daß die P-Element-Remobilisation eine interne Deletion innerhalb der P-Element-Sequenzen verursacht hatte, die zumindest teilweise auch das *white*-Reportergen betreffen mußte. Offensichtlich war das zurückgebliebene P-Element-Bruchstück jedoch groß genug, um eine effiziente PCR-Amplifikation zu behindern. Die Verwendung des P-Element-spezifischen Oligonukleotids "Plw3-1", das im 3'-Bereich des P-Elements hybridisiert, und des genomischen Oligonukleotids "5'(-54bp)-Rpn6P", das 54 bp stromaufwärts des P-Elements bindet, ermöglichte schließlich die Amplifikation eines ca. 2,5 kb langen Fragments, das ausschließlich auf den Verbleib von ca. 2,5 kb P-Element-Sequenzen zurückgeführt werden konnte (Abb. 5.19B, Spur 4). Die schwache Intensität der Bande ist höchstwahrscheinlich auf eine mangelnde Effizienz der PCR-Reaktion bei der Erzeugung großer Amplikate (> 2 kb) zurückzuführen. So verlief auch die Kontrollreaktion an genomischer DNA der Linie BL 10465-H trotz optimierter PCR-Bedingungen (Elongationszeit 10 min) erfolglos. Das erwartete 10 kb lange Fragment konnte nicht amplifiziert werden (Abb. 5.19B, Spur 3). Auf eine detaillierte Sequenzanalyse des 2,5 kb P-Element-Überrestes wurde verzichtet.

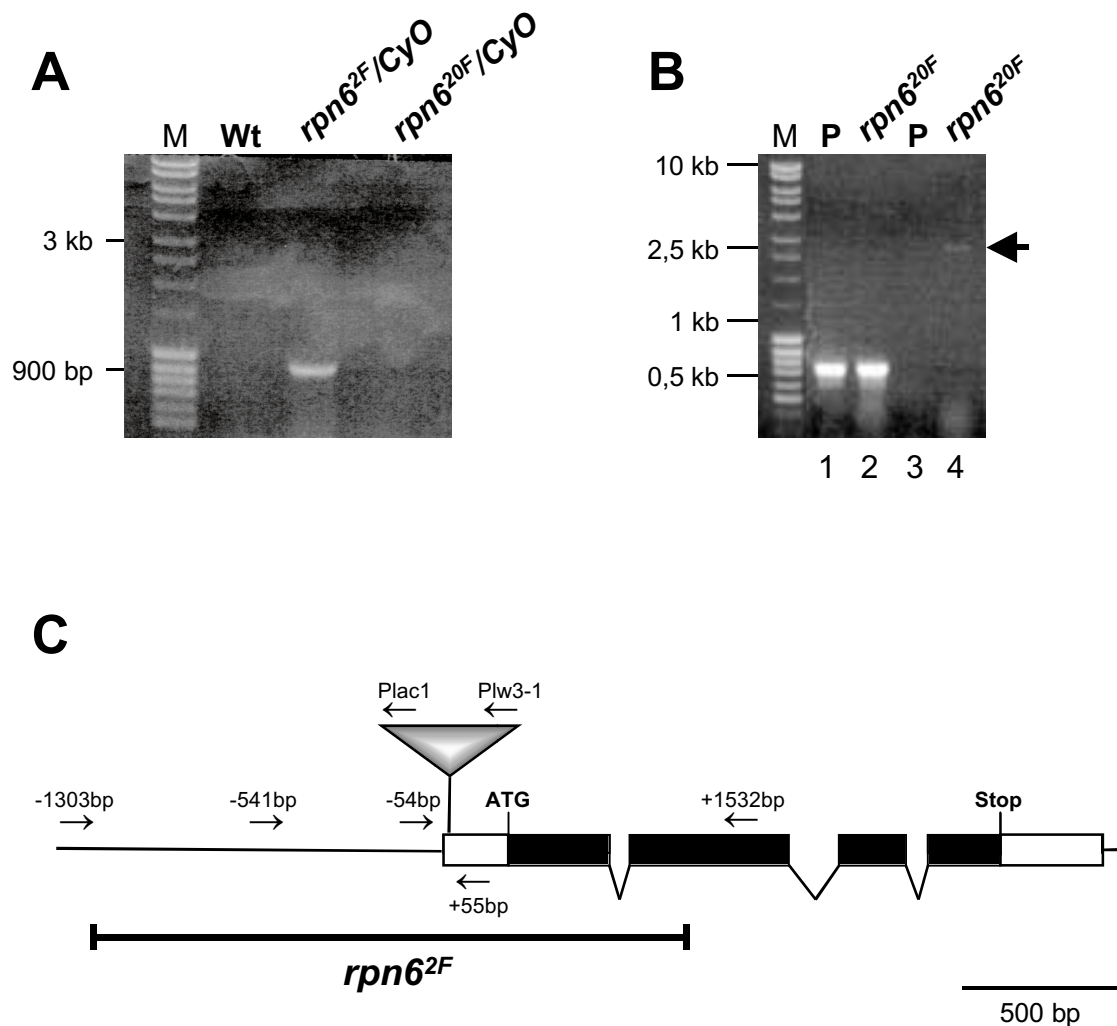


Abb. 5.19 Die *Jump Out*-Allele *rpn6^{2F}* und *rpn6^{20F}* sind das Ergebnis unpräziser P-Element-Exzisionen. (A) Aus genomischer DNA heterozygoter Fliegen der letalen *Jump Out*-Linie *rpn6^{2F}/CyO*, *ActGFP* konnte mit Hilfe der Oligonukleotide "5'(-1303bp)-Rpn6P" und "3'(+1532bp)-Rpn6P" ein die ursprüngliche P-Element-Insertionsstelle umfassendes, ca. 900 bp langes aberrantes Fragment amplifiziert werden. Das erwartete 2,8 kb lange wildtypische Fragment konnte vermutlich aufgrund seiner Größe weder aus wildtypischer Kontroll-DNA (Wt) noch aus den intakten *Rpn6*-Loci der *CyO*-Chromosomen amplifiziert werden. Aus genomischer DNA heterozygoter Fliegen der Linie *rpn6^{20F}/CyO*, *ActGFP* konnte kein Amplifikat erzeugt werden. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener PCR-Amplifikate unter Verwendung genomischer DNA aus homozygoten *rpn6^{20F}*-Larven und der Ursprungslinie *BL10465-H/CyO*. Die Kombination P-Element-spezifischer Oligonukleotide mit *Rpn6*-Locus-spezifischen Oligonukleotiden (Spur 1 und 2: "Plac1"/"5'(-541bp)-Rpn6P", Spur 3 und 4: "Plw3-1"/"5'(-54bp)-Rpn6P") erlaubt die Amplifikation spezifischer Fragmente aus *rpn6^{20F}* und demonstriert so den Verbleib von 2,5 kb P-Element-Sequenzen am ursprünglichen Integrationsort. (A, B) 1%ige Agarosegele, Größenstandard M: Mass Ruler DNA-Ladder Mix. (C) Schematische Darstellung des *Rpn6*-Genlocus mit der ursprünglichen P-Element-Integration in der 5' UTR. Der Balken unterstreicht den deletierten Bereich in *rpn6^{2F}* (1901 bp), die kleinen Pfeile stellen die für die PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide dar (s. Text).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß das neu erzeugte *Jump Out*-Allel $rpn6^{2F}$ aufgrund der Deletion codierender Bereiche des *Rpn6*-Gens eine eindeutige Nullmutation für *Rpn6* darstellt, die in homozygoten Tieren zu früh-larvaler Letalität führt. Die Tatsache, daß derselbe Phänotyp auch für die ursprüngliche P{*lacW*}-Insertionsmutante *l(2)k00103* attestiert werden konnte, erlaubt den Rückschluß, daß auch dieses Allel eine *Rpn6*-Nullmutation repräsentiert. Offensichtlich entkoppelt das 10 kb große P-Element-Integrat die *Rpn6*-Transkriptionseinheit von essentiellen genregulatorischen Bereichen, so daß keine *Rpn6*-Expression mehr stattfinden kann. Im Gegensatz dazu scheint das ca. 2,5 kb große P-Element-Relikt in $rpn6^{20F}$ eine gewisse Restaktivität des *Rpn6*-Gens zu gestatten, die es den homozygoten Tieren erlaubt bis ins dritte Larven- bzw. ins Puppenstadium zu überleben.

5.18 Die Analyse von somatischen $rpn6^{2F}$ - und $rpn6^{20F}$ -Mosaiken liefert Hinweise auf eine essentielle Funktion von Rpn6 in proliferierenden Geweben

Mit der Charakterisierung der verschiedenen *Rpn6*-Allele konnte gezeigt werden, daß das Rpn6-Protein eine essentielle Funktion während der Entwicklung von *Drosophila* erfüllt; konkrete Hinweise auf spezifische physiologische oder zelluläre Dysfunktionen lieferte der larval letale Phänotyp jedoch nicht. Da Larven des ersten bis zweiten Larvalstadiums einer experimentellen Manipulation wesentlich schwerer zugänglich sind als beispielsweise Embryonen oder dritte Larven, wurde auf das FLP/FRT-System zurückgegriffen, das die Erzeugung somatischer Klone ermöglicht. Die Analyse homozygot mutanter *Rpn6*-Klone in adulten Fliegen sollte Aufschluß darüber geben, welche Auswirkungen der Verlust von Rpn6 auf zelluläre Funktionen, wie z. B. Proliferation oder Differenzierung hat.

5.18.1 Kopplung der *Rpn6*-Allele $rpn6^{2F}$ und $rpn6^{20F}$ mit FRT-Elementen durch meiotische Rekombination

Das FLP/FRT-System der ortsspezifischen Rekombination entstammt der Rekombinationsmaschinerie des 2 µm-Plasmids aus *S. cerevisiae* und besteht im wesentlichen aus der sequenzspezifischen Rekombinase FLP und der FLP-Erkennungssequenz FRT (*FLP Recognition Target*). Je nach Lokalisation der FRTs ist die FLP-Rekombinase in der Lage intra- oder intermolekulare Rekombination zwischen zwei FRT-Elementen zu katalysieren (Übersicht in Futcher, 1988). In *Drosophila* wurde das FLP/FRT-System zur Generierung von somatischen oder Keimbahnmosaiken etabliert (Golic & Lindquist, 1989; Golic, 1991; Xu & Rubin, 1993). Inzwischen ist eine Vielzahl von transgenen FLP- wie auch FRT-Fliegenstämmen mit

unterschiedlichen Markern erhältlich, die eine effiziente Induktion mitotischer Rekombination erlauben (Übersicht in Theodosiou & Xu, 1998).

Unabdingbare Voraussetzung für die FLP/FRT-induzierte mitotische Rekombination eines spezifischen Genlocus ist die Kopplung des Locus mit einem FRT-Element. Aufgrund der chromosomalen Lokalisation des *Rpn6*-Gens an Position 51C01-02 auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms bot sich die Kopplung mit einem in Centromernähe, also proximal gelegenen FRT-Element an Position 42D (*FRT42D*) an. Dieses FRT-Element ist Teil eines Transposons, das unter anderem durch ein Hitzeschock-induzierbares Neomycin-Resistenz-Reportergen (*neo^R*) markiert ist und somit die Selektion auf Anwesenheit des FRT-Elements erlaubt. Die Kopplung der beiden *Rpn6*-Allele *rpn6^{2F}* und *rpn6^{20F}* mit *FRT42D* erfolgte durch meiotische Rekombination in heterozygoten Weibchen (Abb. 5.20). Da das *FRT42D*-Chromosom über eine zweite P-Element-Insertion an Position 45F verfügt, die ein *white⁺*-Reportergen trägt, konnte in der Nachkommenschaft der heterozygoten Weibchen auf Tiere selektiert werden, die neomycinresistent und zugleich weißäugig waren. Da der Verlust des *white⁺*-Markers allerdings lediglich signalisierte, daß ein Rekombinationsereignis zwischen dem *FRT42D*-Locus und Position 45F stattgefunden hatte, mußten alle neomycinresistenten, weißäugigen Tiere in Einzelkreuzungen mit der *Rpn6*-mutanten Linie BL 10465-H (*w; P{lacW}l(2)k100301/CyO*) auf Komplementation getestet werden. Fliegen, in deren Nachkommenschaft ausschließlich *CyO*-Tiere auftraten, mußten das *rpn6^{2F}*- bzw. *rpn6^{20F}*-Allel erhalten haben und repräsentierten somit Chromosomen, die für die FLP/FRT-Analyse geeignet waren. Die weißäugigen Nachkommen einer solchen Komplementationskreuzung wurden untereinander gekreuzt, um die isogenen Stämme "*rpn6^{2F}-FRT42D*" des Genotyps *w; rpn6^{2F}, P{ry⁺ neo FRT}42D/CyO* bzw. "*rpn6^{20F}-FRT42D*" des Genotyps *w; rpn6^{20F}, P{ry⁺ neo FRT}42D/CyO* zu etablieren. Außerdem wurden im Anschluß beide Stämme parallel mit *CyO*, *ActGFP* umbalanciert, um in späteren Experimenten über einen larvalen Marker zu verfügen.

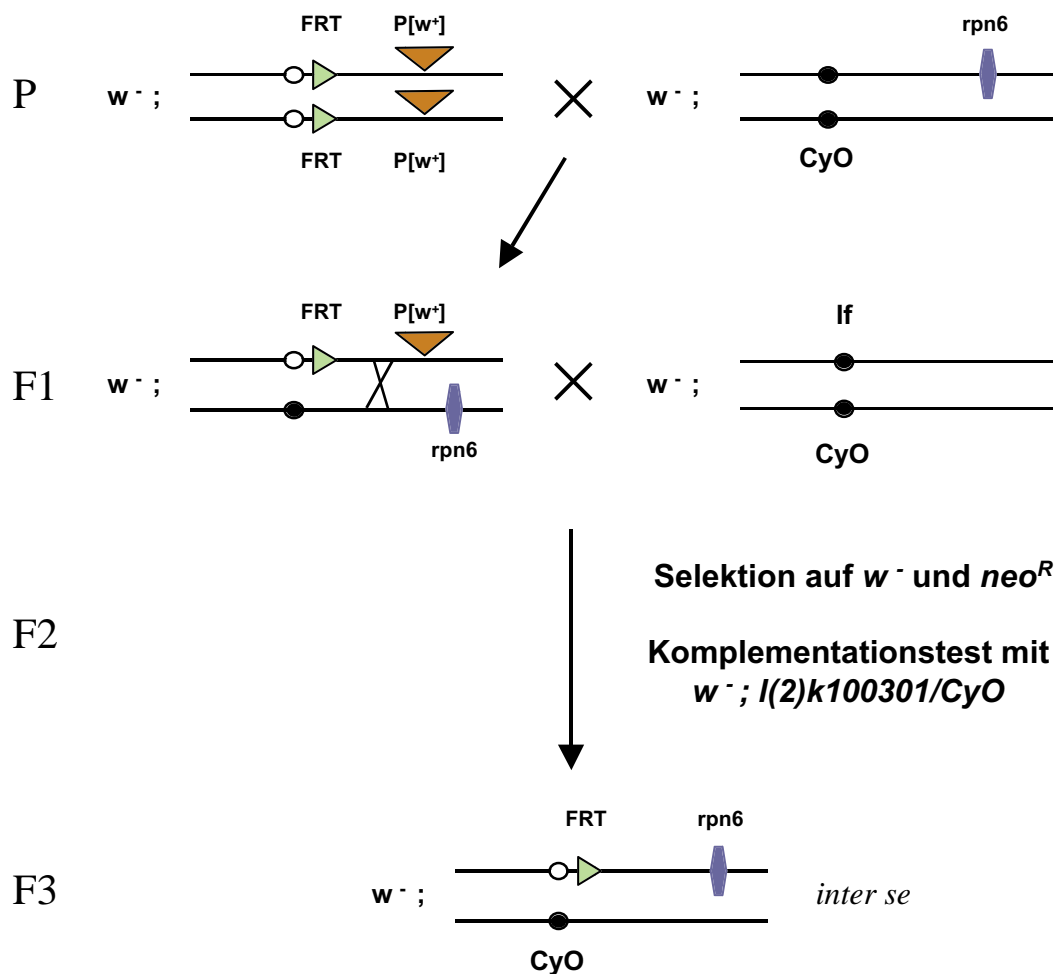


Abb. 5.20 Kopplung der *Rpn6*-Allele *rpn6*^{2F} und *rpn6*^{20F} mit dem FRT-Element *FRT42D* durch meiotische Rekombination. Schematische Darstellung der kreuzungsgenetischen Kopplung des centromernahen, proximalen FRT-Elements mit den distalen *Rpn6*-Jump Out-Allelen *rpn6*^{2F} und *rpn6*^{20F} auf dem rechten Arm von Chromosom 2. Die Kopplung der beiden Loci erfolgt zufällig während der Meiose weiblicher F1-Tiere und kann mit Hilfe der genetischen Marker identifiziert werden (nähere Erläuterungen s. Text). Symbole: grünes Dreieck, P{ry⁺, *hs-neo*, *FRT42D*; rotes Dreieck, P{w⁺, *hs-myc*45F; blaue Raute, *rpn6*^{2F}- bzw. *rpn6*^{20F}-Allel; Kreis, Centromer.

5.18.2 Homozygot mutante *rpn6*^{20F}-Zellen proliferieren und differenzieren normal während homozygot mutante *rpn6*^{2F}-Zellen zugrunde gehen

Zur Herstellung homozygot mutanter Klone durch FLP/FRT-katalysierte Rekombination bedarf es zum einen einer FLP-Rekombinasequelle und zum anderen zweier homologer FRT-Elemente, von denen eines mit dem mutanten Allel und das andere mit dem entsprechenden Wildtyp-Locus gekoppelt sein muß. Diese genetische Konstitution wird durch das Zusammenkreuzen zweier entsprechender Fliegenstämme erzielt (Abb. 5.21). Einer der benötigten Stämme, nämlich der FRT-Stamm "*rpn6*^{2F}-FRT42D" bzw. "*rpn6*^{20F}-FRT42D" inklusive *Rpn6*-Mutation war bereits

durch meiotische Rekombination hergestellt worden (s. Kap. 5.18.1). Der zweite Fliegenstamm, der sowohl die FLP-Rekombinasequelle als auch das wildtypische FRT-Chromosom zur Verfügung stellen sollte, wurde durch kreuzungsgenetische Standardmethoden ausgehend von den Ursprungslinien BL 1929 des Genotyps $y w, P\{ry^+, hs-FLP\}; Sco/CyO$ und BL 2120 des Genotyps $w; P\{ry^+, hs-neo, FRT\} 42D, P\{w^+, hs-myc\} 45F$ etabliert, so daß der Stamm "hs-FLP; FRT42D" des Genotyps $y w, P\{ry^+, hs-FLP\}; P\{ry^+, hs-neo, FRT\} 42D, P\{w^+, hs-myc\} 45F$ entstand, der stabil bei 18 °C gehalten werden konnte. Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation *hs-FLP*-Transgens wurden virginelle Weibchen dieses Stammes mit Männchen des Stammes "*rpn6^{2F}*-FRT42D" bzw. "*rpn6^{20F}*-FRT42D" gepaart, um in allen F1-Nachkommen FLP-Rekombinase-Expression induzieren zu können.

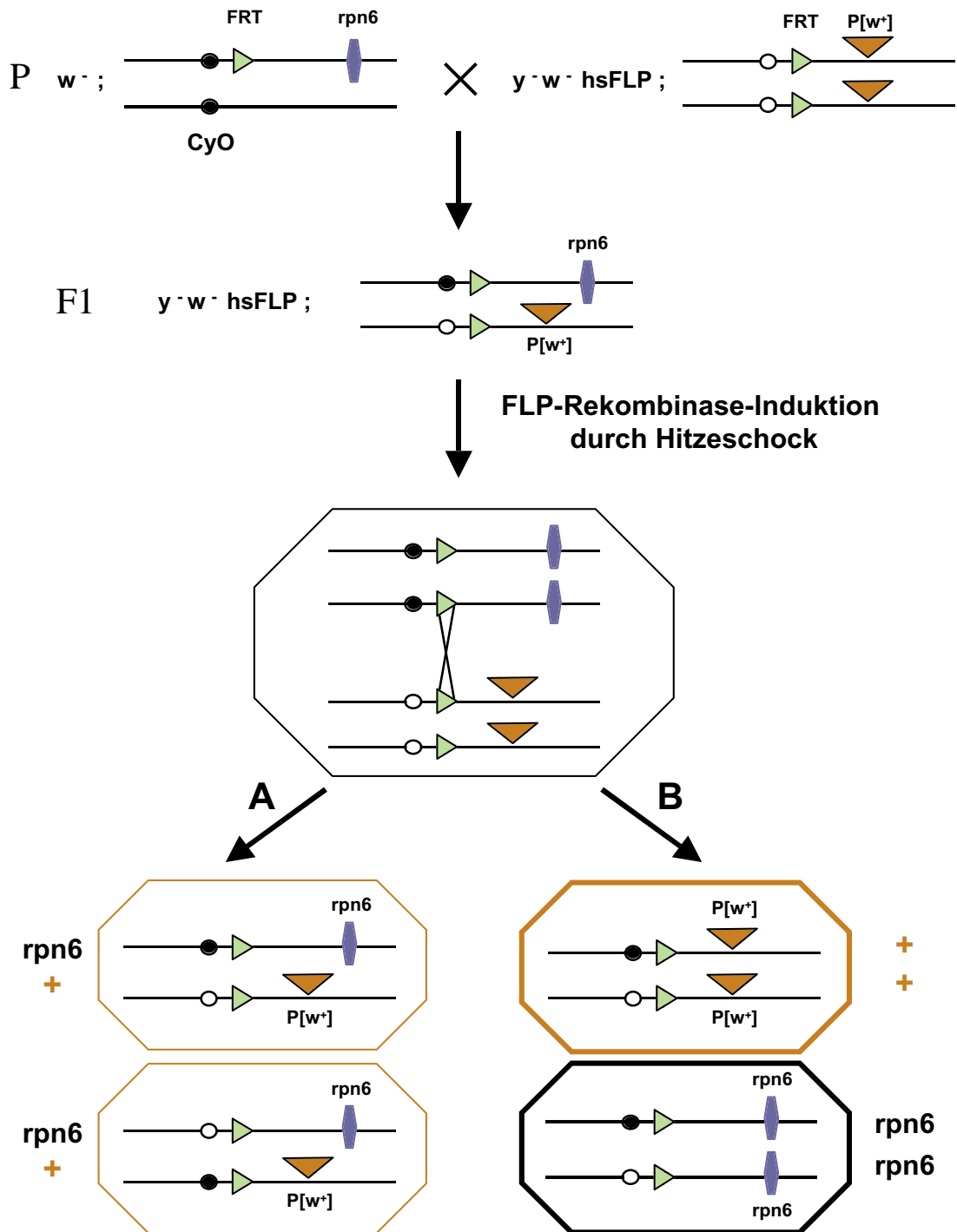


Abb. 5.21 Generierung somatischer *Rpn6*-Mosaik mit Hilfe des FLP/FRT-Systems. Schematische Darstellung der Herstellung und Markierung homozygot mutanter *rpn6^{2F}*- bzw. *rpn6^{20F}*-Klone. Durch eine Hitzeschockbehandlung der F1-Tiere kann in mitotischen Zellen die FLP/FRT-katalysierte, reziproke Rekombination zwischen den Nicht-Schwesterchromatiden der beiden FRT-Chromosomen induziert werden. Je nach Segregation der rekombinanten Chromosomen in der nachfolgenden Mitose können entweder zwei weiterhin heterozygote (*rpn6/+*) Tochterzellen entstehen (Segregationstyp A) oder zwei genotypisch unterschiedliche Tochterzellen (Segregationstyp B), von denen eine homozygot wildtypisch (*+/+*) und die andere homozygot mutant (*rpn6/rpn6*) ist. Durch den Dosiseffekt des distalen, P-Element codierten *white*-Markers kann in adulten Augen auf die Kopienzahl des Transgens und somit auf den Genotyp der Zellen geschlossen werden. Weitere Erklärungen im Text; Symbole wie in Abb. 5.20.

Die Verwendung eines Hitzeschockpromotor-kontrollierten *FLP*-Transgens erlaubt in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Hitzeschockapplikation die ubiquitäre Expression der *FLP*-Rekombinase in allen Zellen eines distinkten Entwicklungsstadiums. Um überhaupt Klone erwarten zu können, muß der Hitzeschock allerdings in einem Stadium verabreicht werden, das durch mitotische Aktivität gekennzeichnet ist. Nur mitotische Zellen können von der *FLP/FRT*-induzierten, mitotischen Rekombination betroffen werden und so zur Entstehung genetisch identischer Tochterzellen bzw. eines Klonen beitragen. Induziert man die mitotische Rekombination zu einem frühen Zeitpunkt, z. B. während des ersten Larvenstadiums, wenn das zu untersuchende Gewebe aus nur wenigen Zellen besteht, ist mit einem sporadischen Auftreten großflächiger Klone zu rechnen. Induziert man die mitotische Rekombination hingegen zu einem späteren Zeitpunkt, z. B. gegen Ende der Larvalentwicklung, so kann, aufgrund der größeren Zellzahl und der damit verbundenen statistisch erhöhten Anzahl von Rekombinationsereignissen, das häufige Auftreten von Klonen geringerer Größe erwartet werden.

Für die Generierung *rpn6^{2F}*- bzw. *rpn6^{20F}*-mutanter Klone, die in adulten Tieren analysiert werden sollten, wurden einstündige Hitzeschockbehandlungen an Embryonen (0-24 Stunden nach Eiablage), an ersten Larven (24-48 Stunden nach Eiablage), an zweiten Larven (48-72 Stunden nach Eiablage), an dritten Larven (72-96 und 96-120 Stunden nach Eiablage) und an Puppen durchgeführt. Da mit Ausnahme des adulten Auges (s. u.) für keines der anderen adulten Gewebe ein Marker verwendet worden war, der z. B. Klone im Flügel oder in der Kutikula als solche gekennzeichnet hätte, wurden alle potentiellen Mosaik-Fliegen auf morphologische Störungen, wie z. B. Deformationen der Flügel oder Beine, Borstendefekte oder andere räumlich begrenzte Aberrationen, untersucht. Im Vergleich zu Geschwistertieren, die zur Kontrolle keiner Hitzeschockbehandlung unterworfen worden waren, wurde jedoch weder in *rpn6^{2F}*- noch in *rpn6^{20F}*-Mosaik-Fliegen eine Häufung von lokalen Strukturveränderungen beobachtet.

In den Augen adulter Mosaik-Tiere konnte die Analyse homozygot mutanter Klone aufgrund des Augenpigmentierungsmarkers *white* wesentlich gezielter durchgeführt werden. Da die *FLP*-katalysierte Rekombination an den *FRT*-Elementen zum Austausch des gesamten distalen Chromosomenarms führt, segregiert das $P\{w^+, hs-myc\}$ -Element an Position 45F des wildtypischen *FRT*-Chromosoms zusammen mit dem wildtypischen *Rpn6*-Locus und markiert so die Zellen, die mindestens eine Wildtypkopie des *Rpn6*-Gens enthalten (Abb. 5.21). Anhand des Pigmentierungsgrades der einzelnen Ommatidien konnte auf den Genotyp der Zellen geschlossen werden. Heterozygote Zellen, die über ein *Rpn6*-mutantes und ein wildtypisches *FRT*-Chromosom und damit über nur eine Kopie des *white*-Markergens verfügten, waren orange gefärbt. Homozygot mutante Klone hingegen enthielten überhaupt keine Kopie des *white*-

Transgens und waren demnach völlig unpigmentiert. Die reziproken homozygot wildtypischen Geschwisterklone verfügten über zwei Kopien des *white*-Reportergens und waren durch die dunkelrote Färbung der Zellen zu erkennen (Abb. 5.22).

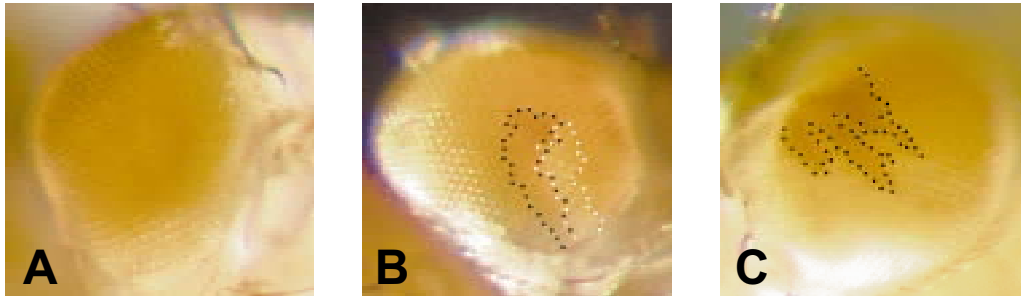


Abb. 5.22 Homozygote Zellen des hypomorphen Allels *rpn6*^{20F} proliferieren und differenzieren sich normal, während homozygote Zellen des Nullallels *rpn6*^{2F} zugrunde gehen und keine Klone im adulten Auge bilden. Die Markierung homo- und heterozygoter Wildtypzellen durch den Marker $P\{w^+, hs\text{-}myc\}45F$ identifiziert homozygot mutante Klone als unpigmentierte Ommatidien. **(A, B)** Augen von heterozygoten Fliegen des Genotyps *w, hs FLP; FRT42D, P(w⁺)/FRT42D, rpn6*^{20F}. **(A)** Kontrolltier, das keiner Hitzeschockbehandlung unterworfen wurde und demnach ausschließlich heterozygote, orangefarbene Ommatidien besitzt. **(B)** Mosaik-Tier mit unpigmentiertem *rpn6*^{20F}-Klon (weiße Punktlinie) und dunkelrotem Geschwisterklon (schwarze Punktlinie). **(C)** Mosaik-Auge einer Fliege des Genotyps *w, hs FLP; FRT42D, P(w⁺)/FRT42D, rpn6*^{2F} mit homozygot wildtypischem Klon (schwarze Punktlinie). In Anwesenheit des Nullallels *rpn6*^{2F} konnten keine unpigmentierten, homozygot mutanten Klone beobachtet werden. Die Klone in B und C wurden durch Hitzeschockbehandlung während des frühen dritten Larvenstadiums (72-84 Stunden nach Eiablage) induziert.

Homozygote Augenklone des hypomorphen Allels *rpn6*^{20F} wurden in der Mehrzahl der Mosaik-Tiere beobachtet und variierten in Anzahl und Größe je nach Zeitpunkt der Hitzeschockapplikation (s. o.). Nicht in allen, aber in den meisten Fällen befanden sich die reziproken, dunkelroten Geschwisterklone in unmittelbarer Nachbarschaft zu den weißen, mutanten Klonen. Die Tatsache, daß die reziproken Geschwisterklone in der Regel gleich groß waren, d. h. daß die beiden ursprünglich einzelnen rekombinanten Geschwisterzellen eine gleiche Anzahl an Tochterzellen hervorgebracht hatten, verdeutlichte, daß die *rpn6*^{20F}-mutanten Zellen normal proliferierten. Da die Ommatidien innerhalb des mutanten Klons und auch die unmittelbar an den Klon angrenzenden wildtypischen Zellen bei der mikroskopischen Betrachtung völlig normal erschienen, konnte gefolgert werden, daß auch die Determination und Differenzierung der verschiedenen ommatidialen Zelltypen offensichtlich normal verlief.

Im Gegensatz dazu konnten in den Augen adulter *rpn6^{2F}*-Mosaik-Tiere niemals weiße, also homozygot mutante *rpn6^{2F}*-Klone beobachtet werden, egal zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die mitotische Rekombination induziert worden war. Das regelmäßige Auftreten dunkelroter, homozygot wildtypischer Klone war jedoch ein eindeutiges Indiz dafür, daß mitotische Rekombination stattgefunden haben mußte. Das völlige Fehlen homozygoter *rpn6^{2F}*-Klone bedeutet, daß die betroffenen Zellen nicht mehr proliferieren können und offensichtlich durch wildtypische Zellen ersetzt werden. Die Tatsache, daß die adulten Mosaik-Augen völlig normal erschienen und keinerlei lokale Strukturveränderung zeigten, die auf einzelne persistierende mutante Zellen hätten zurückgeführt werden können, legt nahe, daß die homozygoten *rpn6^{2F}*-Zellen nach ihrer Entstehung nicht nur vom Proliferationsgeschehen ausgeschlossen waren, sondern auch aus dem Gewebeverband eliminiert wurden. Auch die späte Induktion mitotischer Rekombination in späten dritten Larven und Vorpuppen, also zu einem Zeitpunkt, wo sich einige Zellen der Augenimaginalscheibe ein letztes Mal teilen und bereits eine definierte Zellidentität erlangen, resultierte nicht in lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen einzelner Ommatidien. Auch wenn bei solch einer späten Induktion nicht mit großflächigen Störungen gerechnet werden kann, so hätten einzelne *rpn6^{2F}*-mutante Zellen im Falle einer gestörten Differenzierung durchaus lokale Strukturveränderungen innerhalb einzelner Ommatidien hervorrufen können. Das völlige Ausbleiben derartiger Effekte weist darauf hin, daß der späte Verlust der *Rpn6*-Genaktivität keine Konsequenzen weder für die Differenzierung der einzelnen unmittelbar betroffenen Zellen noch für benachbarte Zellen im Ommatidium hat. Die Analyse der *Rpn6*-mutanten Klone in den Augen adulter Mosaik-Tiere kann auch zur Erklärung des Ausbleibens von Störungen in den anderen untersuchten adulten Strukturen herangezogen werden. Die Residualaktivität des *Rpn6*-Gens in *rpn6^{20F}*-mutanten Klonen erlaubt den betroffenen Zellen normal zu proliferieren und zu differenzieren, so daß sie sich phänotypisch von den umgebenden Wildtypzellen nicht unterscheiden lassen. In *rpn6^{2F}*-mutanten Mosaik-Tieren hingegen kann davon ausgegangen werden, daß auch in den Primordien anderer adulter Strukturen homozygote *rpn6^{2F}*-Zellen aufgrund von Proliferationsstörungen zugrunde gehen und deshalb nicht zur Entstehung der adulten Gewebe beitragen.

5.19 Weder die ektopische Expression von Rpn6 noch die ektopische Koexpression von Rpn6 und Alien/CSN2 verursacht spezifische Entwicklungsstörungen

Um zu überprüfen, ob nicht nur der Verlust der *Rpn6*-Genaktivität, sondern möglicherweise auch eine verstärkte *Rpn6*-Expression spezifische Entwicklungsstörungen verursacht, wurde *Rpn6* mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems ektopisch exprimiert (vgl. Kap. 5.5). Dazu wurde zunächst die vollständige *Rpn6*-cDNA als *EcoRI/KpnI*-Fragment aus LD18931 isoliert und in 5'-3'-Orientierung stromabwärts des UAS-Promotors eines *EcoRI/KpnI*-linearisierten pUAST-Vektors eingefügt. Die Transformation dieses Konstrukts lieferte mehrere unabhängige transgene "UAS-*Rpn6*"-Fliegenlinien, in denen das Transgen entweder auf dem zweiten, dem dritten oder dem X-Chromosom lokalisiert wurde.

Außerdem wurde durch Kreuzung der markierten "UAS-*Rpn6*"-Linie 4A, die das "UAS-*Rpn6*"-Transgen auf dem dritten Chromosom trägt, mit der markierten "UAS-Alien"-Linie 329.9, die das "UAS-Alien"-Transgen auf dem zweiten Chromosom trägt, eine Fliegenlinie erzeugt, die die simultane Koexpression von *Rpn6* und Alien/CSN2 erlaubt.

Zur ektopischen Expression von *Rpn6*- bzw. zur Koexpression von *Rpn6* und Alien/CSN2 wurden homozygote Fliegen der entsprechenden Linien mit einer Reihe stadien- und gewebespezifischer GAL4-Aktivatorlinien gekreuzt (s. Kap. 5.5). Wie im Falle von Alien/CSN2, führte weder die alleinige Expression von *Rpn6* noch die Koexpression mit Alien/CSN2 in embryonalen oder larvalen Geweben zu morphologischen Aberrationen oder verminderter Vitalität in den transheterozygoten Nachkommen. Das Ausbleiben spezifischer Entwicklungsstörungen weist darauf hin, daß eine erhöhte *Rpn6*-Dosis, auch in Anwesenheit einer erhöhten Dosis des vermeintlichen Interaktionspartners Alien/CSN2, toleriert wird. Diese Beobachtung liefert jedoch keine Anhaltspunkte für eine direkte Wechselwirkung der beiden Genprodukte *in vivo*.

6. Diskussion

Der gezielte Abbau zellulärer Proteine ist für die eukaryontische Zelle und somit auch für die Entwicklung vielzelliger Organismen von eminenter Bedeutung. Das Ubiquitin-Proteasom-System bewirkt neben der Beseitigung fehlerhafter Genprodukte auch die Eliminierung regulatorischer Proteine und kontrolliert auf diese Weise eine Reihe essentieller Signalwege. Während die enzymatischen Vorgänge innerhalb der Ubiquitinylierungskaskade hinlänglich bekannt sind, rückt die Frage nach der Regulation der einzelnen Reaktionsschritte zunehmend in den Vordergrund. Mit der Isolierung und Charakterisierung des evolutionär hochkonservierten Signalosom-Komplexes ist es vor allem in *Arabidopsis*, Säugerzellen und *S. pombe* gelungen, einen Regulator für verschiedene Teilprozesse des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus zu identifizieren.

Mit der entwicklungsbiologischen Charakterisierung der Signalosom-Untereinheit Alien/CSN2 in *Drosophila* sollte ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Funktion des Signalosoms im tierischen Organismus geleistet werden. Verschiedene Bemühungen, das *alien/CSN2*-Gen zu mutagenisieren, blieben zwar erfolglos, dennoch liefern z. B. das *alien/CSN2*-Expressionsmuster und auch die physikalische Interaktion mit der 19S RP-Deckelkomplex-Komponente Rpn6 interessante Hinweise zur Funktion des Signalosom-Komplexes während der Entwicklung von *Drosophila*. Die genetische Analyse von Rpn6 vermittelt überdies erstmalig Einblicke in die entwicklungsbiologische Relevanz des Signalosom-verwandten 19S RP-Deckelkomplexes.

Im folgenden sollen deshalb die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund des aktuellen Kenntnisstandes zur Funktion des Signalosoms, aber auch einige methodische Aspekte diskutiert werden.

6.1 Die Funktionsanalyse des *alien/CSN2*-Gens *in vivo* scheitert an der eingeschränkten reversen Genetik von *Drosophila*

6.1.1 Das *alien/CSN2*-Gen in *Drosophila* – ein *Cold Spot*?

Drosophila stellt insbesondere wegen ihrer außerordentlich gut charakterisierten und unkomplizierten Genetik einen der attraktivsten vielzelligen Modellorganismen dar. Die Analyse entwicklungsrelevanter Gene wird durch das Vorhandensein einer Vielzahl genetischer und molekularer Marker, durch ein effizientes Transformationssystem und nicht zuletzt durch die Verfügbarkeit einer stetig wachsenden Zahl von P-Element-Insertionslinien erheblich erleichtert. Der entscheidende Nachteil gegenüber anderen Modellorganismen, wie z. B. Maus oder Hefe, ist jedoch das Fehlen eines effizienten Knock Out-Systems zur gezielten Mutagenisierung einzelner Gene. Zwar konnten Rong & Golic kürzlich eine *Drosophila*-spezifische Knock Out-Methode etablieren, die aber aufgrund ihrer noch sehr mangelhaften Effizienz bislang noch keine breite Anwendung gefunden hat (Rong & Golic, 2000; Rong & Golic, 2001; Rong *et al.*, 2002).

Die Isolierung genspezifischer Mutationen in *Drosophila* ist demzufolge weiterhin von Zufallsereignissen abhängig, die allerdings kreuzungsgenetisch relativ schnell und genau lokalisiert werden können. Eine Möglichkeit, die Zufälligkeit von Mutationsereignissen auf einen definierten genomischen Bereich zu beschränken, besteht in der Remobilisation von P-Elementen. P-Element-Transposons reintegrieren bevorzugt in der Nähe ihrer ursprünglichen Insertionsstelle, selten weiter als 100 kb entfernt (Tower *et al.*, 1993; Zhang & Spradling, 1993). Für die Mutagenisierung des *alien/CSN2*-Genlocus bot sich daher die Remobilisierung zweier unabhängiger P-Elemente an, die 7-8 kb stromabwärts der *alien/CSN2*-Transkriptionseinheit lokalisiert worden waren (BDGP).

Die Remobilisierung des P{*lacW*}-Elements P2042 wurde zu einem Zeitpunkt durchgeführt, als die *alien/CSN2*-defizienten Fliegenlinien noch nicht zur Verfügung standen und somit keine Möglichkeit zur Komplementationsanalyse bestand. Alle der resultierenden 480 potentiellen *Local Hop*-Linien erwiesen sich als homozygot letal, so wie auch schon die Ausgangslinie P2042. Mit der späteren Erkenntnis, daß die Letalität der Ausgangslinie P2042 nicht von der P-Element-Integration, sondern von einer zweiten, unbekanntem Mutation auf demselben Chromosom verursacht wurde, wurde klar, daß auch die ausnahmslose Letalität der 480 etablierten *Local Hop*-Linien in erster Linie auf diese Zweitmutation zurückgeführt werden mußte. In diesem mutanten Hintergrund konnten Mutationen, die durch ein *Local Hop*-Ereignis induziert worden waren, phänotypisch nicht identifiziert werden. Da jedoch alle 480 *Local Hop*-

Linien molekulargenetisch analysiert wurden, konnte ausgeschlossen werden, daß sich darunter eine spezifische Integration in den *alien/CSN2*-Locus befand. Im nachhinein kann also festgestellt werden, daß auch eine gewisse Anzahl von vermeintlich homozygot vitalen P-Element-Remobilisationsereignissen untersucht worden war. Dieser Sachverhalt ist insofern von Belang, als daß sich das *Local Hop*-Experiment mit *P2042* dadurch qualitativ von dem *Local Hop*-Experiment mit *EP2569* unterscheidet. Entsprechend der Arbeitshypothese, daß der Funktionsverlust des *alien/CSN2*-Gens phänotypische Konsequenzen, wie Letalität oder Sterilität, verursache, wurden potentielle *EP2569-Local Hop*-Linien, die keines dieser Kriterien erfüllten, keiner weiteren Analyse unterzogen. Sollte sich also in einer dieser vitalen Linien eine P-Element-Integration in das *alien/CSN2*-Gen ereignet haben, so ist sie unbemerkt geblieben.

Die Ineffektivität der beiden *Local Hop*-Experimente, in denen insgesamt 912 potentielle *Local Hop*-Linien erzeugt wurden, ist wahrscheinlich in erster Linie auf das Transpositionsverhalten der P-Elemente zurückzuführen. So hängt zum Beispiel die Transpositionsfrequenz nicht nur von der Art des P-Element-Vektors, sondern auch von seiner Startposition ab. Systematische Untersuchungen zeigten, daß die Transpositionsraten verschiedener P-Elemente nach Remobilisation durch eine genomische Transposasequelle zwischen 1 und 13 % variieren können (Berg & Spradling, 1991; Tower *et al.*, 1993; Zhang & Spradling, 1993). Demzufolge können keine allgemeingültigen Aussagen darüber getroffen werden, welche Transpositionsfrequenz für ein spezifisches P-Element erwartet werden kann. Auch wenn keine statistische Auswertung der *Local Hop*-Experimente betrieben wurde, so sollte dennoch festgehalten werden, daß nach der Remobilisation von *EP2569* in ca. 100 der insgesamt 432 etablierten Linien, also in knapp einem Viertel der untersuchten Linien, ein entweder an veränderter Augenfarbe, interchromosomaler Transposition oder ein am Phänotyp erkennbares Transpositionsereignis stattgefunden hatte. Im Fall von *P2042* wurden bei ca. 16 % der 480 potentiellen *Local Hop*-Linien eindeutige Transpositionsereignisse beobachtet.

Auch wenn in Anbetracht der Erfolglosigkeit der beiden *Local Hop*-Experimente vermutet werden muß, daß die absolute Anzahl der untersuchten Transpositionsereignisse statistisch unzureichend war, so stellt sich jedoch die Frage, inwiefern die Wahrscheinlichkeit, den *alien/CSN2*-Locus mindestens einmal zu treffen, mit der absoluten Anzahl der untersuchten *Local Hop*-Ereignisse überhaupt korreliert. Neueste Untersuchungen bestätigen die lang gehegte Vermutung, daß P-Elemente nicht vollkommen zufällig in jeden beliebigen genomischen Bereich integrieren können. Beobachtungen, wie die Häufung von P-Element-Insertionen in euchromatischen Regionen oder die deutliche Tendenz zur Integration in die 5'-Bereiche von Genloci, bestärkten die Annahme, daß die lokale Chromatinstruktur einen Einfluß auf das

Insertionsvermögen transponierbarer Elemente hat. Die systematische Analyse tausender P-Element-Insertionsstellen zeigte, daß zwar keine Konsensus-Zielsequenz existiert, daß aber die 8 bp-Zielsequenz (*target site*) der Transposase durch einen GC-Reichtum gekennzeichnet ist (Liao *et al.*, 2000). Die Präferenz der Transposase für bestimmte Zielsequenzen resultiert demnach eher aus der Struktur der Ziel-DNA als aus der primären Nukleotidsequenz. Durch diese differentielle Zugänglichkeit verschiedener genomischer Bereiche für die Insertion von P-Elementen ist auch das Phänomen der sog. *Hot Spots*, dem überdurchschnittlich hohen Vorkommen von P-Element-Insertionsereignissen an spezifischen Stellen im Genom, zu verstehen. Die P-Element-Insertionsmutagenese des BDGP, bei der u. a. die Verteilung der gesammelten P-Element-Integrationen systematisch untersucht wurde, ermöglichte die Klassifizierung sog. *Hot Spot*-, *Warm Spot*- und *Cold Spot*-Gene (Spradling *et al.*, 1999); für das zweite Chromosom wurden 47 *Hot Spot*-, 177 *Warm Spot*- und 1097 *Cold Spot*-Gene vorhergesagt. Die Mehrzahl der Gene zeichnet sich also durch eine relativ geringe Empfänglichkeit für P-Element-Insertionen aus.

Die Tatsache, daß weder in einer der genomweiten P-Element-Insertionsmutagenesen des BDGP noch bei der in dieser Arbeit durchgeführten lokalen P-Element-Mutagenese eine Insertion in den *alien/CSN2*-Locus erzielt werden konnte, deutet darauf hin, daß es sich bei *alien/CSN2* um ein typisches *Cold Spot*-Gen handelt. Die geringe Mutagenisierbarkeit des *alien/CSN2*-Locus mag teilweise auch darauf zurückzuführen sein, daß es sich bei dem 5'-Bereich des benachbarten *rost*-Gens offensichtlich um einen *Warm* oder *Hot Spot* zu handeln scheint. Immerhin konnten für diesen Locus gleich drei unabhängige P-Element-Insertionen, *P2042*, *EP2569* und *P20* (Paululat *et al.*, 1997), erzeugt werden. Daß eine derartige gegenseitige Beeinflussung im Sinne positiver bzw. negativer Interferenz zwischen zwei benachbarten Loci existiert, ist allerdings rein spekulativ.

Auch wenn die *Local Hop*-Experimente letztendlich erfolglos blieben, so können doch wichtige Rückschlüsse gezogen werden, die bei der Planung zukünftiger Mutagenese-Strategien berücksichtigt werden sollten. Für den Fall einer erneuten P-Remobilisierung sollte zur Erhöhung der Trefferwahrscheinlichkeit eine möglichst große Zahl potentieller *Local Hop*-Linien etabliert werden. Um das Auftreten redundanter, prämeiotischer Transpositionereignisse zu verringern, sollte nach Möglichkeit von vielen unabhängigen Jumpstarter-Tieren ausgegangen werden, von denen wiederum nur zwei bis vier Nachkommen, vornehmlich solche mit veränderter Augenfarbe, etabliert werden sollten.

Aufgrund des genetischen *Cold Spot*-Charakters des *alien/CSN2*-Locus sollte jedoch konsequenterweise eine chemische EMS-Mutagenese favorisiert werden. Im Gegensatz zur P-

Element-Insertion wirkt das alkylierende Agens Ethylmethansulfonat absolut ungerichtet und sollte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auch zu einer Mutation im *alien/CSN2*-Gen führen. Mit Hilfe der *alien/CSN2*-Defizienzen BL 368, BL 384 und BL 2892 und der überlappenden Defizienz BL 3702 könnten in sukzessiven Komplementationsanalysen letale Mutationen selektiert werden, die zwischen dem proximalen Bruchpunkt von BL 3702 und dem distalen Bruchpunkt von BL 368 kartieren (s. Abb. 5.4).

6.1.2 Die Problematik der RNAi-Methode

Aufgrund des Fehlens einer *alien/CSN2*-spezifischen Mutante wurde alternativ versucht, den Funktionsverlust des *alien/CSN2*-Gens durch posttranskriptionelles Gen-Silencing herbeizuführen. Zu diesem Zweck wurde die inzwischen vielfach erfolgreich angewandte RNA-Interferenz-Strategie (RNAi) verfolgt, die die Applikation Transkript-spezifischer, doppelsträngiger RNA-Moleküle (dsRNA) erfordert (Fire *et al.*, 1998).

Der klassische Weg zur Einschleusung von dsRNA in *Drosophila*-Embryonen ist die Injektion *in vitro*-synthetisierter doppelsträngiger RNA. Auf diese Weise konnte eine Reihe genspezifischer Mutationen, wie z. B. *frizzled*, *even-skipped* und *fushi tarazu* (Kennerdell & Carthew, 1998), die sich durch distinkte embryonale Phänotypen auszeichnen, erfolgreich phänokopiert werden. Für die beiden Gene *tramtrack* und *discs lost*, die bereits während der Oogenese in Form von maternalen Transkripten in die Oocyte eingelagert werden, konnten mit Hilfe der dsRNA-Injektion nicht nur die bekannten zygotischen Funktionen verifiziert, sondern zusätzlich weitere Funktionen für die maternale Komponente charakterisiert werden (Kennerdell & Carthew, 1998; Bhat *et al.*, 1999). In einigen Fällen unterschieden sich jedoch die RNAi-induzierten Phänokopien von den korrespondierenden Nullmutanten. Die Injektion von *wingless* (*wg*)-dsRNA erzeugte lediglich lokale, auf die Injektionsstelle begrenzte *wg*-typische Störungen in der Cuticula, die in Nullmutanten den gesamten Embryo betreffen (Kennerdell & Carthew, 1998). Besonders fragwürdige Ergebnisse lieferte die Injektion doppelsträngiger *nautilus* RNA, die schwerwiegende, muskelspezifische Störungen verursachte (Misquitta & Paterson, 1999). Echte *nautilus* Nullmutanten, die erst im nachhinein identifiziert wurden, weisen allerdings nur so minimale Muskeldefekte auf, daß sie homozygot lebensfähig sind (Balagopalan *et al.*, 2001).

Die Injektion doppelsträngiger *alien/CSN2*-RNA hatte im Vergleich zu Negativ-Kontroll-Injektionen keine Vitalitäts-mindernden Konsequenzen. Diese Beobachtung kann zum einen so interpretiert werden, daß der Verlust der maternalen und zygotischen *alien/CSN2*-Expression keine Folgen für die Entwicklung für *Drosophila* hat. Das Ausbleiben larvaler, pupaler oder

adulter Phänotypen könnte damit erklärt werden, daß in *Drosophila*, anders als in *C. elegans*, die Penetranz von embryonal induzierten RNAi-Effekten im Laufe der Entwicklung sukzessive abnimmt. Während für *C. elegans* besonders die räumliche und zeitliche Expansion von RNAi-Effekten, wie z. B. die Zell- bzw. Organ-übergreifende Ausbreitung von RNAi-Effekten oder die Persistenz bis in die F1-Generation, charakteristisch ist, konnten nach dsRNA-Injektion in *Drosophila*-Embryonen nur in sehr seltenen Fällen adulte Phänotypen erzeugt werden (Fire *et al.*, 1998; Timmons & Fire, 1998; Misquitta & Paterson, 1999). Da es jedoch versäumt wurde, eine Positiv-Kontrolle durchzuführen, die unter den gleichen experimentellen Bedingungen einen distinkten Phänotyp hätte hervorbringen müssen, muß zum anderen auch eine technische Ursache für das Ausbleiben *alien/CSN2*-spezifischer Phänotypen in Betracht gezogen werden.

Um einerseits die aufwendige Wiederholung der dsRNA-Injektionsexperimente und andererseits die vermeintliche Stadienspezifität zu umgehen, wurde alternativ versucht, mit Hilfe eines *alien/CSN2*-Transgens RNAi-Effekte zu induzieren. Diese Strategie wurde in *C. elegans* wie auch in *Drosophila* mehrfach erfolgreich angewandt. Allerdings kamen dabei sog. IR-Konstrukte (*inverted repeat*) zum Einsatz, die die Expression selbstkomplementärer Transkripte und somit die Entstehung intramolekularer doppelsträngiger RNA-Moleküle erlaubten (Lam & Thummel, 2000; Tavernarakis *et al.*, 2000). Da die Herstellung eines *alien/CSN2*-IR-Konstruktes aus klonierungstechnischen Gründen nicht möglich war (s. Kap. 5.4.2), wurde ein Transgen konstruiert, das an beiden Enden von jeweils einem UAS-Promotorelement flankiert wurde und so die simultane Transkription der beiden gegenläufigen RNAs ermöglichen sollte. Wie mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung einzelsträngiger RNA-Sonden gezeigt werden konnte, findet in der Tat eine spezifische und auch effiziente Expression sowohl der *alien/CSN2-sense*- als auch der *antisense*-Transkripte statt. Die Tatsache, daß nach embryonaler, larvaler oder adulter Aktivierung dennoch keine spezifischen Phänotypen beobachtet werden konnten, läßt sich wie auch schon im Falle der Injektionsexperimente so interpretieren, daß entweder der Funktionsverlust von *alien/CSN2* keine Entwicklungsstörungen bewirkt oder aber daß auch dieses Verfahren nicht zur Induktion RNAi-abhängiger Phänotypen geeignet ist. Da die ektopische Expression eines Alien/CSN2-GFP-Fusionsproteins keine erkennbare Inhibition durch die symmetrische Transkription des *alien/CSN2*-Konstrukts erfährt, muß indes eher von einer mangelnden Zweckdienlichkeit des Konstrukts ausgegangen werden. In diesem Zusammenhang sollte allerdings auch auf die eingeschränkte Effektivität der klassischen IR-Konstrukte eingegangen werden. Verschiedene Autoren, die durch die larvale Expression von IR-Konstrukten Knock Out-Phänotypen für Gene wie *white*, *yellow*, *transformer-2* oder *period* erzeugen wollten, die sich in adulten Fliegen manifestieren, beobachteten fast ausnahmslos

schwächere Phänotypen als sie für die entsprechenden Nullmutanten bekannt sind (Fortier & Belote, 2000; Martinek & Young, 2000; Piccin *et al.*, 2001; Giordano *et al.*, 2002). Offensichtlich bewirkt die Expression von IR-Konstrukten *in vivo* in erster Linie keinen totalen, sondern einen partiellen Funktionsverlust und ist demzufolge eher als Knock Down- denn als Knock Out-Methode zu verstehen. Neueste Untersuchungen, die die Silencing-Effekte von IR-Konstrukten mit entsprechenden, symmetrisch transkribierten Konstrukten vergleichen, kommen zu dem Schluß, daß die Silencing-Wirkung von symmetrisch transkribierten Konstrukten gegenüber IR-Konstrukten noch schwächer ist und nur zum Teil durch eine Erhöhung der Transgen-Dosis kompensiert werden kann (Giordano *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). Dieser qualitative Unterschied wird darauf zurückgeführt, daß die Bildung haarnadelförmiger Doppelstrang-RNA-Moleküle gegenüber der Hybridisierung von einzelnen *sense*- und *antisense*-Transkripten begünstigt ist (Giordano *et al.*, 2002).

Auf diesem Hintergrund muß die Tatsache, daß mit der symmetrischen Expression des *alien/CSN2*-Transgens keine Phänokopien erzeugt werden konnten, noch von einer anderen Seite betrachtet werden. Aufgrund der ergiebigen Transkription beider Einzelstrang-RNAs kann durchaus davon ausgegangen werden, daß es, wenn auch mit geringerer Effizienz, zur Bildung von *alien/CSN2*-dsRNA-Molekülen und somit zu einem partiellen Silencing des *alien/CSN2*-Gens gekommen ist. Der Versuch, den Silencing-Effekt indirekt durch die Repression eines ektopisch exprimierten *Alien/CSN2*-GFP-Fusionsprotein zu quantifizieren, könnte auch daran gescheitert sein, daß ein nicht unerheblicher Anteil der GFP-Fluoreszenz auf der Anwesenheit von freiem, unfusioniertem GFP-Protein beruht. Western Blot-Analysen zeigten, daß in den Speicheldrüsen dritter Larven neben dem ektopisch exprimierten *Alien/CSN2*-GFP-Fusionsprotein auch eine Fraktion an freiem GFP nachweisbar ist (Bodderas, 2000). Es stellt sich also die Frage, inwiefern ein partieller, sprich Dosis-abhängiger Funktionsverlust des *alien/CSN2*-Gens, wie er möglicherweise durch die symmetrische Transkription des *alien/CSN2*-Konstruktes hervorgerufen wurde, überhaupt die Entstehung spezifischer Phänotypen begünstigen kann. Wenn der Silencing-Effekt nicht mindestens eine 50%ige Reduktion der endogenen *alien/CSN2*-Aktivität zur Folge hat, sind keine phänotypischen Konsequenzen zu erwarten. Schließlich liefert auch keine der *alien/CSN2*-Defizienzen, die über nur eine Kopie der *alien/CSN2*-Transkriptionseinheit verfügen, Hinweise auf einen Dosis-Effekt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit Hilfe der RNAi-Experimente keine Aussage über die entwicklungsbiologische Relevanz des *alien/CSN2*-Gens getroffen werden kann. Trotzdem sollte in Anbetracht der essentiellen Funktionen der Signalosom-Untereinheiten CSN4 und CSN5,

deren Funktionsverluste larvale Letalität hervorrufen, für Alien/CSN2 weiterhin eine unverzichtbare Funktion postuliert werden.

Um in zukünftigen Experimenten dennoch die außerordentlichen Vorteile der RNAi-Methode ausnutzen zu können, sollte nochmals mit Nachdruck versucht werden, ein effizienteres *alien/CSN2-inverted repeat*-Konstrukt herzustellen. Inzwischen wurden verschiedene Sequenzelemente, wie z. B. genfremde Spacer (Piccin *et al.*, 2001) oder Intron-Sequenzen (S. Breuer, pers. Mitteilung), erfolgreich zur Trennung der beiden gegenläufigen Fragmente eingesetzt, um die Klonierungseffizienz der IR-Konstrukte zu erhöhen. Als sinnvolle Positiv-Kontrolle böte sich ein analoges Experiment mit dem larval letalen *CSN4*-Gen an, das ebenfalls eine Signalosom-Untereinheit codiert. Sollte das RNAi-induzierte Silencing von *CSN4* ausreichen, um einen Phänotyp zu verursachen, der dem Nullphänotyp ähnelt, so sollte ein analoges Experiment gleichermaßen Aufschluß über die Funktion von Alien/CSN2 geben. Um von vornherein die Gendosis des zu inhibierenden Gens zu verringern, könnten die RNAi-Transgene auch in entsprechende, defiziente Linien eingekreuzt werden. In diesem heterozygot mutanten Hintergrund, der nur eine Wildtyp-Kopie des betreffenden Locus bereitstellt, könnte ein zusätzlicher Funktionsverlust möglicherweise additiv wirken und weitreichendere Konsequenzen nach sich ziehen.

Würde sich allerdings herausstellen, daß der partielle Funktionsverlust von *CSN4* ebenfalls keine phänotypischen Auswirkungen hat, weil die notwendige zelluläre Signalosom-Konzentration nicht unterschritten wird, so könnte die RNAi-Strategie zur Analyse der Alien/CSN2- bzw. der Signalosom-Funktion *in vivo* in zukünftigen Experimenten vernachlässigt werden.

6.2 Allgemeine und spezielle Limitationen des Hefe 2-Hybrid Screens mit Alien/CSN2 als Köderprotein

Angesichts der mangelnden Aussagekraft der Untersuchungen zur Funktion von Alien/CSN2 *in vivo* wurde mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid-Verfahrens alternativ versucht, durch die Identifizierung von interagierenden Proteinen einen molekularbiologischen Zugang zur Funktion von Alien/CSN2 zu bekommen.

Die Durchmusterung von ca. $2,6 \times 10^5$ embryonalen cDNA-Klonen lieferte zunächst 92 Kandidaten, die für potentielle Alien/CSN2-interagierende Proteine oder Proteinfragmente codierten. Aufgrund von Sequenzanalysen konnten bereits zwei Drittel der isolierten Klone als eindeutig Falschpositive verworfen werden (s. Tab. 5.I). Von den übrigen Beuteproteinen wurden acht Kandidaten ausgewählt, die angesichts ihrer funktionellen Eigenschaften und im

Hinblick auf die Funktion von Alien/CSN2 als Signalosom-Untereinheit bzw. Corepressor für eine Kooperation mit Alien/CSN2 besonders in Frage kamen. Die gezielte Analyse dieser acht Kandidaten in weiteren Hefe 2-Hybrid-Experimenten konnte jedoch lediglich Rpn6, eine Untereinheit des 19S RP-Deckelkomplexes des 26S Proteasoms, als spezifischen Alien/CSN2-Interaktionspartner identifizieren. Bemerkenswerterweise hatte bereits die Durchmusterung der cDNA-Bibliothek gleich drei unabhängige Rpn6-codierende Beuteplasmide hervorgebracht; eine Besonderheit, die ansonsten in nur einem einzigen weiteren Fall, nämlich für GH09031, einem EST unbekannter Funktion, beobachtet werden konnte.

Abgesehen von der interessanten Interaktion von Alien/CSN2 mit Rpn6, die im nächsten Kapitel ausführlich diskutiert werden soll, konnte der Hefe 2-Hybrid Screen nicht zur Isolierung neuartiger Interaktionspartner verhelfen und somit auch keine innovativen Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung von Alien/CSN2 an bestimmten Signalwegen liefern. Überdies konnten auch keine der erwarteten oder sogar bekannten Interaktionspartner, wie etwa weitere Signalosom-Untereinheiten, Culline oder vielleicht Kernhormonrezeptoren, isoliert werden. Im Hinblick auf zukünftige Experimente sollen im folgenden mögliche Ursachen für die geringe Ausbeute erörtert werden.

Grundsätzlich müssen in diesem Zusammenhang die allgemeinen Limitationen der Hefe 2-Hybrid Methode einerseits und die speziellen Eigenarten von Alien/CSN2 andererseits berücksichtigt werden. Einer der ausschlaggebenden Faktoren ist die Qualität der cDNA-Bibliothek. Die hier verwendete cDNA-Bibliothek wurde ursprünglich durch die ungerichtete Klonierung von cDNAs, die mit Hilfe von polyT-Oligonukleotiden revers transkribiert worden waren, hergestellt (Yu *et al.*, 1999). Da die Expression eines funktionellen GAL4-AD-Beuteproteins nur dann möglich ist, wenn die cDNA in der richtigen Orientierung und im richtigen Leseraster ligiert wurde, ist statistisch betrachtet überhaupt nur ein Sechstel aller Klone in der Lage, ein GAL4-AD-Fusionsprotein zu exprimieren. Unter diesen Umständen ist es absolut notwendig, eine möglichst große Anzahl unabhängiger Klone zu durchmustern, um die Wahrscheinlichkeit, jedes embryonal exprimierte Gen mindestens einmal zu treffen, zu maximieren. Für *Drosophila* werden insgesamt ca. 13500 Gene vorhergesagt, von denen allerdings nur ein Teil während früh-embryonaler Stadien exprimiert ist (Adams *et al.*, 2000). Vorausgesetzt die verwendete cDNA-Bibliothek würde jedes embryonale Transkript mindestens einmal als funktionelles GAL4-AD-Fusionsgen repräsentieren, so müßte rein theoretisch eine Durchmusterung von 8×10^4 Klonen (6×13500) ausreichen, um jedes Transkript mindestens einmal zu treffen. Da jedoch stark exprimierte Gene gegenüber schwach exprimierten Genen verhältnismäßig häufiger in der cDNA-Bibliothek vertreten sein werden, wird üblicherweise eine

Anzahl von 10^6 zu durchmusternden Klonen angestrebt, um eine weitestgehende Sättigung zu erzielen (Prof. L. Pick, persönliche Mitteilung). Die mit GAL4-DBD-Alien/CSN2 durchmusterter Zahl von $2,6 \times 10^5$ Klonen war also wahrscheinlich einfach zu gering, um alle Kandidatenproteine statistisch erfassen zu können.

Eine weitere Besonderheit der hier verwendeten cDNA-Bibliothek basiert auf der Tatsache, daß die cDNAs unter Verwendung eines polyT-Oligonukleotids generiert wurden. Mit Ausnahme einiger Transkripte mit internen oligoA-Sequenzen wurden auf diese Weise vornehmlich polyadenylierte mRNAs vom 3'-Ende her revers transkribiert, so daß eine Anreicherung C-terminaler Bereiche zu erwarten ist. Da die reverse Transkription insbesondere bei langen Transkripten häufig abbricht, bevor eine vollständige cDNA synthetisiert wurde, ist die Isolierung von Interaktionspartnern, deren Wechselwirkung mit Alien/CSN2 auf N-terminalen Interaktionsdomänen beruht, weitestgehend aussichtslos. Die Isolierung dreier partieller *Rpn6*-cDNAs, die im 5'-Bereich unterschiedlich stark verkürzt waren, veranschaulicht eben diese Problematik.

Eine andere, allgemeingültigere Einschränkung des Hefe 2-Hybrid Systems ergibt sich durch die grundlegende Voraussetzung, daß die kotransformierten Hefezellen uneingeschränkt proliferieren können müssen, um überhaupt als positive Kandidaten-Klone in Erscheinung treten zu können. Unter Umständen wirkt sich jedoch die konstitutive Expression heterologer Proteine in *S. cerevisiae* schädlich auf das Wachstum der Zellen aus. Für Beuteproteine, die von sich aus toxisch auf die Hefezellen wirken, besteht also im Hefe 2-Hybrid System von vornherein keine Chance, als Interaktionspartner eines Köderproteins identifiziert zu werden.

Neben diesen generellen Vorbehalten des Hefe 2-Hybrid Systems müssen auch die möglicherweise limitierenden Eigenschaften des Köderproteins berücksichtigt werden. Im speziellen Fall von Alien/CSN2, einem integralen Bestandteil des Signalosoms, könnte beispielsweise die Abwesenheit des Komplexes einen entscheidenden Einfluß auf die Topologie und somit das Interaktionsvermögen der unkomplexierten Untereinheit haben. Derartige strukturelle Abweichungen können zum einen Wechselwirkungen, die *in vivo* tatsächlich stattfinden und von funktioneller Relevanz sind, blockieren und zum anderen aber auch neuartige, falschpositive Wechselwirkungen, die zwar spezifisch erscheinen, aber in Wirklichkeit keine funktionelle Rolle spielen, begünstigen. In diesem Zusammenhang müssen noch zwei weitere System-inhärente Aspekte der Hefe 2-Hybrid Methode berücksichtigt werden. Erstens, da grundsätzlich zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen spezifische posttranslationale Modifikationen der beteiligten Partner erfordern, die die Hefezelle nicht leisten kann, sind Wechselwirkungen, die von solchen Modifikationen abhängig sind, schwerlich zu erwarten.

Zweitens, auch die Anwesenheit der heterologen, N-terminal fusionierten GAL4-Domänen kann störende intramolekulare Strukturveränderungen innerhalb des Köder- oder Beuteproteins bedingen.

Bemerkenswerterweise konnte in einer umfangreichen Hefe 2-Hybrid Studie, die u. a. der Aufklärung der wechselseitigen Interaktionen innerhalb des Signalosom-Komplexes aus *Arabidopsis* dienen sollte, für die CSN2-Untereinheit keine einzige Interaktion mit einer der übrigen CSN-Untereinheiten nachgewiesen werden (Fu *et al.*, 2001). Die direkte Hefe 2-Hybrid Analyse verschiedener Signalosom-Untereinheiten aus *Drosophila* zeigte hingegen, daß *Drosophila* CSN2 mit den Untereinheiten CSN5, CSN7 und mit sich selbst interagiert (Freilich *et al.*, 1999). Zwar handelt es sich in diesen beiden Untersuchungen um CSN2-Proteine unterschiedlicher Herkunft; aufgrund der evolutionären Konservierung des Komplexes und der einzelnen Untereinheiten sollten jedoch auch vergleichbare Interaktionsmuster innerhalb der Signalosom-Komplexe erwartet werden. Vielmehr scheint die Verwendung unterschiedlicher Hefe 2-Hybrid Systeme, wie z. B. GAL4- vs. LexA-basierte Systeme, unterschiedlicher Hefestämme oder Reportergene, und die damit verbundene unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Verfahren maßgeblich zu den diskrepanten Ergebnissen verschiedener Untersuchungen beizutragen. Bei dieser Gelegenheit soll deshalb nachhaltig darauf hingewiesen werden, daß ein positives wie auch ein negatives Ergebnis einer Hefe 2-Hybrid Analyse für sich betrachtet keine endgültige Aussage über die wirkliche Interaktion zweier Proteine erlaubt, sondern unbedingt einer weiteren, unabhängigen Bestätigung bedarf.

Die relativ mäßige Ausbeute des Hefe 2-Hybrid Screens, der in dieser Arbeit zur Isolierung von Alien/CSN2-interagierenden Proteinen durchgeführt wurde, ist neben der zu geringen Anzahl an durchmusterten Klonen also auch auf eine Reihe System-immanenter und wahrscheinlich überdies auf Alien/CSN2-spezifische Besonderheiten zurückzuführen. Eine Wiederholung des Versuchs sollte nur unter der Prämisse einiger Modifikationen betrieben werden. In erster Linie sollten dabei natürlich möglichst viele unabhängige cDNA-Klone ($\geq 10^6$) durchmustert werden. Eine qualitativ hochwertigere cDNA-Bibliothek, die sich beispielweise durch gerichtet klonierte cDNAs, die zuvor mit Hilfe von Zufallsprimern generiert wurden, und vielleicht auch dadurch, daß sie Transkripte eines ausgedehnteren Entwicklungszeitraums repräsentiert, auszeichnet, würde die Effizienz zusätzlich steigern. Ferner sollte auch die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems in Betracht gezogen werden. Auch wenn die konstitutive Expression von GAL4-DBD-Alien/CSN2 in Hefezellen unproblematisch ist, so könnte mit Hilfe der kontrollierten Induktion das Spektrum der Beuteproteine um die Fraktion der toxisch wirkenden Proteine bereichert werden.

6.3 Die physikalische Interaktion von Alien/CSN2 mit Rpn6 – ein Hinweis auf eine Kooperation von Signalosom und Proteasom?

Der in dieser Arbeit durchgeführte Hefe 2-Hybrid Screen führte zur Identifizierung von Rpn6, einer nicht-ATPase Untereinheit des 19S regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms. Rpn6 zeichnete sich gegenüber den anderen Beuteproteinen dadurch aus, daß es gleich dreimal isoliert werden konnte. Die drei unabhängigen *Rpn6*-cDNAs waren weitestgehend kollinear und nur im 5'-Bereich unterschiedlich stark verkürzt, so daß sie für drei N-terminal deletierte Rpn6-Varianten codierten. Die quantitative Bestimmung der *lacZ*-Reportergenaktivität zeigte, daß die längste (AS 83-422) und die kürzeste Variante (AS 101-422) etwa gleich stark mit Alien/CSN2 interagieren, während die dritte Variante, die im Vergleich zur längsten Variante über nur zwei Aminosäurereste weniger verfügt (AS 85-422), eine wesentlich schwächere, aber dennoch signifikante Interaktion mit Alien/CSN2 einging (s. Abb. 5.10). Die Ursachen für diese erstaunliche Diskrepanz sind unklar, könnten aber möglicherweise auf strukturellen Unterschieden beruhen, die durch die Deletion der zwei Aminosäurereste hervorgerufen werden. Entscheidend ist ohnehin die Tatsache, daß auch das vollständige Rpn6-Protein mit Alien/CSN2 im Hefe 2-Hybrid System interagiert. Überdies konnte die physikalische Interaktion von Rpn6 mit Alien/CSN2 im GST-Pulldown-Experiment bestätigt werden.

Dieser interessante Befund, daß Alien/CSN2 und Rpn6 direkt miteinander wechselwirken können, gibt Anlass zu der Vermutung, daß diese Art der Interaktion möglicherweise eine funktionelle Bedeutung *in vivo* haben könnte. Diese Annahme wird weiterhin dadurch gestützt, daß die Expressionsmuster der beiden Gene eine beachtliche Kongruenz aufweisen. Zwar kann alleinig aus der zeitlichen und räumlichen Koexpression zweier Transkripte nicht ohne weiteres eine wechselseitige Interaktion der Genprodukte deduziert werden, da solche Aspekte wie differentielle Translation oder subzelluläre Lokalisation der Proteine unberücksichtigt bleiben; dennoch bleibt festzuhalten, daß die Koexpression zellulärer Proteine eine unabdingbare Voraussetzung für deren direkte Wechselwirkung *in vivo* ist.

Von physikalischen Wechselwirkungen einzelner Untereinheiten des Signalosoms mit einigen Untereinheiten der beiden anderen PCI-Komplexe ist bereits mehrfach berichtet worden (vgl. Kap. 2.6), und auch die Tatsache, daß das Signalosom als hartnäckige Kontamination in Proteasompräparationen auftritt, mag nicht nur auf die strukturelle Ähnlichkeit mit dem 19S RP-Deckelkomplex, sondern möglicherweise auch auf eine gewisse Affinität der beiden Komplexe zurückzuführen sein. Die funktionelle Relevanz dieser Vernetzung der verschiedenen PCI-Komplexe ist unterdessen vollkommen unverstanden.

Die physikalische Interaktion von Alien/CSN2 mit Rpn6, die in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, ist eine weitere Evidenz für eine unmittelbare Wechselwirkung von Signalosom und 26S Proteasom. Auf dem Hintergrund der hinlänglich bekannten Beteiligung beider Komplexe an verschiedenen Teilprozessen des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus und der regulatorischen Funktionen des Signalosoms besteht ein begründeter Anlaß, zusätzlich eine direkte Interaktion bzw. Kooperation von Signalosom und Proteasom zu postulieren. Während das Signalosom durch seine Kinase- und Deneddylaseaktivität eine regulatorische Rolle bei der gezielten, Ubiquitin-abhängigen Destabilisierung verschiedener Substrate spielt, vollzieht das 26S Proteasom als letztes Glied der Ubiquitinylierungskaskade den ultimativen proteolytischen Abbau. Der vermeintliche Zweck der unmittelbaren Interaktion von Signalosom und Proteasom könnte also in der Regulation der Aktivität oder Spezifität des Proteasoms bestehen.

Über die Art und Weise, wie das Signalosom die Aktivität oder die Spezifität des 26S Proteasoms modulieren könnte, können verschiedene Vermutungen angestellt werden. Da bislang ausschließlich für Komponenten des 19S RP-Deckelkomplexes eine physikalische Interaktion mit dem Signalosom nachgewiesen wurde, kann in erster Linie davon ausgegangen werden, daß der distale Deckelkomplex des regulatorischen Partikels die primäre Zielstruktur für die Signalosom-abhängige Regulation darstellt. Denkbar wäre zum einen, daß das Signalosom durch seine Kinaseaktivität den Phosphorylierungsstatus bestimmter Untereinheiten des Deckelkomplexes spezifisch modifiziert und so die Affinität des regulatorischen Partikels für polyubiquitinylierte Substrate verändert. Eine andere Möglichkeit wäre, daß das Signalosom nicht durch seine katalytische Aktivität, sondern vielmehr durch seine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Deckelkomplex Einfluß auf die Aktivität des Proteasoms gewinnt. Aufgrund der gleichartigen Architektur der beiden Komplexe wäre ein reziproker Transfer von einzelnen Untereinheiten vorstellbar, der zur Entstehung von chimären Mischformen der beiden Komplexe beitragen könnte, und dadurch die Spezifität oder Aktivität des regulatorischen Partikels, vielleicht auch des Signalosoms modulieren könnte. Im Extremfall könnte die Vermischung der beiden Komplexe nicht nur im Austausch einiger Untereinheiten bestehen, sondern in einer mehr oder weniger stabilen Assoziation von Signalosom und Deckelkomplex, die in einer Sonderform des regulatorischen Partikels resultieren könnte (Wei & Deng, 1999). Obwohl dieser spezielle Fall noch nicht beobachtet wurde, so ist doch die Existenz alternativer Proteasom-Komplexe bekannt, die sich durch die Rekrutierung unterschiedlicher regulatorischer Komplexe auszeichnen (Übersicht in Ciechanover, 1998).

Auch wenn es außer den physikalischen Interaktionen von AtCSN1 mit AtRpn6 (Kwok *et al.*, 1999), von Signalosom-Komplex und Rpn7 in *Arabidopsis* (Yahalom *et al.*, 2001) und von

Drosophila CSN2 mit Rpn6 (diese Arbeit) keine weiteren direkten Hinweise auf eine unmittelbare Kooperation von Signalosom und 26S Proteasom gibt, so kann jedoch der experimentelle Befund, daß in Signalosom-defizienten Mutanten in *Arabidopsis* eine Akkumulation polyubiquitinylierter Proteine zu beobachten ist (Peng *et al.*, 2001a,b), im Sinne der Signalosom-Proteasom-Kooperations-Hypothese interpretiert werden. Die Argumentation, die Anreicherung von polyubiquitinylierten Substraten in CSN-Mutanten könnte eine Konsequenz der fehlenden Deneddylierungsaktivität des Signalosoms sein, ist zwar nicht von der Hand zu weisen, aber unzureichend. Angenommen, die konstitutive Nedd8-Modifikation der Cullin-Untereinheiten der SCF-E3-Ubiquitin-Ligasen würde tatsächlich mit einer verstärkten Ubiquitinylierung der verschiedenen Substrate einhergehen, so sollte die proteolytische Aktivität des Proteasoms eine übermäßige Akkumulation der polyubiquitinylierten Proteine verhindern können. Die exzessive Anreicherung von Proteinen, die eigentlich für den proteasomalen Abbau bestimmt waren, wäre demnach möglicherweise auch auf eine verminderte Aktivität oder Spezifität des 26S Proteasoms in Signalosom-Mutanten zurückzuführen.

Ein weiterer, allerdings äußerst hypothetischer und unsicherer Hinweis für einen Zusammenhang von Signalosomfunktion und Proteasomaktivität ist die Tatsache, daß in *Drosophila* Signalosom-Mutanten den gleichen Phänotyp zeigen wie Proteasom-Mutanten. Alle bisher bekannten Mutanten, sowohl für die Signalosom-Untereinheiten CSN4 und CSN5 (Freilich *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 2002) als auch für die 20S-Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 6$ (Saville & Belote, 1993; Smyth & Belote, 1999) und die 19S RP-Deckelkomplex-Komponente Rpn6 (diese Arbeit) sterben während der frühen Larvalentwicklung, ohne daß besondere morphologische Entwicklungsstörungen erkennbar sind. Natürlich können diese homogenen Phänotypen nicht ohne weiteres auf eine gemeinsame Ursache zurückgeführt werden; die frappante Übereinstimmung gestattet allerdings die Annahme, daß der Verlust der Signalosom- oder Proteasom-Aktivität aufgrund der wechselseitigen Kooperation der beiden Komplexe ähnliche Störungen provozieren könnte.

Weiterführende Analysen werden die hier, auf der Basis recht präliminärer Ergebnisse, postulierte Interaktion von Signalosom und Proteasom prüfen müssen. Mit Hilfe von Coimmunopräzipitations-Analysen sollte zunächst versucht werden, die physikalische Interaktion von Alien/CSN2 und Rpn6 bzw. von Signalosom und Proteasom *in vivo* nachzuweisen. Des weiteren könnte auch die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Signalosom und Proteasom aufschlußreiche Informationen liefern. In pflanzlichen wie auch in tierischen Zellen wird für das Signalosom bzw. für die jeweils detektierten Untereinheiten sowohl von nukleärem als auch cytoplasmatischem Vorkommen berichtet (Chamovitz *et al.*,

1996; Seeger *et al.*, 1998; Dressel *et al.*, 1999; Mundt *et al.*, 1999; Tsuge *et al.*, 2001). Die ektopische Expression von Epitop-markierten Myc-Alien/CSN2- bzw. Alien/CSN2-GFP-Fusionsproteinen in verschiedenen embryonalen und larvalen Geweben spricht ebenfalls für eine cytoplasmatische wie auch nukleäre Lokalisation des Signalosoms in *Drosophila* (Lier, 1998). Proteasom-spezifische Antikörper detektieren den Komplex je nach Zelltyp ebenfalls im Kern und/oder im Cytoplasma (Klein *et al.*, 1990). Die Kolo­kalisierung beider Komplexe in wildtypischen und im Vergleich dazu in Signalosom- oder 19S RP-Deckelkomplex-mutanten Zellen könnte Aufschlüsse über wechselseitige Interaktionen der beiden Komplexe liefern. Immunhistologische Untersuchungen an humanen Mesotheliom-Zellen weisen bereits auf eine Kolo­kalisierung der beiden Komplexe in Kernnähe hin (Seeger *et al.*, 1998).

Grundsätzlich stellt sich jedoch die Frage, ob *Drosophila* für die anstehenden Fragestellungen einen idealen Modellorganismus darstellt. Zweifellos repräsentiert *Drosophila* bislang den einzigen multizellulären, tierischen Organismus, an welchem die entwicklungsbiologische Relevanz des Signalosoms (Freilich *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 2002) und des Proteasoms (Saville & Belote, 1993; Smyth & Belote, 1999; diese Arbeit) demonstriert werden konnte; die entscheidenden mechanistischen Erkenntnisse wurden jedoch in *Arabidopsis*, in Hefe und in kultivierten Säugerzellen gewonnen. Wie bereits erwähnt, zeichnet sich *Drosophila* im Vergleich zu den genannten Systemen dadurch aus, daß sie den einzigen multizellulären, tierischen Vertreter darstellt, für den Signalosom- und auch Proteasom-Mutanten überhaupt bekannt sind. Der besondere Vorteil gegenüber Säugerzellkultur-Experimenten besteht darin, daß z. B. in klonalen Analysen die Störungen Signalosom- oder Proteasom-defizienter Zellen parallel zu den Verhältnissen in wildtypischen Zellen untersucht werden könnten; und das in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien, während kultivierte Säugerzellen meist hochspezialisierte oder krankhaft veränderte Zelltypen repräsentieren. Demnach sollte *Drosophila* weiterhin für die Charakterisierung der Signalosom- und 19S RP Deckelkomplex-Funktionen herangezogen werden.

6.4 Die Relevanz der PCI-Domänen für die physikalische Interaktion von Alien/CSN2 und Rpn6 bleibt fraglich

Der Einsatz PCI-Domänen-deletierter Alien/CSN2- und Rpn6-Varianten im Hefe 2-Hybrid- und im GST-Pulldown-Verfahren sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob die direkte Interaktion von Alien/CSN2 mit Rpn6 von den PCI-Domänen der beiden Proteine abhängig ist. Bedauerlicherweise erbrachten die beiden unterschiedlichen experimentellen Ansätze keine

übereinstimmenden Ergebnisse. Während GST-Alien Δ PCI gleichermaßen das vollständige wie auch das PCI-deletierte Rpn6-Protein im GST-Pulldown-Experiment präzipitiert, so ist im Hefe 2-Hybrid keine signifikante Interaktion der PCI-deletierten Varianten nachweisbar. Für sich gesehen liefern beide Experimente also gegensätzliche Aussagen: laut GST-Pulldown spielt keine der beiden PCI-Domänen eine ausschlaggebende Rolle für die direkte Interaktion von Rpn6 und Alien/CSN2; laut Hefe 2-Hybrid ist insbesondere die PCI-Domäne von Rpn6 unentbehrlich für die Wechselwirkung mit Alien/CSN2. Für die Relevanz der PCI-Domäne von Alien/CSN2 konnte aufgrund der störenden autonomen Reporter-Expression in DBD-Alien/CSN2 Δ PCI-Hefe-Transformanten kein unzweifelhaftes Ergebnis erzielt werden; allerdings hat es den Anschein als würde auch Alien/CSN2 Δ PCI nicht mehr mit Rpn6 interagieren (s. Kap. 5.8).

Für das Zustandekommen dieser widersprüchlichen Befunde kommen verschiedene Ursachen in Frage. Da sich jedoch beide Methoden heterologer Expressionssysteme bedienen, kann nur schwer beurteilt werden, welcher Methode die größere oder glaubwürdigere Aussagekraft zugesprochen werden kann. Dem Hefe- und erst recht dem bakteriellen Expressionssystem mangelt es an der posttranslationalen Modifikationsmaschinerie höherer Eukaryoten. Über posttranslationale Modifikationen von Alien/CSN2 oder Rpn6 ist zwar nichts bekannt, und sie scheinen auch für die Interaktion der beiden vollständigen Proteine keine Rolle zu spielen, aber dennoch wird dieses Argument häufig, insbesondere für die Rechtfertigung (falsch-) negativer Ergebnisse, bemüht. Ein weiterer, schwerwiegender Aspekt ist die Frage, ob ein heterolog exprimiertes Protein, besonders dann wenn es durch so einschneidende Maßnahmen, wie die Deletion ganzer Domänen, stark abgewandelt ist, überhaupt noch eine dem funktionellen Protein vergleichbare Tertiärstruktur ausbildet. Diese Einschränkungen gelten gleichermaßen für das Hefe 2-Hybrid- wie auch für das GST-Pulldown-System.

Als spezifischer Schwachpunkt des hier durchgeführten Hefe 2-Hybrid-Experiments muß eingeräumt werden, daß nicht gesichert ist, ob die verwendeten Δ PCI-Konstrukte überhaupt exprimiert werden. Während die Expression der vollständigen Alien/CSN2- bzw. Rpn6-Proteine indirekt durch ihre positive Interaktion belegt ist, wurde die Expression des DBD-Alien/CSN2 Δ PCI- bzw. des AD-Rpn6 Δ PCI-Proteins weder direkt noch indirekt, durch Western Blot-Analysen oder durch irgendeine positive Interaktion, nachgewiesen. Strenggenommen könnte die fehlende Interaktion von Alien/CSN2 und Rpn6 Δ PCI also auch auf eine fehlende Expression von Rpn6 Δ PCI zurückzuführen sein. Das gleiche gilt für Alien/CSN2 Δ PCI, wengleich in diesem Fall die autonome Reporter-Expression für die Anwesenheit eines aberranten Aktivators, nämlich höchstwahrscheinlich Alien/CSN2 Δ PCI, spricht.

Das Argument der vermeintlichen Nicht-Expression eines Interaktionspartners trifft für das GST-Pulldown-Experiment nicht zu. Alle getesteten Proteine wurden effizient translatiert und interagierten schließlich in jeder beliebigen Konstellation. Allerdings handelt es sich bei diesen Alien/CSN2-Interaktionen nicht um die erste oder gar einzige Wechselwirkung eines GST-Alien/CSN2-Proteins, die nicht in einem unabhängigen Verfahren verifiziert werden konnte. So wurde beispielweise eine eindeutige Interaktion von *Drosophila* Alien/CSN2 mit α Ftz-F1 im GST-Pulldown-Experiment gezeigt (Dressel *et al.*, 1999), die im Hefe 2-Hybrid-Experiment nicht verifiziert werden konnte (s. Kap. 5.10). Dasselbe, positive Interaktion im GST-Pulldown-Experiment, keine Interaktion im Hefe 2-Hybrid-Experiment, gilt für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion von Alien/CSN2 mit Dmp53 (s. Kap. 5.10). Für alle diese Fälle eine Nicht-Expression der korrespondierenden Partner-Proteine in den Hefezellen zu postulieren, ist nicht rechtfertigbar; besonders nicht für α Ftz-F1, da hier entsprechende Positivkontrollen mit dem Interaktionspartner Ftz durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt, s. auch Yu *et al.*, 1997). Vielmehr hat es den Anschein, als sei bakteriell exprimiertes GST-Alien/CSN2, aus welchen Gründen auch immer, ein überaus interaktionsfreudiges Protein. Wie dem auch sei, im Falle von so eindeutig widersprüchlichen Ergebnissen muß versucht werden, der Fragestellung auf andere Art und Weise, wie z. B. durch Far Western Blot-Analysen oder Coimmunopräzipitation von transient exprimierten Δ PCI-Varianten, gerecht zu werden. Die Relevanz der PCI-Domänen von Alien/CSN2 und Rpn6 für ihre wechselseitige Interaktion bleibt also vorerst fraglich.

In diesem Zusammenhang muß jedoch noch angemerkt werden, daß einige Autoren von vornherein auf eine Bestätigung ihrer Hefe 2-Hybrid Ergebnisse und zum Teil auch auf Kontrollen, die die Expression der Interaktionspartner demonstrieren würden, verzichteten. Durch verschiedene alternative Methoden einvernehmlich demonstrierte und somit überzeugende Daten zur Relevanz der PCI-Domäne liefern bislang ausschließlich Tsuge *et al.* (2001) und Wang *et al.* (2002). Demnach ist die PCI-Domäne der Signalosomuntereinheit CSN1 das einzige Beispiel, für das eine spezifische Funktion gezeigt werden konnte, nämlich die Integration von CSN1 in den Signalosom-Komplex.

6.5 *Drosophila* Alien/CSN2 – nur Signalosomuntereinheit oder auch Corepressor?

Die Charakterisierung des humanen Alien-Proteins als Corepressor für Kernhormonrezeptoren legt die Vermutung nahe, daß *Drosophila* Alien/CSN2 nicht nur als integrale Komponente des Signalosom-Komplexes, sondern ebenfalls als Corepressor agieren könnte. Außer einer physikalischen Interaktion von *Drosophila* Alien/CSN2 mit dem Ecdyson-Rezeptor (EcR) und mit β Ftz-F1 im GST-Pulldown-Experiment und einer direkten Interaktion von humanem Alien mit EcR im Hefe 2-Hybrid System (Dressel *et al.*, 1999) liegen jedoch keine weiteren stichhaltigen Evidenzen für eine mögliche Funktion von Alien/CSN2 als Corepressor in *Drosophila* vor. Im übrigen müssen die betreffenden Untersuchungen von Dressel *et al.* im nachhinein unter dem Vorbehalt, daß zum damaligen Zeitpunkt nur eine unvollständige *Drosophila alien/CSN2*-cDNA zur Verfügung stand, betrachtet werden. Diese cDNA codierte für die Aminosäuren 1-360 (Goubeaud *et al.*, 1996) und entbehrt somit fast die gesamte C-terminale PCI-Domäne. Erst nachfolgende Untersuchungen führten zur Isolierung eines weiterreichenden 3'-Endes (Lier, 1998) und erbrachten schließlich den Nachweis, daß in *Drosophila* exklusiv dieses eine Transkript, welches eine Folge von 444 Aminosäuren codiert, exprimiert ist (Bodderas, 2000). Mit Ausnahme der Säuger, die offensichtlich zwei verschiedene Alien/CSN2-Proteine, Alien α (40 kDa) und Alien β (52 kDa) exprimieren (Tenbaum *et al.*, 2002), scheinen alle anderen Organismen über nur eine Alien/CSN2-Variante zu verfügen, die dem Alien β -Protein homolog ist. In den Untersuchungen von Dressel *et al.* (1999) wurde jedoch ausschließlich die Funktion von Alien α analysiert; vergleichende Analysen mit Alien β stehen noch aus.

Es scheint, als sei das Vorkommen von Alien α und somit vielleicht auch die Corepressor-Funktion eine spezifische Erscheinung in Vertebraten. Es könnte spekuliert werden, daß die ursprüngliche Funktion von Alien/CSN2 als Signalosom-Komponente während der Evolution der Vertebraten oder Säuger durch eine Genduplikation und der daraus resultierenden Alien α -Variante eine spezifische Funktionserweiterung erfahren hat. Ein mögliches Indiz, das im Sinne der Theorie einer Vertebraten-spezifischen Evolution der Corepressor-Funktion interpretiert werden könnte, ist die Interaktion von Alien α mit DAX-1, einem besonders stark abgewandelten Mitglied der Superfamilie der Kernhormonrezeptoren (Altincicek *et al.*, 2000). DAX-1 ist ein Vertebraten-spezifischer Kernhormonrezeptor; DAX-1-Homologe aus Invertebraten sind nicht bekannt (Zanaria *et al.*, 1994). Die Tatsache, daß SMRT, ein anderer Corepressor mit Spezifität für einige Kernhormonrezeptoren, nicht mit DAX-1 interagiert, und daß einige natürlich vorkommende, pathogene DAX-1-Mutationen einen Verlust der Interaktion

mit Alien zur Folge haben, unterstreicht die Spezifität der Alien α -DAX-1-Interaktion. Möglicherweise ist diese besondere Wechselwirkung aus einer Art Koevolution der beiden Proteine entstanden und deshalb eine spezielle Entwicklung innerhalb der Vertebraten.

Demgegenüber steht das völlige Fehlen von Transkriptionsfaktoren der Kernhormonrezeptor-Superfamilie in Pflanzen und niederen Metazoen, was die Corepressor-Funktion von Alien/CSN2 in diesen Organismen ohnehin zweifelhaft erscheinen läßt. Umso interessanter wäre es, die Funktion von Alien/CSN2 in *Drosophila* zu verstehen. Die Analyse von *alien/CSN2*-spezifischen Mutanten könnte besonders aufschlußreiche Informationen darüber liefern, ob verglichen mit anderen *CSN*-Mutanten zusätzliche Störungen auftreten, die z. B. typische Anzeichen für eine Fehlfunktion innerhalb der Ecdyson-regulierten Genkaskade repräsentieren. Gegenüber den beiden bislang bekannten Kernhormonrezeptor-Corepressoren in *Drosophila*, SMRTER und Bonus, zeichnet sich Alien/CSN2 dadurch aus, daß es ausschließlich in proliferierenden Geweben exprimiert ist. SMRTER, ein EcR-Corepressor (Tsai *et al.*, 1999), und Bonus, ein β Ftz-F1-Corepressor (Beckstead *et al.*, 2001), werden hingegen auch in larvalen Geweben, wie z. B. in Speicheldrüsen exprimiert, die während der Metamorphose zugrunde gehen. Somit bestünde die Möglichkeit, daß Alien/CSN2 eine besondere Rolle bei der Regulation der EcR- und/oder β Ftz-F1-regulierten Genexpression in proliferierenden Zellen spielt.

Bedauerlicherweise konnte die hier vorliegende Arbeit keine Argumente für oder wider die postulierte Funktion von *Drosophila* Alien/CSN2 als Corepressor liefern. Angesichts dieser Fragestellung sollten zukünftige Experimente unbedingt auf die Isolierung einer *alien/CSN2*-spezifischen Mutante abzielen. Der Idealfall einer allelischen Serie, wie er z. B. in Form von mehreren EMS-Punktmutationen auftreten könnte, könnte unter Umständen die Differenzierung zwischen Signalosom- und Corepressor-spezifischen Funktionen erlauben.

6.6 Rpn6, eine Komponente des 19S regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms, ist essentiell für die Entwicklung von *Drosophila*

Mit der Identifizierung von Rpn6 als Alien/CSN2-interagierendem Protein erwuchs die Frage nach seiner entwicklungsbiologischen Relevanz. Die Verfügbarkeit einer mutanten Fliegenlinie, die sich durch eine P-Element-Insertion im 5'-untranslatierten Bereich des *Rpn6*-Gens auszeichnete, ermöglichte die phänotypische Analyse und die Generierung weiterer *Rpn6*-Allele. *Rpn6*-Nullmutanten sind homozygot letal und gehen während des ersten bis zweiten Larvenstadiums ohne äußerlich erkennbare Entwicklungsstörungen zugrunde. Dieser relativ späte Letalitätszeitpunkt kann jedoch nicht ohne weiteres als Indiz für eine späte essentielle Funktion von Rpn6 interpretiert werden. Wahrscheinlich kompensiert die maternale Deposition von *Rpn6*-Transkripten und auch von funktionellen 26S Proteasomen die fehlende zygotische *Rpn6*-Expression so lange, bis die maternalen Komponenten so weit dezimiert sind, daß keine ausreichende zelluläre 26S Proteasom-Konzentration mehr erreicht wird. Für diesen Protein-Dosis-Effekt spricht auch die Beobachtung, daß Larven, die homozygot für ein hypomorphes *Rpn6*-Allel (*rpn6*^{20F}) sind, das offensichtlich eine Restaktivität des *Rpn6*-Gens erlaubt, bis zum dritten Larvenstadium, teilweise sogar bis ins Puppenstadium überleben. Offensichtlich bedarf es zu diesem Zeitpunkt einer verstärkten Proteasomaktivität, die aufgrund der nur residualen *Rpn6*-Genaktivität jedoch nicht erreicht werden kann.

Diese Argumentation beruht auf der Annahme, daß die Verfügbarkeit von Rpn6 ein limitierender Faktor für die Assemblierung eines funktionellen 26S Proteasoms ist. Endgültige Beweise, wie z. B. der Nachweis der Akkumulation von polyubiquitinylierten Proteinen in *Rpn6*-mutanten Tieren oder Zellen, stehen allerdings noch aus. Dennoch existieren Anhaltspunkte, die diese These stützen. Rpn6 ist offensichtlich ausnahmslos am Aufbau des Deckelkomplexes des 19S regulatorischen Partikels beteiligt. Die Tatsache, daß das Rpn6-Protein zumindest in embryonalen Proteinextrakten ausschließlich als integrale Komponente des Deckelkomplexes und nicht in unkomplexierter Form vorkommt (Haracska & Udvardy, 1996; Hölzl *et al.*, 2000), deutet darauf hin, daß Rpn6 keine andere, Proteasom-unabhängige Funktion erfüllt.

Die RNAi-Analyse verschiedener Untereinheiten des 20S Core und des 19S RP Deckel- und Basalkomplexes in *Drosophila* S2 Schneider-Zellen zeigt, daß in Abwesenheit einer einzigen Untereinheit der dazugehörige Komplex nicht mehr korrekt assembliert und somit auch die Formierung funktioneller 26S Proteasomen verhindert ist (Wójcik & DeMartino, 2002). Da in Abwesenheit eines funktionellen 19S Regulators der 20S Core Partikel in einem autoinhibierten, katalytisch inaktiven Zustand verharrt (Groll *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998), ist zu vermuten, daß der durch das Fehlen von Rpn6 verursachte Mangel an funktionellen

Deckelkomplexen bzw. 19S regulatorischen Partikeln auch mit einem Verlust der 26S Proteasom-Gesamtaktivität endet. Ein Indiz, das für den Verlust der 26S Proteasomaktivität in *Rpn6*-Mutanten spricht, ist der larval letale Phänotyp der *Rpn6*-Mutanten, der in gleicher Weise für Nullmutanten der 20S Core Partikel-Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 6$ festgestellt wurde (Saville & Belote, 1993; Smyth & Belote, 1999).

Die Analyse somatischer *Rpn6*-Klone veranschaulicht, daß Rpn6 für das Überleben proliferierender Zellen unentbehrlich ist. *Rpn6*-mutante Zellen, die während der frühen Larvalphase durch mitotische Rekombination erzeugt wurden und überhaupt kein Rpn6-Protein mehr synthetisieren können, werden vom Proliferationsgeschehen ausgeschlossen und bilden keine Klone. Das völlige Fehlen von Strukturveränderungen in Mosaik-Augen, die durch persistierende, *Rpn6*-mutante Zellen hätten verursacht werden können, weist nicht nur darauf hin, daß die homozygot mutante Zellen ihre Teilungsaktivität frühzeitig einstellen, sondern daß sie außerdem auch aus dem Zellverband eliminiert und durch benachbarte Zellen ersetzt werden. Ob der Untergang *Rpn6*-mutanter Zellen eine Folge von Zellzyklusstörungen oder von spezifischen apoptotischen Aktivitäten ist, ist unklar. Die Klärung dieser Frage sollte durch die Verwendung von Apoptose-Markern, wie z. B. Acridin Orange oder mit Hilfe der TUNEL-Methode grundsätzlich möglich sein. Da es sich aber aller Voraussicht nach nicht um großflächige, sondern um ein- bis wenigzellige Areale innerhalb einiger Imaginalscheiben handeln dürfte, ist der unzweifelhafte Nachweis wahrscheinlich nur unter hohem experimentellen Aufwand, d. h. durch die Präparation, Färbung und konfokale Laserscan-Mikroskop-Analyse zahlreicher Imaginalscheiben zu erbringen.

Unabhängig davon, ob *Rpn6*-mutante Zellen nun durch apoptotische oder nekrotische Prozesse zugrunde gehen, so erklärt der Zelltod *Rpn6*-mutanter Zellen jedoch den larval letalen Phänotyp. Die Letalität homozygot mutanter Tiere während der frühen Larvalphase, d. h. in einem Entwicklungsstadium, das in erster Linie durch eine hohe, wachstumsfördernde Proliferationsrate gekennzeichnet ist, ist demnach eher auf eine Hemmung des allgemeinen Wachstums bzw. einen unterentwickelten Gesamtzustand als auf spezifische Entwicklungsstörungen zurückzuführen.

Die Tatsache, daß in Mosaik-Augen, in denen *Rpn6*-mutante Klone bzw. Zellen erst spät, d. h. während der letzten mitotischen Teilungen der ommatidialen Vorläuferzellen induziert wurden, keine Differenzierungsstörungen beobachtet werden konnten, kann nicht ohne weiteres als Indiz dafür verstanden werden, Rpn6 bzw. das 26S Proteasom seien nicht an zellulären Determinations- oder Differenzierungsprozessen beteiligt. Möglicherweise kann die Weitergabe von funktionellem Rpn6-Protein bzw. von 26S Proteasomen über eine oder wenige Zellteilungen

hinweg, den Verlust der genetischen *Rpn6*-Aktivität kompensieren und so auch in homozygot mutanten Zellen das geregelte Determinations- und Differenzierungsgeschehen aufrechterhalten. Tatsächlich zeigen die Untersuchungen von Schweisguth (1999), daß das 26S Proteasom an Zellschicksal-entschiedenen Prozessen während der Entwicklung der mechanosensorischen Sinnesorgane beteiligt ist. Der Grund für das Fehlen vergleichbarer Phänotypen in *Rpn6*-Mosaik-Tieren beruht wahrscheinlich auf dem Umstand, daß es sich bei der Analyse von Rpn6 um ein amorphes Allel und bei der Analyse der β 2- und β 6-Untereinheiten um antimorphe Allele handelte. Während der Verlust der *Rpn6*-Genaktivität durch die Anwesenheit funktioneller 26S Proteasomen möglicherweise erst nach einer kurzen Zeitverzögerung, d. h. nach einer bis wenigen Zellteilungen zum Tragen kommt, hat die Expression eines fehlerhaften β 2- oder β 6-Proteins, das mit dem wildtypischen Genprodukt in Konkurrenz tritt, die unmittelbare Folge, daß der 20S Core Komplex durch die Integration der fehlerhaften Untereinheit inaktiviert wird. Zwar nimmt die Zahl funktioneller 26S Proteasomen sowohl durch den Mangel an Rpn6-Protein als auch durch den Einbau fehlerhafter β -Untereinheiten ab; in den antimorphen β 2- bzw. β 6-Mutanten wird die Aktivität der verbleibenden funktionellen 26S Proteasomen jedoch zusätzlich durch die Anwesenheit katalytisch inaktiver 26S Proteasomen kompetiert. Diese hinzukommende Hemmung der 26S Proteasomaktivität ist wahrscheinlich ausschlaggebend für den stärkeren phänotypischen Effekt.

Vermutlicherweise könnte die Analyse antimorpher *Rpn6*-Allele eher zur Klärung der Frage beitragen, ob Rpn6 bzw. der 19S RP Deckelkomplex eine Rolle bei der Determination von Zellschicksalen oder bei Differenzierungsprozessen spielt (s. auch Kap.6.7).

6.7 Ausblick

Im Zentrum weiterführender Untersuchungen sollte die Frage stehen, ob die in dieser Arbeit entdeckte physikalische Interaktion von Alien/CSN2 mit Rpn6 eine funktionelle Bedeutung *in vivo* hat. Unter der Voraussetzung, daß in Coimmunopräzipitations-Experimenten eine direkte Interaktion von Alien/CSN2 mit Rpn6 bestätigt werden kann, sollte im Anschluß zunächst mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten eine detaillierte Kartierung der für die gegenseitige Wechselwirkung kritischen Domänen, Struktur motive oder Aminosäurereste in Alien/CSN2 und Rpn6 vorgenommen werden. Mit der Kenntnis der relevanten Interaktionsdomänen bestünde dann die Möglichkeit, diese Domänen so zu mutagenisieren, daß zwar die Proteinstruktur von Alien/CSN2 bzw. Rpn6 und somit auch die Fähigkeit in den jeweiligen Komplex zu integrieren erhalten bleibt, daß aber keine Alien/CSN2-Rpn6-Interaktion mehr stattfinden kann. Um schließlich *in vivo* gezielt den Verlust der Alien/CSN2-Rpn6-Interaktion herbeizuführen, könnten derartig gentechnisch modifizierte Alien/CSN2- oder Rpn6-Varianten, die mit den endogenen wildtypischen Alien/CSN2- bzw. Rpn6-Proteinen konkurrieren, in *Drosophila* exprimiert werden.

Die Vorteile dieses Vorgehens beruhen auf zwei wichtigen Aspekten. Der methodische Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, daß durch die Expression der dominant-negativen Proteine in transgenen Fliegen auf die Generierung von "echten" mutanten Fliegenlinien verzichtet werden kann; ein Vorzug der angesichts der problematischen reversen Genetik von *Drosophila* nicht unterschätzt werden sollte (s. auch Kap. 6.1). Weit überzeugender ist allerdings, daß diese Strategie grundsätzlich die Untersuchung distinkter Teilfunktionen multifunktionaler Protein-Komplexe erlaubt. Da der Verlust einer einzelnen Untereinheit sowohl im Falle des Signalosoms als auch im Falle des 26S Proteasoms die strukturelle Destabilisierung des gesamten Komplexes nach sich zieht, veranschaulicht die Analyse von Nullmutationen in erster Linie den Funktionsverlust des entsprechenden Gesamtkomplexes. Die Einbringung dominant-negativ-wirkender Untereinheiten, die nicht den Gesamt-Komplex als solchen, sondern lediglich eine spezifische Teilfunktion ausschaltet, ermöglicht also die Differenzierung separater Subfunktionen. Diese Strategie, die im übrigen auch in anderen Organismen angewandt werden könnte, sollte zur Klärung zellbiologischer und entwicklungsbiologischer Fragen zur Funktion des Signalosoms und anderer Komplexe beitragen können.

7. Abkürzungen

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumpersulfat
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaar(e)
cDNA	complementary DNA
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
EST	expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar(e)
MOPS	Morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitrobluetetrazolium
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-Galaktosid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit Unit
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-Phosphat

8. Literaturverzeichnis

- Adams, M.D. et al. (2000)** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Aravind, L. & Ponting, C.P. (1998)** Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* **7**, 1250-1254.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D.J., Koonin, E.V. (2000)** Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11319-11324.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1994)** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1999)** Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2002)** The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. *Scienceexpress* online, 10.1126/science.1067554.
- Balagopalan, L., Keller C.A., Abmayr S.M. (2001)** Loss-of-function mutations reveal that the *Drosophila nautilus* gene is not essential for embryonic myogenesis or viability. *Dev. Biol.* **231**, 374-82.
- Baniahmad, A., Köhne, A.C., Renkawitz, R. (1992)** A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the *v-erbA* oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO J.* **11**, 1015-1023.
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Finn, R.D., Sonnhammer, E.L. (1999)** Pfam 3.1: 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**, 260-262.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E. (1997)** The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.
- Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C., Dubiel, W. (2001)** COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J.* **20**, 1630-1639.
- Bech-Otschir, D., Seeger, M., Dubiel, W. (2002)** The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Cell Sci.* **115**, 467-473.
- Beckstead, R., Ortiz, J.A., Sanchez, C., Prokopenko, S.N., Chambon, P., Losson, R., Bellen, H.J. (2001)** Bonus, a *Drosophila* homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit β FTZ-F1-dependent transcription. *Mol. Cell* **7**, 753-765.
- Berg, C.A. & Spradling, A.C. (1991)** Studies on the rate and site-specificity of P element transposition. *Genetics* **127**, 515-524.
- Bhat, M.A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K., Choi, K., Bellen, H.J. (1999)** Discs lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 833-845.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T. et al. (1989)** Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev.* **3**, 1273-1287.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blümer, N. (2000)** Das *don juan*-Gen in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*: Analyse eines extrem kurzen Transkriptionskontrollbereichs und eines Translationsrepressionselements in der 5'-UTR sowie erste funktionelle Hinweise. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Bodderas, E. (2000)** Immunhistochemische und molekulare Analysen zur Charakterisierung des Kernhormonrezeptor-Corepressors Alien bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Brand, A., Manoukian, A.S., Perrimon, N. (1994)** Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell. Biol.* **44**, 635-654.
- Brand, A.H. & Perrimon, N. (1993)** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 410-415.
- Broadus, J., McCabe, J.R., Endrizzi, B., Thummel, C.S., Woodard, C.T. (1999)** The *Drosophila* β Ftz-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell* **3**, 143-149.
- Brodsky, M.H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G.M., Abrams, J.M. (2000)** *Drosophila* p53 binds a damage response element at the *reaper* locus. *Cell* **101**, 103-113.
- Chamovitz, D.A., Wei, N., Osterlund, M.T., von Arnim, A.G., Staub, J.M., Matsui, M., Deng, X.W. (1996)** The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* **86**, 115-121.
- Chen, Z.J., Parent, I., Maniatis, T. (1996)** Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* **84**, 853-862.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S. (1991)** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9578-9582.
- Chomczynski, P. (1992)** One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **201**, 134-139.
- Chuang, C.F. & Meyerowitz, E.M. (2000)** Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4985-4990.
- Church, G.M. & Gilbert, W. (1984)** Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1955-1959.
- Ciechanover, A. (1998)** The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* **17**, 7151-7160.
- Claret, F.X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T., Karin, M. (1996)** A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* **383**, 453-457.
- Cohen, H., Azriel, A., Cohen, T., Meraro, D., Hashmueli, S., Bech-Otschir, D., Kraft, R., Dubiel, W., Levi, B. (2000)** Interaction between interferon consensus sequence-binding protein and COP9/signalosome subunit CSN2 (Trip15). *J. Biol. Chem.* **275**, 39081-39089.

- Delattre, M., Anxolabéhère, D., Coen, D. (1995)** Prevalence of localized rearrangements vs. transpositions among events induced by *Drosophila* P element transposase on a P transgene. *Genetics* **141**, 1407-1424.
- Deng, X.W., Dubiel, W., Wei, N., Hofmann, K., Mundt, K., Colicelli, K., Kato, J., Naumann, M., Segal, D., Seeger, M., Glickman, M., Chamovitz, D.A., Carr, A. (2000)** Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet.* **16**, 202-203.
- Deshaies, R.J. (1999)** SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 435-467.
- Dobens, L., Rudolph, K., Berger, E.M. (1991)** Ecdysone regulatory elements function as both transcriptional activators and repressors. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1846-1853.
- Dressel, U., Thormeyer, D., Altincicek, B., Paululat, A., Eggert, M., Schneider, S., Tenbaum, S.P., Renkawitz, R., Baniahmad, A. (1999)** Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for nuclear hormone receptors. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3383-3394.
- Dubiel, W., Ferrell, G., Rechsteiner, M. (1995)** Subunits of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Mol. Biol. Rep.* **21**, 27-34.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fields, S. & Sternglanz, R. (1994)** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**, 286-292.
- Finley, D., Tanaka, K., Mann, C., Feldmann, H., Hochstrasser, M., Vierstra, R., Johnston, S. et al. (1998)** Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 244-245.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fogarty, P., Kalpin, R.F., Sullivan, W. (1994)** The *Drosophila* maternal-effect mutation *grapes* causes a metaphase arrest at nuclear cycle 13. *Development* **120**, 2131-2142.
- Fondell, J.D., Roy, A.L., Roeder, R.G. (1993)** Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev.* **7**, 1400-1410.
- Fortier, E. & Belote, J.M. (2000)** Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* **26**, 240-244.
- Freilich, S., Oron, E., Kapp, Y., Nevo-Caspi, Y., Orgad, S., Segal, D., Chamovitz, D.A. (1999)** The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **9**, 1187-1190.
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H., Vierstra, R.D. (2001)** Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.* **20**, 7096-7107.
- Futcher, A.B. (1988)** The 2 µm circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **4**, 27-40.
- Giordano, E., Rendina, R., Peluso, I., Furia, M. (2002)** RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**, 637-648.
- Glaser, J.D., Wolfner, M.F., Lis, J.F. (1986)** Spatial and temporal pattern of hsp26 expression during normal development. *EMBO J.* **5**, 747-754.
- Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (2000)** The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121-141.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. (1998)a** A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9 signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-623.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., Finley, D. (1998)b** The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3149-3162.
- Golic, K.G. & Lindquist, S. (1989)** The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Golic, K.G. (1991)** Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-961.
- Goubeaud, A., Knirr, S., Renkawitz-Pohl, R., Paululat, A. (1996)** The *Drosophila* gene *alien* is expressed in the muscle attachment sites during embryogenesis and encodes a protein highly conserved between plants, *Drosophila* and vertebrates. *Mech. Dev.* **57**, 59-68.
- Haracska, L. & Udvardy, A. (1996)** Dissection of the regulator complex of the *Drosophila* 26S protease by limited proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 166-170.
- Henke, W., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Seeger, M., Schade, R., Jungblut, P., Naumann, M., Dubiel, W. (1999)** Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome 'lid'. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 29-34.
- Hofmann, K. & Bucher, P. (1998)** The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem.* **23**, 204-205.
- Hözl, H., Kapelari, B., Kellermann, J., Seemüller, E., Sümegi, M., Udvardy, A., Medalia, O., Sperling, J., Müller, S.A., Engel, A., Baumeister, W. (2000)** The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes: subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J. Cell Biol.* **150**, 119-129.
- Hutvagner, G. & Zamore, P.D. (2002)** RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 225-232.
- Jin, S., Martinek, S., Joo, W.S., Wortman, J.R., Mirkovic, N., Sali, A., Yandell, M.D., Pavletich, N.P., Young, M.W., Levine, A.J. (2000)** Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7301-7306.
- Kapelari, B., Bech-Otschir, D., Hegerl, R., Schade, R., Dumdey, R., Dubiel, W. (2000)** Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J. Mol. Biol.* **300**, 1169-1178.
- Karess, R.E. & Rubin, G.M. (1984)** Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* **38**, 135-146.
- Karniol, B., Yahalom, A., Kwok, S., Tsuge, T., Matsui, M., Deng, X.W., Chamovitz, D.A. (1998)** The *Arabidopsis* homologue of an eIF3 complex subunit associates with the COP9 complex. *FEBS Lett.* **439**, 173-179.
- Kennerdell, J.R. & Carthew, R.W. (1998)** Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the Wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-1026.
- Kim, C., Han, K., Kim, J., Yi, J.S., Kim, C., Yim, J., Kim, Y., Kim-Ha, J. (2002)** Femcoat, a novel eggshell protein in *Drosophila*: functional analysis by double stranded RNA interference. *Mech. Dev.* **110**, 61-70.

- Kim, T., Hofmann, K., von Arnim, A.G., Chamovitz, D.A. (2001)** PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. *Trends Plant Sci.* **6**, 379-386.
- Klein, U., Gernold, M., Kloetzel, P.M. (1990)** Cell-specific accumulation of *Drosophila* proteasomes (MCP) during early development. *J. Cell Biol.* **111**, 2275-2282.
- Klemenz, R., Weber, U., Gehring, W.J. (1987)** The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3947-3959.
- Kokubo, T., Gong, D.W., Yamashita, S., Horikoshi, M., Roeder, R.G., Nakatani, Y. (1993)** *Drosophila* 230-kD TFIID subunit, a functional homolog of the human cell cycle gene product, negatively regulates DNA binding of the TATA box-binding subunit of TFIID. *Genes Dev.* **7**, 1033-1046.
- Kremser, T. (1998)** Das Homöodomänen-Protein Tinman reguliert die Expression des $\beta 3$ -Tubulin-Gens von *Drosophila melanogaster* im Dorsalfäß und in der viszeralen Muskulatur. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Kwok, S.F., Staub, J.M., Deng, X.W. (1999)** Characterization of two subunits of *Arabidopsis* 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J. Mol. Biol.* **285**, 85-95.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, G. & Thummel, C.S. (2000)** Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**, 957-963.
- Langer-Safer, P.R., Levine, M., Ward, D.C. (1982)** Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4381-4385.
- Laskey, R. (1980)** The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **65**, 363-371.
- Lasko, P. (2000)** The *Drosophila melanogaster* genome: translation factors and RNA binding proteins. *J. Cell Biol.* **150**, F51-F56.
- Lawrence, P.A., Johnston, P. (1989)** Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by *evenskipped* and *fushi tarazu*. *Development* **105**, 761-768.
- Lee, J.W., Choi, H.S., Gyuris, J., Brent, R., Moore, D.D. (1995)** Two classes of proteins depend on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* **9**, 243-254.
- Liao, G.C., Rehm, J., Rubin, G.M. (2000)** Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3347-3351.
- Lier, S. (1998)** Expression eines Epitop-markierten Fusionsgens zur subzellulären Lokalisation von *Drosophila*-Alien, einem hochkonservierten Corepressor für Kernhormonrezeptoren. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Lindsley, D.L. & Zimm, G.G. (1992)** The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Lohmann, J.U., Endl, I., Bosch, T.C. (1999)** Silencing of developmental genes in hydra. *Dev. Biol.* **214**, 211-214.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D.A., Wei, N., Shevchenko, A., Deshaies, R.J. (2001)** Promotion of NEDD8-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**, 1382-1385.
- Maki, C.G., Huijbrege, J.M., Howley, P.M. (1996)** *In vivo* ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res.* **56**, 2649-2654.
- Martin-Blanco, E. (2000)** p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *BioEssays* **22**, 637-645.
- Martinek, S. & Young, M.W. (2000)** Specific genetic interference with behavioral rhythms in *Drosophila* by expression of inverted repeats. *Genetics* **156**, 1717-1725.
- Mayer-Jaekel, R.E. & Hemmings, B.A. (1995)** Role of protein phosphatase 2A in *Drosophila* development. *Semin. Cancer Biol.* **6**, 249-256.
- Miller, J.H. (1972)** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Misquitta, L. & Paterson, B. (1999)** Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for *nautilus* in embryonic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1451-1456.
- Mundt, K.E., Liu, C., Carr, A.M. (2002)** Deletion mutants in COP9/signalosome subunits in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* display distinct phenotypes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 493-502.
- Mundt, K.E., Porte, J., Murray, J.M., Brikos, C., Christensen, P.U., Caspari, T., Hagan, I.M., Millar, J.B., Simanis, V., Hofmann, K., Carr, A.M. (1999)** The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Curr. Biol.* **9**, 1427-1430.
- Musti, A.M., Treier, M., Bohmann, D. (1997)** Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* **275**, 400-402.
- Naumann, M., Bech-Otschir, D., Huang, X., Ferrell, K., Dubiel, W. (1999)** COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J. Biol. Chem.* **274**, 35297-35300.
- O'Kane, C.J. & Gehring, W.J. (1987)** Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9123-9127.
- Ollmann, M., Young, L.M., Di Como, C.J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W.W., Buchman, A., Duyk, G., Friedman, L., Prives, C., Kopczynski, C. (2000)** *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* **101**, 91-101.
- O'Neill, J.W. & Bier, E. (1994)** Double-label *in situ* hybridisation using biotin and digoxigenin-tagged RNA probes. *Biotechniques* **17**, 870-874.
- Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh, E.A., Kominami, K. et al. (2000)** Covalent modifier Nedd8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J.* **19**, 3475-3484.
- Owen, G.I. & Zelent, A. (2000)** Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor family. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 809-827.
- Paululat, A., Burchard, S., Renkawitz-Pohl, R. (1995)** Fusion from myoblasts to myotubes is dependent on the *rolling stone* gene (*rost*) of *Drosophila*. *Development* **121**, 2611-2620.
- Paululat, A., Goubeaud, A., Damm, C., Knirr, S., Burchard, S., Renkawitz-Pohl, R. (1997)** The mesodermal expression of *rolling stone* (*rost*) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **138**, 337-348.
- Peng, Z., Serino, G., Deng, X.W. (2001)** A role of *Arabidopsis* COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* **128**, 4277-4288.

- Peng, Z., Serino, G., Deng, X.W. (2001)b** Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2393-2407.
- Peng, Z., Staub, J.M., Serino, G., Kwok, S.F., Kurepa, J., Bruce, B.D., Vierstra, R.D., Wei, N., Deng, X.W. (2001)c** The cellular level of PR500, a protein complex related to the 19S regulatory particle of the proteasome, is regulated in response to stresses in plants. *Mol. Biol. Cell* **12**, 383-392.
- Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C.P., Costa, R. (2001)** Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res.* **29**, E55.
- Pirotta, V. (1986)** Cloning *Drosophila* genes. *Drosophila: a practical approach* (ed. Roberts, D.B.) IRL Press, Oxford, 83-100.
- Read, M.A., Brownell, J.E., Gladysheva, T.B., Hottelet, M., Parent, L.A., Coggins, M.B. et al. (2000)** Ned8 modification of cul-1 activates SCF-beta-TrCP-dependent ubiquitination of IkkappaBalpha. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2326-2333.
- Robertson, H.M., Preston, C.R., Phillis, R.W., Johnson-Schlitz, D.M., Benz, W.K., Engels, W.R. (1988)** A stable genomic source of P-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 461-470.
- Rong, Y.S. & Golic, K.G. (2000)** Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* **288**, 2013-2018.
- Rong, Y.S. & Golic, K.G. (2001)** A targeted gene knock out in *Drosophila*. *Genetics* **157**, 1307-1312.
- Rong, Y.S., Titen, S.W., Xie, H.B., Golic, M.M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., Brodsky, M., Rubin, G., Golic, K.G. (2002)** Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* **16**, 1568-1581.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G.M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansoerge, W., Cohen, S.M. (1998)** Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-1057.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S., Finley, D. (1998)** Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J.* **17**, 4909-4919.
- Rubin, G.M. & Spradling, A.C. (1982)** Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H. (2001)** Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 332-337.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saito, A., Watanabe, T.K., Shimada, Y., Fujiwara, T., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N., Tanahashi, N. Tanaka, K. (1997)** cDNA cloning and functional analysis of p44.5 and p55, two regulatory subunits of the 26S proteasome. *Gene* **203**, 241-250.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saville, K.J. & Belote, J.M. (1993)** Identification of an essential gene, *l(3)73Ai*, with a dominant temperature-sensitive lethal allele, encoding a *Drosophila* proteasome subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8842-8846.
- Schmidt, E.R. (1992)** A simplified and efficient protocol for nonradioactive *in situ* hybridization to polytene chromosomes with a DIG-labeled DNA probe. Nonradioactive *in situ* hybridization, Application Manual Boehringer, 36-38.
- Schwechheimer, C. & Deng, X.W. (2000)** The COP/DET/FUS proteins-regulators of eukaryotic growth and development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 495-503.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M., Deng, X.W. (2001)** Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin response. *Science* **292**, 1379-1382.
- Schwechheimer, C. & Deng, X.W. (2001)** COP9 signalosome revisited: novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol.* **11**, 420-426.
- Schweisguth, F. (1999)** Dominant-negative mutation in the $\beta 2$ and $\beta 6$ proteasome subunit genes affect alternative cell fate decisions in the *Drosophila* sense organ lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11382-11386.
- Seeger, M., Gordon, C., Dubiel, W. (2001)** Protein stability: The COP9 signalosome gets in on the act. *Curr. Biol.* **11**, 643-646.
- Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R., Gordon, C., Naumann, M., Dubiel, W. (1998)** A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.* **12**, 469-478.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988)** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione *S*-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Smyth, K.A. & Belote, J.M. (1999)** The dominant temperature-sensitive lethal *DTS7* of *Drosophila melanogaster* encodes an altered 20S proteasome β -type subunit. *Genetics* **151**, 211-220.
- Spradling, A.C. & Rubin, G.M. (1982)** Transposition of cloned P-elements into the *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-347.
- Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Laverty, T., Mozden, N., Misra, S. Rubin, G.M. (1999)** The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25 % of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-177.
- Steller, H. & Pirotta, V. (1985)** A transposable P vector that confers selectable G418 resistance to *Drosophila* larvae. *EMBO J.* **4**, 167-171.
- Steller, H. & Pirotta, V. (1986)** P transposons controlled by the heat shock promoter. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1640-1649.
- Suh, G.S., Poeck, B., Chouard, T., Oron, E., Segal, D., Chamovitz, D.A., Zipursky, S.L. (2002)** *Drosophila* JAB1/CSN5 acts in photoreceptor cells to induce glial cells. *Neuron* **33**, 35-46.
- Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S.F., Matsui, M., Deng, X.W. (2002)** *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev.* **16**, 554-559.
- Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., Driscoll, M. (2000)** Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat. Genet.* **24**, 180-183.
- Tenbaum, S.P., Juenemann, S., Schlitt, T., Bernal, J., Renkawitz, R., Muñoz, A., Baniahmad, A. (2002)** Alien/CSN2 gene expression is regulated by thyroid hormone in rat brain.

zur Veröffentlichung eingereicht.

Theodosiou, N.A. & Xu, T. (1998) Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods* **14**, 355-365.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882.

Timmons, L. & Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.

Tower, J., Karpen, G.H., Craig, N., Spradling, A.C. (1993) Preferential transposition of *Drosophila* P elements to nearby chromosomal sites. *Genetics* **133**, 347-359.

Treier, M., Staszewski, L.M., Bohmann, D. (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation *in vivo* is mediated by the delta domain. *Cell* **78**, 787-798.

Tsai, C., Kao, H., Yao, T., McKeown, M., Evans, R.M. (1999) SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Mol. Cell* **4**, 175-186.

Tsuge, T., Matsui, M., Wei, N. (2001) The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J. Mol. Biol.* **305**, 1-9.

Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.* **13**, 3191-3197.

Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1989) *numb*, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* **58**, 349-360.

van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M.H., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., Vierstra, R.D. (1996) The multiubiquitin chain binding protein Mcl1 is a component of the 26S proteasome in *S. cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6020-6028.

Wang, X., Kang, D., Feng, S., Serino, G., Schwechheimer, C., Wei, N. (2002) CSN1 N-terminal-dependent activity is required for *Arabidopsis* development but not for Rub1/Nedd8 deconjugation of cullins: a structure-function study of CSN1 subunit of COP9 signalosome. *Mol. Biol. Cell* **13**, 646-655.

Wei, N. & Deng, X.W. (1999) Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from *Arabidopsis* to human. *Trends Genet.* **15**, 98-103.

Wei, N., Chamovitz, D.A., Deng, X.W. (1994) *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* **78**, 117-124.

Wei, N., Tsuge, T., Serino, G., Dohmae, N., Takio, K., Matsui, M., Deng, X.W. (1998) The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr. Biol.* **8**, 919-922.

Winhauer, T. (1995) Regulation der gewebsspezifischen Expression des $\beta 2$ Tubulin-Gens in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* durch trans-aktivierende Faktoren und die Identifikation ähnlich dem $\beta 2$ Tubulin-Gen regulierter Gene. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Wójcik, C. & DeMartino, G.N. (2002) Analysis of *Drosophila* 26S proteasome using RNA interference. *J. Biol. Chem.* **277**, 6188-6197.

Xu, T. & Rubin, G.M. (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.

Yahalom, A., Kim, T.H., Winter, E., Karniol, B., von Arnim, A.G., Chamovitz, D.A. (2001) *Arabidopsis* eIF3e (INT-6) associates with both eIF3c and the COP9 signalosome subunit CSN7. *J. Biol. Chem.* **276**, 334-340.

Yang, D., Lu, H., Erickson, J.W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* **10**, 1191-1200.

Yang, X., Menon, S., Lykke-Andersen, K., Tsuge, T., Xiao, D., Wang, X., Rodriguez-Suarez, R.J., Zhang, H., Wei, N. (2002) The COP9 signalosome inhibits p27^{kip1} degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cul1. *Curr. Biol.* **12**, 667-672.

Yeh, E.T.H., Gong, L., Kamitani, T. (2000) Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* **248**, 1-14.

Yu, Y., Li, W., Su, K., Yussa, M., Han, W., Perrimon, N., Pick, L. (1997) The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein Ftz. *Nature* **385**, 552-555.

Yu, Y., Yussa, M., Song, J., Hirsch, J., Pick, L. (1999) A double interaction screen identifies positive and negative *ftz* gene regulators and Ftz-interacting proteins. *Mech. Dev.* **83**, 95-105.

Zanaria, E. Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W. Lalli, E., Moser, C. et al. (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* **372**, 635-641.

Zhang, P. & Spradling, A.C. (1993) Efficient and dispersed local P element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* **133**, 361-373.

Zhou, C., Seibert, V., Geyer, R., Rhee, E., Lyapina, S., Cope, G., Deshaies, R.J., Wolf, D.A. (2001) The fission yeast COP9/signalosome is involved in cullin modification by ubiquitin-related Ned8p. *BMC Biochemistry*, **2**:7.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all denen, die mich während meiner Doktorandenzeit so großartig unterstützt haben. Als da wären:

Dr. Achim Paululat, der mir als Betreuer immer genug Freiräume für eigene Ideen gelassen hat und auf dessen Unterstützung ich immer zählen konnte,

Dr. Anne Holz, die mir durch ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft eine unentbehrliche Ansprechpartnerin war,

Prof. Renate Renkawitz-Pohl, die mit ihrem herzlichen Wesen und ihrem unerschütterlichen Optimismus immer für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgte,

Ruth Hyland und Dominik Helmecke, die mir bei der Mikroinjektion behilflich waren und bei denen meine Fliegen Urlaub machen durften,

Prof. Leslie Pick, die mir den Aufenthalt und die Arbeit in ihrem Labor an der Mount Sinai School of Medicine ermöglichte und mir somit nicht nur zu einem wissenschaftlichen Fortschritt, sondern auch zu einer tollen Zeit in New York verhalf,

der Boehringer Ingelheim Fond, der diesen Auslandsaufenthalt durch ein Kurzzeitstipendium überhaupt erst möglich machte,

Dr. Miyuki Yussa, die mich mit der Hefe 2-Hybrid Methode vertraut gemacht hat,

Dr. Aria Baniahmad und sein Gießener Alien-Team, besonders Udo Möhren, der mich in die Geheimnisse des GST-Pulldown eingeführt hat,

Drs. Sebastian Breuer, Thomas Kremser, Annette Rau, Nicole Blümer und Cyrill Brand, die während und auch nach ihrer Doktorandenzeit im Re-Po-Lab Super-Kollegen waren,

Peter, Jotti, Miri, Detlev, Reinhold, Marek und alle anderen Arbeitsgruppenmitglieder, die für ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben,

Heike Sauer, Inge Simon und Herr Müller, die guten Geister,

und

meine Familie und mein Freund Mathias, die sowieso die Besten sind.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Genetische und molekulare Analysen zur Funktion von Alien/CSN2 und Rpn6 in *Drosophila* weisen auf eine kooperative Beziehung zwischen Signalosom und Proteasom hin

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, Juli 2002
