

Molekulare und genetische Charakterisierung eines Cyclophilin B-Homologen aus *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Jana Reißmann
geb. am 04.07.1973 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Fischer, Max-Planck-Gesellschaft „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle
2. Prof. Dr. G. Reuter, Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. M. Gaestel, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule
Hannover

Halle/Saale, den 08.05.2001

Die Arbeit wurde im Rahmen eines ordentlichen Promotionsverfahrens am 15. November
2001 verteidigt.

urn:nbn:de:gbv:3-000002665

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002665>]

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AS	Aminosäure
bidezt.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	doppelsträngige DNA: Kopie der mRNA
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PPIase	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase
PEV	Positionseffekt-Variation
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3- indoxyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	10
2.1. Genetische Methoden	10
2.1.1. Anzucht und Haltung von <i>Drosophila</i>	10
2.1.2. Stabilisierungschromosomen	10
2.1.3. P-Element vermittelte Transformation in <i>Drosophila melanogaster</i>	10
2.1.4. Reversion von P-Elementen	11
2.2. Molekularbiologische Methoden	12
2.2.1. Bakterienstämme und Vektoren	12
2.2.2. Miniplasmidpräparation	13
2.2.3. Großpräparation von Plasmid-DNA	14
2.2.4. Isolation von Plasmid-DNA für Injektionen	14
2.2.5. Großpräparation genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i>	14
2.2.6. DNA-Präparation aus λ -Phagen	14
2.2.7. Isolation von RNA aus Fliegen	15
2.2.8. Klonierung von DNA-Fragmenten	15
2.2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.2.10. Amplifikation von RNA (RT-PCR)	17
2.2.11. DNA-Sequenzierung	18
2.2.12. Nukleinsäure-Blotting und Hybridisierungstechnik	18
2.3. Isolierung und Charakterisierung von Proteinen	19
2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten aus <i>E. coli</i>	19
2.3.2. Dechorionisierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	20
2.3.3. Herstellung von Proteinextrakten aus <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.3.4. Elektrophorese von Proteinen	21
2.3.5. Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	21

2.3.6. Nachweis von Proteinen im Westernblot	22
2.3.7. MALDI-TOF-MS	22
2.3.8. N-terminale Aminosäure-Sequenzierung	23
2.3.9. PPIase-Aktivitätstest	23
2.4. Immunzytologische Methoden	23
2.4.1. Immunmarkierung von <i>Drosophila melanogaster</i> Embryonen	23
2.4.2. Antikörpermarkierung von Ovarien	24
2.5. Spezieller Methodenteil	25
2.5.1. Konstruktion von rekombinanten DmCypB	25
2.5.2. Konstruktion von rekombinanten DmCypB-GST	25
2.5.3. Konstruktion von rekombinanten DmCypB A61R-GST	26
2.5.4. Konstruktion von rekombinanten DmCypB-EGFP	26
2.5.5. Expression und Reinigung von rekombinanten DmCypB-EGFP	27
2.5.6. Band-shift-Analyse	27
3. Ergebnisse	28
3.1. Isolation der c-DNA eines Cyclophilin B-homologen Gens aus <i>Drosophila melanogaster</i>	28
3.2. Isolation von Cyclophilinen aus <i>D. melanogaster</i> Embryonen: Vergleich von Gesamtextrakt und Kernfraktion	31
3.3. Konstruktion verschiedener CypB cDNA-EGFP Fusionsproteine und Herstellung transgener Fliegenlinien	33
3.4. Nachweis und zelluläre Verteilung der CypB cDNA-EGFP-Fusionsproteine	35
3.5. Fütterungsexperimente mit CsA und CsH	39
3.6. Molekulare und genetische Charakterisierung der EP-Insertionslinie 2294	41
3.7. Reversion des EP2294-Elementes	44
3.8. Isolation und Nachweis einer Deletion für das Cyclophilin B aus <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3.9. Reinigung des polyklonalen CypB Antikörpers über die Mutante mit CypB-Defizienz	50
3.10. Immunozytologische Charakterisierung des CYPB-Proteins	52

3.11.	Nachweis der maternalen Komponente durch Northernblot- und Westernblot-Analyse, sowie durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie	56
3.12.	Herstellung von Konstrukten zur Rettung des Mutantenphänotyps	58
3.13.	Untersuchungen von Protein-Protein Interaktionen mit Hilfe eines rekombinanten CypB/EGFP-Fusionsproteins und nativer Gelelektrophorese	60
4.	Diskussion	63
4.1.	Charakterisierung der cDNA eines Cyclophilin B-homologen Gens aus <i>Drosophila melanogaster</i>	63
4.2.	Der CypB-Locus kodiert für ein cytoplasmatisch lokalisiertes Protein	64
4.3.	Die Deletion des CypB-Gens führt zu rezessiver Letalität	67
4.4.	Das Cyclophilin B-Protein wird maternal exprimiert	69
4.5.	Nutzung des CyclophilinB/EGFP-Fusionsproteins zum Studium von Protein-Protein-Interaktionen	72
5.	Zusammenfassung	77
6.	Literatur	80
7.	Anhang	92

Was wir wissen ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen – ein Ozean

SIR ISAAC NEWTON

1. Einleitung

Proteine spielen eine Schlüsselrolle in nahezu allen biologischen Prozessen. Fast alle Katalysatoren chemischer Reaktionen in biologischen Systemen sind Proteine. Neben dem chemischen Umsatz in der Zelle erfüllen sie ein weites Spektrum an Funktionen, wie z.B. Transport und Speicherung, koordinierte Bewegung, mechanische Stützfunktionen, Immunabwehr, Nervenerregung, Stoffwechselregulation sowie die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung. Der kritische Parameter für die biologische Funktion eines Proteins ist seine Konformation, d.h. seine dreidimensionale Anordnung der Atome im Molekül. Die Ausbildung der Primärstruktur von Proteinen erfolgt durch die kovalente Verknüpfung der Aminosäuren zu einer Polypeptidkette. Früher nahm man an, dass die Sequenz der Aminosäuren die Information enthält, die für die korrekte räumliche Anordnung der Polypeptidkette verantwortlich ist. Die Faltung eines Proteins somit unter entsprechenden Bedingungen ein spontaner Prozeß ist (Anson, 1945; Anfinsen, 1973), an dem weder Enzyme noch Hilfsstoffe beteiligt sind. Die *in vivo* Situation scheint aber sehr viel mehr komplexer. Während im Verlauf von Rückfaltungsreaktionen *in vitro* oft die Bildung von Aggregaten beobachtet wurde, die zu einer verringerten Faltungsausbeute führten (Freedmann, 1992), scheinen Proteinfaltungsereignisse *in vivo* sehr effizient und meistens schnell zu verlaufen (Gething und Sambrook, 1992). Heute werden immer mehr Faltungshelfer gefunden. Dazu gehören auch Enzyme, die eine Konformationsänderung katalysieren. Zwei Klassen von Enzymen, die die Proteinfaltung katalysieren sind bekannt: Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen und Protein-Disulfid Isomerasen (Fischer, 1994; Dolinski and Heitman, 1997)

Die Ausbildung der speziellen Konformation einer Polypeptidkette resultiert aus der eingeschränkten Rotation von Einfachbindungen, die das kovalente Grundgerüst der Peptidkette bilden und durch die Torsionswinkel Φ (C_{α} -N), Ψ (C_{α} -C) und ω (C-N) beschrieben werden. Die Peptidbindung weist aufgrund der Elektronendelokalisation innerhalb der CO-NH-Bindung einen partiellen Doppelbindungscharakter auf. Daher ist die Drehung um den Torsionswinkel ω eingeschränkt und erlaubt prinzipiell zwei Konformationen. In Bezug auf die Anordnung der benachbarten C_{α} -Atome wird die *cis*-Konformation ($\omega \cong 0^{\circ}$) von der *trans*-Konformation ($\omega \cong 180^{\circ}$) unterschieden. Aufgrund der sterischen Hinderung von

Substituenten benachbarter C_{α} -Atome in der *cis*-Konformation kommt in Peptiden und Proteinen hauptsächlich das *trans*-Konformer vor (Hobohm und Sander, 1994).

Prolin nimmt unter den proteinogenen Aminosäuren eine Sonderstellung ein, da es zum einen als einzige Iminosäure aufgrund des fehlenden Stickstoff-Protons nicht in der Lage ist, als Wasserstoffbrücken-Donor zu fungieren. Zum anderen ist der Torsionswinkel Φ (C_{α} -N) innerhalb des starren Pyrolidinringes auf einen schmalen Bereich um 65° beschränkt (Morris, 1992). Weiterhin sind sterische Konflikte für die limitierte Drehbarkeit der C_{α} -C(=O) Bindung des N-terminal zum Prolin stehenden Aminosäurerestes in einer Xaa-Pro-Bindung verantwortlich (Schellenberger, 1989). Im Gegensatz zur „normalen“ Peptidbindung kommt deshalb in einer Peptidyl-Prolyl-Bindung neben der energetisch günstigeren *trans*-Konformation auch ein merklicher Anteil der entsprechenden *cis*-Konformation im Gleichgewicht vor. In Abhängigkeit von der flankierenden Aminosäure N- und C-terminal zum Prolin wurde in Oligopeptiden ein *cis*-Gehalt von 6-38% gefunden (Grathwohl und Wüthrich, 1981, Reimer *et al.*, 1998).

Aufgrund der strukturellen Zwänge in gefalteten Proteinen wird nur eine definierte Konformation ausgebildet. Für einige native Proteine wie Insulin (Higgins *et al.*, 1988), Myotoxin A (O'Keefe *et al.*, 1996), Calbindin (Chazin *et al.*, 1989) oder Staphylokokken-Nuklease (Evans *et al.*, 1987) konnte gezeigt werden, dass die *cis*- und *trans*- Konformationen im Gleichgewicht stehen.

Die Beteiligung der *cis/trans* Isomerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt konnte für Faltungsvorgänge *in vitro* gezeigt werden (Schmid *et al.*, 1993). Eine entsprechende Rolle *in vivo* wurde häufig diskutiert (Wetlaufer, 1985; Fischer und Schmid, 1990; Jaenicke, 1993) und auch nachgewiesen.

Ein 18 kDa-Protein, welches unter physiologischen Bedingungen die relativ langsam ablaufende Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerisierung an der Aminosäure Prolin beschleunigen kann, wurde erstmals von Fischer *et al.* (1984) aus der Nierenrinde des Schweins isoliert. Dieser erste Vertreter der Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIasen, EC 5.2.1.8) ist identisch mit dem Cyclosporin A bindenden Protein Cyclophilin 18 (Fischer *et al.*, 1984).

In den letzten Jahren hat sich die Zahl der Proteine, die der Enzymklasse der PPIasen zugeordnet werden, vervielfacht. Sie werden entsprechend ihrer homologen Sequenz und ihrer Bindung an immunsuppressive Inhibitoren in drei Familien eingeteilt. Die erste Familie umfaßt die Cyclophiline, die durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A inhibiert werden.

Der zweiten Familie werden alle FK506 bindende Proteine (FKBP) zugeordnet, die durch das Immunsuppressivum FK506 inhibiert werden. Parvulin aus *E. coli*, mit 10 kDa eines der kleinsten bekannten Proteine mit nachgewiesener Enzymaktivität (Rahfeld *et al.*, 1994), stellt einen Vertreter der dritten PPIase-Familie dar. Parvuline sind weder durch Cyclosporin A noch durch FK506 inhibierbar. Die Aminosäuresequenzen sind innerhalb der Familien stark konserviert.

Obwohl eine Vielzahl an genetischen und biochemischen Daten vorliegen, ist die physiologische Rolle der PPIasen relativ wenig verstanden. So kann die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* unter optimalen Wachstumsbedingungen auf ihr gesamtes Repertoire an Cyclophilinen (8 Isoformen) und FKBP (4 Isoformen) verzichten (Dolinski *et al.*, 1997), während die Deletion nur eines Parvulins, dem Ptf1, zur Lethalität führt (Hani *et al.*, 1995).

Neben der vorgeschlagenen Funktion bei der Proteinfaltung sind PPIasen an vielen weiteren wichtigen zellulären Prozessen beteiligt. Von Bedeutung sind beispielsweise, die für die HIV-Replikation essentielle Interaktion des humanen Cyp 18 mit dem Gag-Polyprotein (Franke *et al.*, 1994; Thali *et al.*, 1996; Luban, 1996), sowie die Beteiligung von FKBP am Nervenwachstum (Steiner *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 1995; Gold, 1997). Weiterhin wurde FKBP12 als Bindungspartner des TGF β -Typ1-Rezeptors (Wang *et al.*, 1996; Okadome *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997), von Ca²⁺-Kanälen (Xiao *et al.*, 1997; Brillantes *et al.*, 1997), sowie als Bestandteil von inaktiven heterooligomeren Steroidhormonrezeptoren (Yem *et al.*, 1992) identifiziert. Am Aufbau solcher Komplexe ist neben den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 auch Cyp40 beteiligt (Lebeau *et al.*, 1992). Für Cyp40 wurde ebenfalls eine *in vitro* Interaktion mit dem zellulären Protooncogen c-Myb nachgewiesen. Es wurde diskutiert, inwieweit PPIasen an der Regulation der Transkriptionsaktivität von Protooncogenen beteiligt sein könnten (Levenson und Ness, 1998).

Die Beteiligung von PPIasen an der *de novo* Proteinfaltung wurde darauf zurückgeführt, dass sowohl CsA als auch FK506 die Biogenese von heterodimerer bakterieller Luciferase nach deren Synthese in Kaninchen-Retikulozytenlysat stark beeinträchtigen (Brunke *et al.*, 1996).

Weiterhin konnte durch Untersuchungen zur zellulären Proteinfaltung die Beteiligung der PPIase-Aktivität am Beispiel von Cyclophilinen demonstriert werden (Rassow *et al.*, 1995; Matouschek *et al.*, 1995; Steinmann *et al.*, 1991; Kruse *et al.*, 1995). Bei der Oligomerisierung von Kollagen-Monomeren zur Tripelhelix im ER kommt es zur sukzessiven *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl- bzw. Hydroxyprolinbindungen, die *in vitro* und *in vivo* geschwindigkeitsbestimmend sind (Steinmann *et al.*, 1991; Bächinger, 1987). Des Weiteren

wurde nachgewiesen, daß Cyclosporin A die Faltung von Procollagen I in Fibroblasten von Hühnerembryonen verzögert (Steinmann *et al.*, 1991). PPIasen scheinen somit aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität an der Biogenese von Kollagen beteiligt zu sein.

In zwei voneinander unabhängigen Studien konnte die Beteiligung von Cyclophilinen an Faltungsprozessen *in vivo* nachgewiesen werden. Zum einen wurde gezeigt, dass Cpr3p, ein Cyclophilin aus der Matrix von Hefe-Mitochondrien, die Faltung eines Fusionsproteins beschleunigt, welches in Retikulozyten-Lysat synthetisiert und dann in die Matrix von isolierten Hefe-Mitochondrien importiert wurde. Das Modellprotein enthielt die Sequenz für die Untereinheit 9 der F1F0-ATPase, die mit der Dihydrofolat-Reduktase der Maus fusioniert wurde. Da Proteine beim Import in die mitochondriale Matrix eine entfaltete Konformation einnehmen, müssen sie nach dem Transport wieder ihre native dreidimensionale Struktur ausbilden. Der Faltungsprozess konnte mit Hilfe dieses Modellproteins anhand der steigenden Proteasestabilität verfolgt werden, da im Gegensatz zur nicht-nativen Form die native Struktur Protease-resistent war. Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von CsA eine fünffache Reduzierung der *in vivo* Faltungsrate auftrat (Matouschek *et al.*, 1995). In einer anderen Studie konnte die Beschleunigung der Faltung eines importierten Proteins durch das mitochondriale Cyclophilin 20 nachgewiesen werden (Rassow *et al.*, 1995). Ein ähnlicher Verzögerungsfaktor wurde festgestellt, wenn die Importmaschinerie von Cyp 20 defizienten Mitochondrien verwendet wurde. Eine Zugabe von CsA zu diesem System führte zu keiner weiteren Reduktion der Faltungsrate.

Es gibt bisher nur wenige Beispiele für die Notwendigkeit der PPIase-Aktivität *in vivo*. Für das humane Pin 1, dem Homologen des Ptf1 in Hefe konnte eine essentielle Beteiligung an der Regulation der Mitose festgestellt werden (Lu *et al.*, 1996). Enzymatisch inaktive Varianten von Pin1 konnten den letalen Effekt von mutierten Ptf1 in *Saccharomyces cerevisiae* nicht aufheben. Pin1 ist eine Kern-lokalisierte PPIase und interagiert mit der NIMA-Kinase (Never In Mitoses A kinase). Der NIMA-pathway ist in die G₂/M-Transition involviert. Bei Deletion von Pin 1 aus HeLA-Zellen und Ess1, dem Pin 1-Homologen der Hefe verblieben die Zellen in der G₀-Phase und wurden apoptotisch. Es wird angenommen, dass Pin 1 die G₂/M-Transition kontrolliert. Homozygote Mäuse für die Pin 1-Deletion zeigten keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotypen (Fumihoro *et al.*, 1999). Ebenso zeigen *Drosophila melanogaster* Nullmutanten für das *dodo*-Gen, dem Pin 1 Homologen der Fruchtfliege keine phänotypischen Abnormalitäten (Malezka *et al.*, 1996). ES-Zellen aus Maus, die Null-Allele für Cyclophilin A tragen, wachsen und differenzieren in Zellkultur

völlig normal (Colgan, *et al.* 2000). Diese PPIase scheint somit nicht essentiell für die Vitalität der Säugerzellen zu sein.

Im Zuge des Genom-Projektes des Menschen und der Aufklärung von Krankheiten kommt den PPIasen ebenfalls Bedeutung zu. Es wurde beschrieben, dass Pin 1 die Funktion des Alzheimer-assoziierten phosphorylierten tau-Proteins wieder herstellt (Lu *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2000). Eine andere PPIase, das FKBP 6, ist bei Patienten mit Williams-Syndrom deletiert. Diese Krankheit äußert sich in Fehlentwicklungen multipler Organsysteme, geistiger Retardierung, infantiler Hypercalcemia und Wachstumsstörungen. Die Fehlentwicklungen wird durch eine Haploinsuffizienz der Gene in Region 7q11.23 hervorgerufen (Xun *et al.*, 1998).

Nullmutanten für FKBP12 in der Maus führen zu schweren Herzfehlern, die sich in einem linken ventrikulären Myocardium, Cardiomyopathie und ventrikulären septalen Defekten sowie einer starken Vergrößerung des Herzen äußern. Des weiteren zeigten 9% der Nullmutanten Defekte beim Schließen des Neuralrohres (Weinian *et al.*, 1998). Auch hier führt der Verlust der PPIase zu schweren Entwicklungsstörungen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen dieser FKBP *-/-* Mäuse in der G₁-Phase des Zellzyklus arretierten (Aghdasi *et al.*, 2000).

Einblicke in die *in vivo* Rolle von Cyclophilinen wurden mit Untersuchungen des *nina A* Gens bei *Drosophila melanogaster* erzielt (Stamnes und Zuker, 1990, Zuker *et al.*, 1991). Mutationen im *nina A*-Gen führen zu einer extremen Reduktion des Rh1 Rhodopsin in den R1-6 Photorezeptorzellen (Larrivee *et al.*, 1991; Schneuwly *et al.*, 1989 und Shie *et al.*, 1989). Das NINA A-Protein ist spezifisch für das Rh1 Pigment und wird für den Transport aus dem ER benötigt. (Colley *et al.*, 1991 und Stamnes *et al.*, 1991). Weitere Studien zeigten, dass NINA A ein Photorezeptor-spezifisches integrales Membranprotein ist. Die Cyclophilin homologe Domäne befindet sich im Lumen des ER und in intrazellulären Transportvesikeln (Colley *et al.*, 1991 und Stamnes *et al.*, 1991). In einem genetischen Screen wurden ca. 700.000 Ethylmethyl-Sulfonat behandelte Tiere auf den sichtbaren Phänotyp der Pseudopupille untersucht und siebzig unabhängige *nina A* Mutanten-Allele isoliert. Alle Missens-Mutationen wurden lokalisiert und mit dem 42% identischen humanen CypA verglichen. Von 20 Aminosäure-Austauschen fallen 14 in die Region, die mit dem humanen CypA identisch ist, und die CsA bindende Region sowie die Substratbindungsstelle bilden

(Ondek *et al.*, 1992). Auf diese Weise konnte beeindruckend nachgewiesen werden, dass die *in vivo* Funktion mit der Peptidyl-Prolyl Substratbindungsstelle zusammenfällt.

Um weitere Einblicke in die *in vivo* Funktion von PPIasen zu gewinnen und deren mögliche Beteiligung an intrazelluläre Signalprozessen zu verstehen, wurden verschiedene Methoden zur Identifikation von Interaktionspartnern entwickelt. Interaktionen zwischen Proteinen werden üblicherweise mit biochemischen (Affinitätschromatographie, Immunpräzipitationen) und chemischen Methoden (Crosslinking) oder analytische Ultrazentrifugation identifiziert und quantifiziert. All diese Verfahren beruhen aber auf der Detektion von Protein-Proteinwechselwirkungen *in vitro*. Das von Fields und Song, 1989 entwickelte Hefe-Dihybridsystem weist Protein-Protein-Wechselwirkungen in intakten Zellen nach. Dabei wird die DNA-Bindungsdomäne und die transkriptionsaktivierende Domäne von Transkriptionsfaktoren benutzt.

Mit Hilfe dieses Systems konnte eine Interaktion des Cyclophilin 5 aus *Arabidopsis thaliana* mit der N-terminalen Domäne des GNOM-Proteins nachgewiesen werden (Grebe *et al.*, 2000). Das GNOM-Protein ist ein Guanin-Austauschfaktor (GEF), welcher ein G-Protein vom ARF-Typ (ADP-Ribose-Faktor) aktiviert. Dieses G-Protein ist wiederum für die Zellpolarität während der Embryonalentwicklung von Bedeutung. Cyclophilin 5 reguliert somit möglicherweise die ARF/GEF Funktion des GNOM-Proteins während der Embryonalentwicklung.

Weiterhin konnte mit dem Hefe-Dihybridsystem die Interaktion eines bisher unbekanntes Cyclophilins aus *Drosophila melanogaster* mit dem Heterochromatin assoziierten Protein SU(VAR)3-9 (Suppressor of Variegation) nachgewiesen werden (Fischer, 1997). Heterochromatin ist der Teil des Chromatins, der während der Zellteilung auch in der Interphase kondensiert vorliegt. Eine Vielzahl an Chromatinproteinen, welche am Aufbau höherer Chromatinstruktur beteiligt sind, wurden durch die Nutzung des Positionseffekt-Variegations (PEV)-Systems in *Drosophila* identifiziert (Reuter und Spierer 1992). Das Su(var)3-9-Gen kodiert für ein Protein, das neben der Chromodomäne eine SET-Domäne enthält. (Tschiersch *et al.*, 1994). Die SET-Domäne ist ein evolutionär konserviertes Proteinmotiv vieler Chromatin-Proteine (Jenuwein, 1998). Die SET-Domäne wurde auch in dem PcG-Protein E(z) (Jones und Gelbart 1993) und im antagonistisch agierenden TRITHORAX-Protein (Mazo, 1990) nachgewiesen. Aus dieser Beziehung wurde die Bezeichnung der Domäne: Su(var)3-9, Enhancer of zeste und Trithorax-Domäne abgeleitet.

Eine wichtige Funktion der SET-Domänen Proteine könnte in der Regulation des Zellzyklus liegen. So konnte für das humane MMSET-Protein ein oncogenes Potential bei Überexpression gezeigt werden. Die durch eine Translokation hervorgerufene Überexpression des Wildtyp-Proteins führt zu einer malignen Transformation und zur Entstehung eines multiplen Myeloms. Der Phosphorylierungsstatus der SET-Domäne ist ein wichtiger Schaltmechanismus zwischen ruhenden Zellen in der G₀-Phase und ungehemmt proliferierenden Zellen. Durch Phosphorylierung von HRX, dem humanen Homologen von Trithorax aus *Drosophila melanogaster*, an einem Tyrosinrest in der SET Domäne entfaltete dieses Protein sein oncogenes Potential und führte zur Transformation von Zelllinien (Cui *et al.*, 1998).

Mit der Identifikation eines neuen Cyclophilins aus *Drosophila melanogaster* als Interaktionspartner für das Heterochromatin-assoziierten SU(VAR)3-9 Protein war die Möglichkeit gegeben, neue Erkenntnisse über die *in vivo* Funktion von PPIasen, insbesondere dieses Cyclophilins zu gewinnen. *Drosophila melanogaster* stellt einen attraktiven Modellorganismus für eine Vielzahl biologischer Fragen dar. In ihrem natürlichen Zustand ist sie eine kleine diploide Fliege, die sich nach einem der üblichen Lebenszyklen von Insekten entwickelt, vom Ei über Larve und Puppe zum erwachsenen Tier. Bei 25°C dauert dieser Zyklus etwa 10 Tage. Durch die leichte Kultivierbarkeit und hohe Vermehrungsrate kann eine große Individuenzahl für verschiedene Experimente bereit gestellt werden. Die Entwicklung zahlreicher genetischer Techniken, wie EMS-Mutagenese (Alderson, 1965; Lewis und Bacher, 1968), P-Element vermittelter Gentransfer (Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982; Karess und Rubin, 1984), P-Element vermittelte Mutagenese (Cooley *et al.*, 1988) ermöglichten die funktionelle Charakterisierung verschiedener Gene. Das übersichtliche Genom von *Drosophila melanogaster* mit nur 4 Chromosomen ist für Kreuzungsversuche ideal. Mit der Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms (Adams *et al.*, 2000; Berkeley *Drosophila* Genome Projekt) wurde ein weiterer Meilenstein für die Erforschung der Funktion verschiedener Gene gelegt.

Zielstellung der Arbeit

Trotz umfangreicher Untersuchungen ist der molekulare Mechanismus der *in vivo* Effekte vieler PPIasen offen. In vorangegangenen Arbeiten konnte ein bisher unbekanntes Cyclophilin aus *D. melanogaster* identifiziert werden. Mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems wurde eine putative Interaktion dieses Cyclophilins mit SU(VAR)3-9, einem Heterochromatin-assoziierten Protein, gezeigt (Fischer, 1997). Die genetische und molekulare Charakterisierung dieses Cyclophilins sollte die Erkenntnisse über die Eigenschaften und Funktion eukaryotischer Cyclophiline erweitern. Dazu war die Isolation der vollständigen cDNA notwendig. Die cDNA des unbekanntes Cyclophilins, welche sowohl C- als auch N-terminal mit GFP fusioniert wurde, sollte als Ausgangspunkt für die Herstellung transgener Fliegenlinien genutzt werden. Die Linien sollten mit der Expression der verschiedenen Fusionsproteine unter Kontrolle des Hitzeschock-Promotors hsp70 in *Drosophila melanogaster* zu Aussagen über die räumlichen Verteilung dieser PPIase führen.

Um Erkenntnisse über die *in vivo* Funktion des Cyclophilins zu erhalten sollte eine Mutantenanalyse durchgeführt werden. Es wurde deshalb nach Insertionen von transponiblen Elementen in der genomischen Region des Cyclophilins gesucht. Mit der EP 2294-Linie (Rorth, 1996 und Rorth *et al.*, 1998) konnte eine solche Insertion gefunden werden, die molekular und genetisch charakterisiert wurde. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, diese Linie als Ausgangspunkt für ein Mutagenese-Experiment zu nutzen. Dieses Experiment sollte zur Erzeugung einer Nullmutante für das Cyclophilin-Homologe aus *Drosophila melanogaster* dienen. Eine ortsspezifischen Mutagenese bei der ein Aminosäure-Austausches innerhalb der Cyclophilin homologen Domäne erfolgte, sollte untersucht werden, um Voraussetzungen für eine Charakterisierung der PPIasen-Aktivität *in vivo* zu schaffen. Des weiteren sollte die Konstruktion und die Aufreinigung einer rekombinanten Proteinvariante des Cyclophilins genutzt werden, um einen polyklonalen Antikörper gegen das zu untersuchende Cyclophilin zu erhalten. Dieser spezifische Antikörper sollte genutzt werden, um mit Hilfe immunochemischer Methoden Aussagen zur Expression des Cyclophilins während verschiedener Entwicklungsstadien zu treffen. Immunocytologische Analysen sollten zur Aufklärung der zeitlichen und räumlichen Feinlokalisierung dieser PPIase beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Cyclophilin erstmals als essentiell für die Lebensfähigkeit eines komplexen Organismus beschrieben. Die Nullmutation des untersuchten Cyclophilins führte zu rezessiver Lethalität. Um diesen Mutanten-Phänotyp zu retten, mussten genomische Konstrukte fertiggestellt werden. Voraussetzung dafür war die Sichtung einer rekombinanten Phagenbibliothek mit genomischen Inserts und die Isolation dieser Phagen.

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, stellen einen Beitrag zur Aufklärung der Funktion von PPIasen *in vivo* dar.

2. Material und Methoden

2.1. Genetische Methoden

2.1.1. Anzucht und Haltung von *Drosophila*

Die Anzucht von *Drosophila* erfolgte auf einem Standardmedium (1% Agar, 2,5% Sirup, 3,5% Rosinen, 3% Gries, 5% Hefe, 0,1% Nipagin und 0,16% Propionsäure). Um Bakterienwachstum zu unterdrücken wurden dem Futter abwechselnd die Antibiotika Ampicillin (500 mg) und Tetracyclin (15 mg) zugesetzt. Die Haltung der Stammlinien erfolgte bei 18°C, Kreuzungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Zur Gewinnung von Eiablagen wurde ein spezielles Medium aus 2% Agar, 10% Zucker, 0,1% Essigsäure und 2,25% Nipagin verwendet. Zur Stimulation der Eiablage wurde kurz vor Verwendung der Platten eine Spatelspitze Hefe gegeben.

2.1.2. Stabilisierungschromosomen

Mutationen wurden in stabilisierten, heterozygoten Stammlinien gehalten. Mit Hilfe von Stabilisierungschromosomen wird Crossover zwischen den beiden homologen Chromosomen wirksam ausgeschlossen. Für das 2. Chromosomenpaar wurden die Chromosomen SM1 – In(2LR)SM1, a^2 Cy cn^2 sp^2 ; CyO – In(2LR)0, dp^{1v1} Cy pr cn^2 ; Cy Roi – In(2L)Cy + In(2L)t + In(2R) CyRoi, sowie der CyO/GFP-Balancer (Rudolph *et al.*, 2000) verwendet.

Für das 3. Chromosomenpaar wurde TM3 – In(3LR), y^+ ri p^p sep bx^{34e} e^s Ser Sb als Balancer-Chromosomen genutzt. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Mutationen ist in Lindsley und Zimm (1992) zu finden.

2.1.3. P-Element vermittelte Transformation in *Drosophila melanogaster*

DNA-Sequenzen, die in Vektoren mit flankierenden P-Element-Repeats kloniert werden, können durch das Enzym Transposase stabil in das Genom von *Drosophila* integrieren. (Rubin und Spradling, 1982). Tragen diese Vektoren Markergene, wie *rosy* oder *vermilion* kann der Einbau in das Genom auch phänotypisch verfolgt werden. Die Vektoren werden als Plasmide präpariert und zusammen mit einem Helferplasmid (Transposasequelle) in

2.2. Molekularbiologische Methoden

Standardkulturmedien und Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Die Selektion der verwendeten Plasmide erfolgte auf Ampicillin-Resistenz. Das Antibiotikum wurde den Medien in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

2.2.1. Bakterienstämme und Vektoren

Tabelle 2.-1.: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
DH5	SupE44; lac U 169 (lacZ M15) hsd R17 rec A1 EndA1 gyrA96 thi-1 rel A1	Gibco/BRL (1987)
XLI Blue	(mcrA)183; (mcrCB- hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Lac	Stratagene (1987)
SOLR™	e14 ⁻ (mcrA) (mcrB-hsdSMR- mrr) 171sbcC recB recJ uvr umuC::Tn5 (Kan ^r) lac GyrA96relA1 thi-1 endA1 F' proAB lac ZMD115 Tn10 (Tet ^r)	Stratagene (1987)

Tabelle 2.-2.: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
pBluescript II KS(-)	Subklonierung	Stratagene (1987)
pGEM-T	Klonierung von PCR-Fragmenten	Promega (1996)
pP{GS[ry+hsEGFP]}	Transformationsvektor für EGFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des Hitzeschock-Promotors in <i>D. melanogaster</i>	Schotta und Reuter (2000)

2.2.2. Miniplasmidpräparation (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Es wurden 1.5 ml einer Übernachtskultur pelletiert und in 200 µl Lösung I [50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA] vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II [0.2 M Natrium-Hydroxid, 1% (w/v) SDS] wurde der Ansatz vorsichtig geschwenkt bis eine stark visköse, klare Suspension entstand. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 200 µl eiskalter Lösung III [3 M Kalium-Acetat, pH 5.5] versetzt. Es wurde weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend die Proteine durch 10 minütige Zentrifugation bei 12000 x g präzipitiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die darin enthaltene DNA mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wurde für 30 Minuten bei 12000 x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.3. Großpräparation von Plasmid-DNA

Für Großpräparationen wurde der Plasmid-Midi-Kit der Firma Quiagen nach Maßgabe des Herstellers verwendet.

2.2.4. Isolation von Plasmid-DNA für Injektionen

Zur Injektion vorgesehene DNA wurde, wie unter 2.2.3. beschrieben, aufgearbeitet und zusätzlich über Anionenaustauschersäulen (Typ Elutip-D) der Firma Schleicher & Schüll gereinigt. Dabei wurde laut Protokoll des Herstellers verfahren. Anschließend wurde die DNA in Injektionspuffer (0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8, 5 mM KCl) aufgenommen.

2.2.5. Großpräparation genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster*

Mit der Methode nach Jowett (1986) lassen sich große Mengen genomischer DNA gewinnen. Dafür wurden 100 Tiere mit Diethylether betäubt und bei -70°C eingefroren. Anschließend wurden sie in 2 ml Extraktionspuffer (0,2 M Saccharose; 0,1 M Tris-HCl pH 9,2; 0,1 M NaCl; 0,05 M EDTA) im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Dem Ansatz wurden 300 μl 8M Kaliumacetat zugefügt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurden die präzipitierten Proteine bei 13000 x g pelletiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene DNA mit 2 Volumen 96% Ethanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in Aqua bidest. aufgenommen.

Diese Methode wurde abgewandelt, wenn keine 100 Tiere zur Verfügung standen. Für 5-15 Tiere wurde ein Zehntel der angegebenen Lösungen eingesetzt. Die so gewonnene DNA wurde in 20 μl Aqua bidest. aufgenommen. Davon wurde 1 μl für PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.2.6. DNA-Präparation aus λ -Phagen

Für die Präparation von Bakteriophagen-DNA wurde die Methode nach Sambrook *et. al* (1989) angewendet und wie folgt modifiziert.

Eine Übernachtskultur des *E. coli* Stammes XL-1 Blue MRA wurde sedimentiert, die Zellen in TM 10-Puffer (10 mM MgSO_4 ; 10 mM Tris: pH 7,5) resuspendiert und die optische Dichte

bei 600 nm bestimmt ($1\text{OD} = 8 \times 10^8$ Zellen) Zu 10^9 *E. coli* Zellen wurden 5×10^6 λ -Phagen gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml Top-Agar (2,5 g LB-Medium (Sigma); 0,7g Agarose) wurde der Ansatz auf Petrischalen mit LB-Agar (Sigma) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Phagen-DNA aus dem Plattenlysat präpariert. Dazu wurden 10 ml TM 10-Puffer in die Petrischalen gegeben und die Phagen unter Schwenken für 3 Stunden eluiert. Danach erfolgte eine 30 minütige Behandlung des Phageneluates mit DNase und RNase bei einer Endkonzentration von jeweils $1 \mu\text{g/ml}$. Nachfolgend wurde NaCl zu einer Endkonzentration von 1 M zugesetzt, eine Stunde auf Eis inkubiert und die Bakterienrückstände durch 10 minütige Zentrifugation bei $5000 \times g$ und 4°C sedimentiert. Aus dem Überstand wurden die Phagenpartikel durch Zugabe von PEG 6000 (Endkonzentration 10%) bei 4°C für 1-2 Stunden gefällt. Die Sedimentation der Phagenpartikel erfolgte durch 30 minütige Zentrifugation bei $5000 \times g$ und 4°C . Das Sediment wurde in 2 ml TM10-Puffer resuspendiert und mehrmals mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Die Phagenpartikel wurden nach Zugabe von EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 20 mM), Proteinase K (Endkonzentration $50 \mu\text{g/ml}$) und SDS (Endkonzentration 0,5%) für eine Stunde bei 37°C aufgeschlossen. Die DNA wurde einmal mit dem gleichen Volumen Phenol, zweimal mit einem Volumen Phenol-Chloroformgemisch (1:1) und zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Die Phasen wurden jeweils durch 10 Minuten Zentrifugation bei $5000 \times g$ getrennt. Gefällt wurde die DNA nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaCl mit 2,5 Volumen 96%igem Ethanol. Nach Sedimentation (30 Minuten, $5000 \times g$, 4°C) wurde die DNA einmal mit 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.7. Isolation von RNA aus Fliegen

Die Isolation von Total-RNA erfolgte nach der Trizol-Methode (Gibco BRL) unter Maßgabe des Herstellers.

2.2.8. Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach Sambrook *et al.* (1989) kloniert. Restriktasen (MBI Fermentas), Phosphatase (Shrimp alkaline phosphatase, Amersham), Ligase (T4 DNA ligase, MBI Fermentas) wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mit dem „QIAex Gel Extraktions Kit“ (Qiagen) aus Agarosegelen isoliert.

Kompetente Zellen für die Transformation der ligierten Fragmente wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

2.2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in Anlehnung an Seiki *et al.* (1990) und nach Herstellerangaben für Taq-Polymerase (Gibco BRL) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten im Robocycler Gradient96 (Stratagene) oder im TrioThermoblock (Biometra)

Neben den Standardprimern T3, T7, M13revers, Plac1, Plac4, Pry2, Pry4 und spep1 wurden die folgenden Primer verwendet.

Tabelle 2.-3.: Verwendete Primer

Klonierung der GFP-Fusionsproteine

cycloB-forw 5' -ATA GGG CCC GTC GCT TGA GGA ATA AAC- 3'

CypB(NotI) 5' -ATA GCG GCC GCC GTC GGT GGC ATC GGC CTT G- 3'

CypB(SalII) 5' -ATA GTC GAC TGA TGA AGC TGT TCT TAT CC- 3'

CypB(AatII) 5' -ATA GAC GTC TTA GTC GGT GGC ATC GGC CTT G- 3'

Aufklärung der Exon/Intron-Struktur und RT-PCR-Analysen

CYup 5' -GGT CCC AAA GTG ACC GAG AAG G- 3'

CYdown 5' -CGA ACA GAC CGA TCT CGA TGC G- 3'

Cyp intern up 5' -ACG ATG AAG CTG TTC TTA TCC G- 3'

Cyp intern down 5' -CGA CAG GAT CTT GCC GAA G- 3'

Molekulare Charakterisierung der Revertanten

F2 5' -GAG AAG AAG AGA GCA GAG AAG GC- 3'

B1 5' -GGT GAT GTC AAA GAA AAC CTA CGC- 3'

B2 5' -ACC TGG CAC CCT ACT ATG TTG G- 3'

Herstellung von rekombinanten DmCyp20

Cyp (BamHI) 5' -ATA GGA TCC TTA GTC GGT GGC ATC GGC CTT GG- 3'

Cyp (NheI) 5' -ATA GCT AGC GAC GAT AGC AAG GGT CCC AAA GTG- 3'

Herstellung von rekombinanten DmCyp20-GST

CypB-GST up 5' -ATA GAA TTC GAC GAT AGC AAG GGT CCC- 3'

CypB-GST down 5' -ATA CTC GAG TTA GTC GGT GGC ATC GGC- 3'

Herstellung von rekombinanten DmCyp20R61A-GST

Cyp R→A 5'-CAT GAA GTC CTT GAT GAT **GGC** GTG GAA GTT GCT GCC CTT G-3'

Herstellung von rekombinanten DmCyp20-EGFP

Cyp/GFP (BamHI) 5'-ATA GGA TCC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG- 3'

Cyp/GFP (NheI) 5'-ATA GCT AGC GAC GAT AGC AAG GGT CCC AAA GTG- 3'

2.2.10. Amplifikation von RNA (RT-PCR)

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Genexpression untersucht und quantifiziert. Die Reverse-Transkription erfolgte mit M-MLV (Promega) im Trioblock (Biometra) nach Angaben des Herstellers.

2.2.11. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger *et al.* 1977 durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM™ Rhodamin Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin Elmer) am ABI 377. Die Sequenzen wurden mit dem Programm MacVector (Kodak Eastman) und Genscan Software (Burge and Karlin, 1997) ausgewertet.

2.2.12. Nukleinsäure-Blotting und Hybridisierungstechnik (nach Southern, 1975)

Die Methode wurde zur Sichtung rekombinanter Phagen mit genomischen Inserts, zur Sichtung einer c-DNA-Bibliothek und zur Analyse von mRNA (Northern-Blot) angewandt. Das Prinzip beruht auf der Bildung eines Duplexmoleküls aus den denaturierten Nukleinsäuren, die auf einer Membran immobilisiert wurden und dem komplementären markierten DNA-Fragment.

Sichtung von Phagenbibliotheken mit genomischen Inserts und cDNA-Bibliotheken

Für die Sichtung genomischer Phagen wurde eine Lambda FIX II Bibliothek (Stratagene) nach Angaben des Herstellers genutzt. Gesuchte c-DNA Inserts stammen aus der Uni-Zap™ XR Bibliothek (Stratagene), die ebenfalls nach Angabe des Herstellers gesichtet wurden. Die Phagen wurden mit einer Dichte von 10.000-30.000 Plaques pro Petrischale ausplattiert. Als Wirtsstamm diente der *E. coli* –Stamm XL-1 Blue MRA (Stratagene).

Northern-Blotting

Für die Northern-Blot-Analysen wurde durch Reinigung über Oligo(dT)-Affinitätssäulen (Amersham) angereicherte polyadenylierte mRNA verwendet. Da die RNA bereits in denaturierenden Gelen aufgetrennt wurde, ist eine Denaturierung der RNA unnötig.

Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung erfolgte mit ³²P-ATP nach Feinberg und Vogelstein (1983) unter Verwendung von Hexanukleotid-Primern (random priming) nach dem Protokoll des „Multiprime DNA-labelling systems“ (Amersham Pharmacia Biotech). Die Abtrennung der

markierten DNA von den freien Nukleotiden erfolgte im Anschluß an die Reaktion über eine Sephadex G-50 Säule. Die DNA-Sonden wurden durch 5 minütige Inkubation im kochenden Wasserbad denaturiert.

Hybridisierung

Die Nitrocellulosefilter mit der immobilisierten DNA wurde eine Stunde in Hybridisierungspuffer (50% Formamid; 5 x SSC; 1% SDS) bei 42°C präinkubiert.

Hybridisierungslösung: 50% Formamid; 5 x SSC; 1% SDS; 5 x Denhardt-Puffer;
50 mg/l Hefe-RNA

50 x Denhardt-Puffer: 2% Ficoll; 2% PVP; 2% BSA

10 x SSC: 1,5 M NaCl, 150 mM Na-citrat; Ph 7,5

Anschließend wurde die ³²P-dATP markierte Sonde gekocht, die Prähybridisierungslösung verworfen und durch 50 ml neue Hybridisierungslösung mit Sonde ersetzt. Es wurde über Nacht bei 42°C hybridisiert. Im Anschluß daran wurden die Filter zweimal 15 Minuten in 2 x SSC; 0,1% SDS und anschließend zweimal in 0,1 x SSC; 0,1% SDS bei 42°C gewaschen.

Zur Entfernung der Sonde bei Mehrfachhybridisierungen wurde die Membran für 10 Minuten in Aqua bidest. gekocht und sofort für eine neue Hybridisierung verwendet.

Autoradiographie

Die Filter wurden nach der Hybridisierung mit der jeweiligen ³²P-markierten Sonde zwischen zwei Verstärkerfolien mit Röntgenfilm bei -70°C exponiert.

2.3. Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten aus *E. coli*

Die Zellen der analytischen Ansätze wurden in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde bei 13.000 x g zentrifugiert und 10 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel (10-20%) geladen.

2 x SDS-Probenpuffer: 4% SDS; 120 mM Tris HCL pH 6,8; 20% Glycerol; 200mM DTT, 0,007% Bromphenolblau

2.3.2. Dechorionisierung von *Drosophila*-Embryonen

Die Embryonen wurden mit einem Pinsel von den Platten abgesammelt und dreimal in PBS (137 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl) gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen für ca. 2-3 Minuten in einer 6%igen Natriumhypochloritlösung inkubiert, um das Chorion zu entfernen. Die Embryonen wurden nochmals dreimal in PBS gewaschen.

2.3.3. Herstellung von Proteinextrakten aus *Drosophila melanogaster*

Denaturierte Extrakte

Tiere der entsprechenden Entwicklungsstadien (Embryonen, verschiedene Larvenstadien, Adulte) wurden in einer entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer homogenisiert, 5 Minuten bei 95°C inkubiert und sofort auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen oder bei -20°C aufbewahrt.

Präparation von Kernextrakten

Für die Präparation von Kernextrakten aus *Drosophila melanogaster* wurde die Methode von Elgin und Hood (1973) genutzt und wie folgt modifiziert.

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Es wurden 2 g dechorionisierte Embryonen im Dounce-Homogenisator in 7,5ml PufferII homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend durch ein Nylonnetz mit der Porengröße von 100 µm filtriert.

PufferII: 0,05 M Tris-maleat; 0,005 M MgCl₂; 0,01 M β-Mercaptoethanol;
0,1mM PMSF pH 7,4

Das Filtrat wurde auf 2,5 ml 0,2M Saccharose in PufferII gegeben und für 10 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet nacheinander in PufferII; PufferII mit 0,1% Triton-X100 und PufferII gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 2000 x g

abzentrifugiert. Die Kerne wurden in 17 ml 0,2 M Saccharose in PufferII resuspendiert und auf 19 ml 2,2 M Saccharoselösung in PufferIII geschichtet.

PufferIII: 0,01 M Tris-maleat; 0,005 MgCl₂; 0,01 M β-Mercaptoethanol;
0,1 mM PMSF pH 7,4

Die Kerne wurden für 100 Minuten bei 85.000 x g (Rotor SW27, Beckmann, 4°C) sedimentiert, dreimal in PufferII gewaschen und in 1 ml Saline/EDTA aufgenommen.

Saline/EDTA: 0,075M NaCl; 0,024 EDTA pH 8,0; 0,1 mM PMSF

2.3.4. Elektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5%, im Trenngel 12,5%-20%. Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer bei 15 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel durchgeführt.

Laufpuffer: 192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS

Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (Benchmark, Gibco BRL) für nachfolgende Westernblots verwendet.

2.3.5. Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Proteingele in Coomassielösung (0,1% Brilliant Blue R250 in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken gefärbt. Die Gele wurden in Aqua bidest. für 20 Minuten in der Mikrowelle bei 750 W entfärbt.

2.3.8. N-terminale Aminosäure-Sequenzierung

Die N-terminalen Aminosäure-Sequenzierung erfolgte durch Edman-Abbau mit dem pulsed-liquid-Sequencer Modell 476A von Applied Biosystems (Foster City, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.3.9. PPIase-Aktivitätstest

Die PPIase-Aktivität wurde bei 10°C mit synthetischen Tetrapeptidderivaten als Substrat im Chymotrypsin-gekoppelten Meßsystem nach Fischer *et al.* (1984) mit einem Hewlett Packard 8452 Dioden-Array UV/VIS Spektrometer gemessen. Stammlösungen der Substrate des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-nitroanilid (19 mg/ml) wurden in Dimethylsulfoxid hergestellt.

2.4. Immunzytologische Methoden

2.4.1. Immunmarkierung von *Drosophila melanogaster* Embryonen

Für die Antikörperfärbung ganzer Embryonen wurde die Methode nach Mitchison und Sedar (1983) angewendet und wie folgt modifiziert.

Nach Dechorionisierung wurden die Embryonen in ein Gemisch aus n-Heptan und 4% Paraformaldehyd in PBS im Verhältnis 1:1 gegeben und 10 Minuten fixiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, 1 Volumen Methanol zugegeben und kräftig geschüttelt. Die auf den Boden gesunkenen devitellinisierten Embryonen wurden 5 x mit Methanol gewaschen und bei -20°C verwahrt. Die Embryonen wurden 3 x mit PBST gewaschen und für 2 Stunden in 10% Ziegen Serum in PBST blockiert. Die primären Antikörper wurden in 10% Ziegen Serum in PBST verdünnt zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3 x 5 Minuten Waschen in PBST wurden die FITC- bzw. Texas Red-markierten sekundären Antikörper (Dianova) zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig erfolgte eine RNaseA-Behandlung (40µg/ml). Nach 3 x 5 Minuten Waschen in PBST wurden die Embryonen 2 Minuten mit Propidiumjodid (Endkonzentration 5 µg/ml PBS) gefärbt und 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Mounting (5% n-Propylgallat in 87% Glycerol in Natriumcarbonatpuffer) wurden die Embryonen für 2 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend unter einem Deckglas eingeschlossen. Die

Auswertung der Färbungen erfolgte am Confokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 510 (Carl-Zeiss). Dabei wurden der 488/458 nm Argon und der 543 nm HeNe1-Laser mit folgenden Strahlengang benutzt:

HFT 488 nm; 543 nm / NFT 545 nm/ Kanal 1 LP 560 nm; Kanal 2 BP 505-560 nm

Es wurden optische Schnitte in x-y Richtung entlang der z-Achse angefertigt. Die optischen Schnittdicken wurden für beide Kanäle aufeinander abgestimmt.

2.4.2. Antikörpermarkierung von Ovarien

Die Ovarien adulter Weibchen wurden nach Theurkauf und Hawley (1992) in PBST präpariert und in einem Eppendorf-Reagiergefäß mit eiskaltem PBST gesammelt. Anschließend wurde PBST durch 300 µl PBS, 150 µl 4% Paraformaldehyd in PBS und 550 µl n-Heptan ersetzt und für eine Minute per Hand geschüttelt. Es wurde dann ein zweiter Fixierschritt in 500 ml PBS, 250 µl Paraformaldehyd in PBS für 20 Minuten durchgeführt. Die Ovarien wurden zweimal 10 Minuten in absolutem Methanol gewaschen und ein drittes Mal mit absolutem Methanol für 30 Minuten. Die Ovarien wurden in 70%-, 50%- und 30%igen Methanol-Lösungen rehydriert. Der letzte Rehydrierungsschritt erfolgte für 2 Stunden in 10% Ziegenserum PBST. Die Antikörpermarkierung und Auswertung der Färbungen erfolgte wie unter 2.4.1. beschrieben.

2.5. Spezieller Methodenteil

2.5.1. Konstruktion von rekombinanten DmCypB

Für die Konstruktion von rDmCypB wurde die codierende Sequenz mittels PCR vom c-DNA Klon 2 amplifiziert und durch den 5'Primer mit einer *NheI* Restriktionsstelle, durch den 3'Primer mit einer *BamHI* Schnittstelle versehen. Das 0,65 kb große, gereinigte Fragment wurde in Blue Script kloniert und in *E. coli* transformiert. Das eingebaute Fragment wurde durch Restriktionsmuster und Sequenzierung überprüft, anschließend in den Überexpressionsvektor pET-21a(+) (Novagen) umkloniert und in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformiert.

Für analytische Ansätze wurden Einzelkolonien, die das Expressionskonstrukt enthalten über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden 1:100 mit 3 ml frischen LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 kultiviert. Es wurden jeweils 1 ml Kulturmedium abgenommen, die Zellen durch zweiminütige Zentrifugation sedimentiert und bei -20°C aufbewahrt. Die verbleibenden Kulturen wurden durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 1mM) induziert und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Je ein Ansatz der Zellen mit rekombinanten Plasmid sowie mit dem Vektorplasmid wurden nicht induziert. Die Bakterienzellen wurden nach der Induktion sedimentiert und bei -20°C aufbewahrt.

Um einen polyklonalen Antikörper für Cyclophilin B-Homologe aus *D. melanogaster* zu erhalten, wurde das gereinigte rekombinante Protein bei der Firma Pab Produktion, Hubertshausen, eingeschickt.

2.5.2. Konstruktion von rekombinanten DmCypB-GST

Für die Konstruktion von rDmCypB-GST wurde die codierende Sequenz mittels PCR vom cDNA-Klon 2/1 amplifiziert und durch den 5'Primer mit einer *EcoRI* Restriktionsstelle, durch den 3'Primer mit einer *XhoI* Schnittstelle versehen. Das 0,65 kb große, gereinigte Fragment wurde in Blue Script kloniert und in *E. coli* transformiert. Der Einbau des Fragmentes wurde durch Restriktionsmuster und Sequenzierung überprüft, anschließend in den Überexpressionsvektor pGex-4T-1 (Pharmacia) umkloniert und in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformiert.

2.5.3. Konstruktion von rekombinanten DmCypB A61R-GST

Für die Konstruktion von rDmCypB-EGFP wurde die codierende Sequenz mittels PCR vom cDNA Klon 2/1 amplifiziert. Durch den internen Primer R→A wurden zwei Punktmutationen gesetzt (CGC→GCG), die zum Austausch von Arginin zu Alanin führte. Durch den 5'Primer wurde das Konstrukt mit einer *EcoRI* Restriktionsstelle, durch den 3'Primer mit einer *XhoI* Schnittstelle versehen. Das 0,65 kb große, gereinigte Fragment wurde in Blue Script kloniert und in *E. coli* transformiert. Der Einbau des Fragmentes wurde durch Restriktionsmuster und Sequenzierung überprüft, anschließend in den Überexpressions-Vektor pGEX-4T-1 (Pharmacia) umklont und in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformiert.

2.5.4. Konstruktion von rekombinanten DmCypB-EGFP

Für die Konstruktion von rDmCypB-EGFP wurde die codierende Sequenz mittels PCR vom cDNA-Klon 2/1 amplifiziert und durch den 5'Primer mit einer *ApaI* Restriktionsstelle, durch den 3'Primer mit einer *NotI* Schnittstelle versehen. Das 0,65 kb große, gereinigte Fragment wurde in Blue Script kloniert und in *E. coli* transformiert. Das klonierte Fragment wurde mit *ApaI* und *NotI* ausgeschnitten und in den Vektor pP{GS} kloniert (Schotta und Reuter, 2000), um das CypB-Homologe C-terminal mit GFP zu fusionieren. Für die Überexpression des Fusionsproteins wurde die codierende Sequenz mittels PCR aus diesem Vektor amplifiziert und durch den 5'Primer mit einer *NheI* Restriktionsstelle, durch den 3'Primer mit einer *BamHI* Schnittstelle versehen. Das 1,3 kb große, gereinigte Fragment wurde in Blue Script kloniert und in *E. coli* transformiert. Der Einbau des Fragmentes wurde durch Restriktionsmuster und Sequenzierung überprüft, anschließend in den Überexpressions-Vektor pET-21a(+) (Novagen) umklont und in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (Novagen) transformiert.

2.5.5. Expression und Reinigung von rDmCypB-EGFP

Die *E. coli* Zellen wurden in zwei Litern LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die rDmCypB-EGFP-Expression mit 1 mM IPTG induziert. Vier Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 x g geerntet und in 200 ml Lyse-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM β-Mercaptoethanol, 0,1% Triton X-100, 5% Glycerol) aufgenommen. Die Zellen wurden mittels French-Press aufgeschlossen. Der zentrifugierte Überstand (15000 rpm, 30 min) wurde zweifach mit Puffer A (5 mM HEPES, pH7,8) versetzt und auf eine mit Puffer A equilibrierte DEAE-Sepharose-Säule (Pharmacia) überführt. Nach mehrmaligen Waschen der Säule mit Puffer A mit 0,1% Triton, wurde rDmCypB-EGFP mit einem linearen Dichtegradienten bis 500 mM Natriumchlorid in Puffer A mittels FPLC (Pharmacia) eluiert. Fraktionen, die rDmCyp20 enthielten wurden durch Ultrazentrifugation (Centricon 30) aufkonzentriert und durch Gelfiltration (Superdex 75 in Puffer A, Pharmacia) separiert. Eine letzte Reinigung des rDmCypB wurde durch Ionen-Austauschchromatographie erreicht. Unter FPLC-Bedingungen wurde ein Gradient von 0-200 mM NaCl eingesetzt.

Alle gereinigten rekombinanten Protein-Varianten wurden mittels SDS-PAGE, N-terminaler Aminosäure-Sequenzierung und Massenspektroskopie analysiert.

2.5.6. Band-shift-Analyse

Die Stammlösung von rDmCypB-EGFP (21 μM in 20 mM Bis-Tris-Propan pH 7.0, 150 mM NaCl und GFP (20 μM in 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl) wurden in PBS entsprechend der angegebenen Konzentrationen verdünnt und für 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Für Inhibierungs-Experimente wurde eine 1 mM Stammlösung verwendet.

Der native Assay erfolgte in TBE Polyacrylamid-Gelen (6%, Novex, San Diego). Die Elektrophorese wurde im Eisbad bei 100 V für 6 Stunden durchgeführt. Die Fluoreszenz-Detektion erfolgte mit CCD-Kamera (Raytest, Straubenhardt) und UV-Transilluminator.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation der c-DNA eines Cyclophilin B-homologen Gens aus *Drosophila melanogaster*

In vorangegangenen Arbeiten konnte ein bisher unbekanntes Cyclophilin aus *D. melanogaster* identifiziert werden. Mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems wurde eine putative Interaktion dieses Cyclophilins mit SU(VAR)3-9, einem Heterochromatin-assoziierten Protein, gezeigt (Fischer, 1997). Für die molekulare Charakterisierung dieses neu identifizierten Cyclophilins war die Isolation der vollständigen cDNA nötig. Es wurde deshalb eine embryonale cDNA-Bibliothek (Stratagene) gesichtet. Als Sonde diente ein 0,8 kb *EcoRI/XhoI* Fragment aus dem Hefevektor pJG 4-5 (Fischer, 1997). Für die Sichtung wurden 350.000 Plaques durchmustert. Es wurden sechs verschiedene Klone mit cDNA-Inserts isoliert. Diese Klone wurden zu einer ersten Charakterisierung mit *EcoRI* und *XhoI* geschnitten. Alle Klone unterschieden sich nicht in ihrem Restriktionsmuster (Abb. 3.-1.).

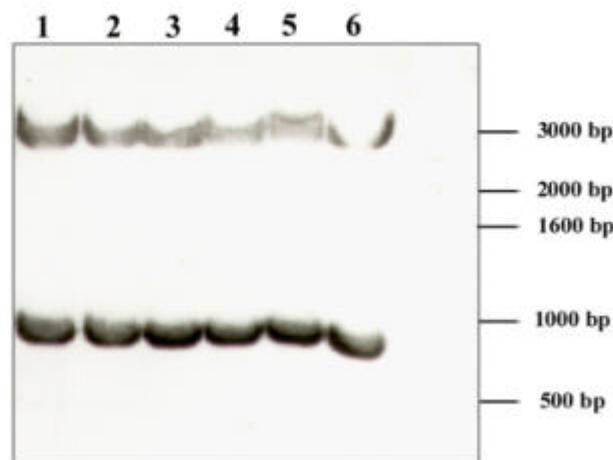


Abbildung 3.-1. Kontroll-Restriktion der im Verlauf der Sichtung erhaltenen cDNA-Klone 1-6. Die DNA der Klone wurden mittels Miniplasmid-Präparation isoliert und mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut.

Nach DNA-Sequenzierung konnte eine vollständige Identität der Klone 1-6 festgestellt werden. Alle gesichteten Klone unterschieden sich nicht im 5'-Bereich und haben den gleichen offenen Leserahmen, der für ein 21 kDa großes Protein kodiert (Anhang, Abb. 7.-1.) Mit der abgeleiteten Proteinsequenz wurde ein Datenbankvergleich (NCBI Blast Search)

durchgeführt. Das bisher nicht beschriebene Cyclophilin aus *D. melanogaster* enthält eine hochkonservierte Cyclophilin-Domäne. Abbildung 3.-2. zeigt einen Vergleich der Proteinsequenz der katalytischen Domäne des neuen Cyclophilins mit der Proteinsequenz der katalytischen Domäne anderer Cyclophiline, entsprechend ihrer größten Homologie.

Aufgrund des N-Terminus, der eine ER-gerichtete Signalsequenz enthält (Abb. 3.-3.), kann das aus der cDNA abgeleitete Cyclophilin-homologe Protein aus *Drosophila melanogaster* der Cyclophilin B Subfamilie zugeordnet werden.

Bei Vergleich der Aminosäuresequenzen von Cyclophilin B Homologen aus Mensch, Maus, und der Fruchtfliege (NCBI Blast Search) fällt der veränderte C-Terminus in dem *Drosophila melanogaster* Homologen auf. Die Aminosäuresequenz –VEKPF~~AI~~AKE-COOH, die eine Sekretion vom Endoplasmatischen Retikulum verhindert, fehlt und ist durch -VSEAFSVAKADATD-COOH ersetzt (Abb. 3.-3.). Es wird angenommen, dass die variablen N- und C-terminalen Regionen die Kompartimentierung der Cyclophiline beeinflusst. Eine Sequenz, die für eine mögliche Kernlokalisierung kodieren könnte, fehlt dem Cyclophilin B-Homologen aus *D. melanogaster*.

CypB aus:

H. sapiens	MKVL LAAALI	AGSVFFLLLP	GPSAADEKKK	GPKVT VKVYF	DLRIGDEDVG	RVIFGL KGKT
M. musculus	MKVL FAAALI	VGSVVFLLLP	GPSVADNKKK	GPKVT VKVYF	DLQIGDES VG	RVVFGL FGKT
D. melanog.	MK-L FLSV FV	VALV-----A	GVVVAD-DSK	GPKVTE KVFF	DITIGGEPAG	RIEIGL FGKT
Homologes						

+ + + +
* ** *

H. sapiens	VPKTV DNFVA	LATGEK GFGY	KNSKF HRVIK	DFMIQ GGDFT	RGDGT GGKSI	YGERF PDENF
M. musculus	VPKTV DNFVA	LATGEK GFGY	KNSKF HRVIK	DFMIQ GGDFT	RGDGT GGKSI	YGERF PDENF
D. melanog.	VPKTV ENFKE	LALKP QEGGY	KGSKF HRVIK	DFMIQ GGDFT	KGDGT GGRSI	YGERF EDENF
Homologes						

++ + + + +
*** * ** *

H. sapiens	KLKHY GPGWV	SMANAG KDTN	GSQFF ITTVK	TAWLD GKHVV	FGKVLE GMEV	VRKVE STKTD
M. musculus	KLKHY GPGWV	SMANAG KDTN	GSQFF ITTVK	TSWLD GKHVV	FGKVLE GMEV	VRKVE STKTD
D. melanog.	KLKHY GPGWL	SMANAG KDTN	GSQFF ITTVQ	TSWLD GRHVV	FGKIL SGMNV	VRQIE NSATD
Homologes						

+

H. sapiens	SRDKPL KDVI	IADCG KIEVE	KPF AI A KE
M. musculus	SRDKPL KDVI	IVDSG KIEVE	KPF AI A KE
D. melanog.	ARDRP VKD V V	IANS GTL P V <u>S</u>	EAF SVAKA <u>DATD</u>
Homologes			

Abbildung 3.-3. Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Cyclophilin B verschiedener Organismen. *Homo sapiens* CypB, *Mus musculus* CypB und *Drosophila melanogaster* isoliertes CypB-Homologes aus cDNA. Aminosäurereste, die in die Cyclosporin A (*) und Substratbindung (+) des humanen CypB einbezogen sind (Kallen *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1991; Pflügl *et al.*, 1993; Theriault *et al.*, 1993), wurden gekennzeichnet. Aminosäuren, die in allen aufgeführten Enzymen konserviert sind, wurden fett gedruckt. Der veränderte C-Terminus des CypB-Homologen aus *D. melanogaster* wurde unterstrichen.

Um dem Cyclophilin B-homologen Gen eine genomische Region zuzuordnen wurde ein Sequenzvergleich der cDNA des Klonen 2 mit der genomischen Sequenz von *Drosophila melanogaster* (Flybase) durchgeführt. Das Gen konnte der Region 2R 58F2-3 zugeordnet werden (Abb.7.-2.). Es besteht aus drei Exonen und zwei Intronen (Abb. 3.-4.).

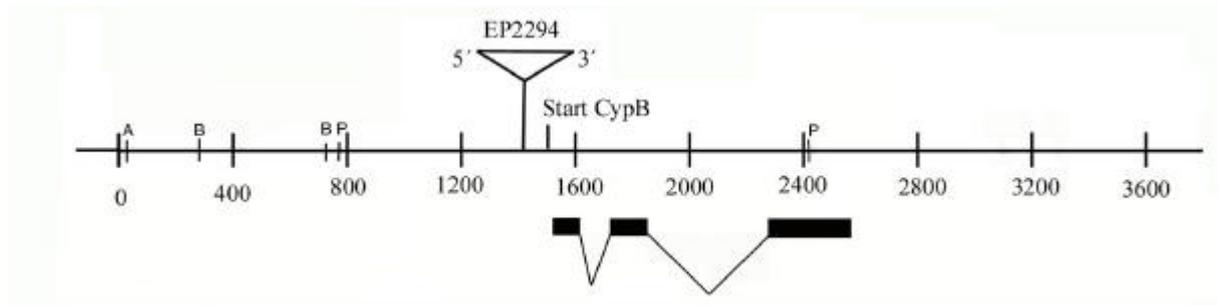


Abbildung 3.-4. Die genomische Karte der 2R 58F2-3 Region mit ausgewählten Restriktionsstellen: A=*Apa*I; B=*Bam* HI; P=*Pst*I. Das Cyclophilin B homologe Gen besteht aus drei Exonen und zwei Intronen.

3.2. Isolation von Cyclophilinen aus *D. melanogaster* Embryonen: Vergleich von Gesamtextrakt und Kernfraktion

Der veränderte C-Terminus und die Interaktion mit dem Heterochromatin assoziierten SU(VAR)3-9 Protein ließ eine mögliche Kernlokalisierung des Cyclophilin B Homologen aus *D. melanogaster* vermuten. Um eventuelle Unterschiede in der Verteilung und Menge der Cyclophiline festzustellen, wurde Gesamtextrakt aus 0-24 Stunden alten Embryonen mit einem aus 0-24 Stunden alten Embryonen gewonnenen Kernextrakt verglichen.

Zur Isolation von Cyclophilinen aus *Drosophila melanogaster* Homogenaten wurde an AffiGel 10 immobilisiertes [Amino-(tetramethylencarboxamidomethyl)-D-Ser]⁸-Cyclosporin A verwendet. Nach Auftrennung der über diese Säule erhaltenen Fraktionen in einem denaturierenden SDS-Gel und anschließender Silberfärbung konnten aus dem Gesamtextrakt drei CsA-Bindungspartner isoliert werden. Es handelt sich dabei um Proteine mit Molekulargewichten von 40 kDa, 21 kDa und 18 kDa. In der Kernfraktion wurden nur noch zwei Bindungspartner detektiert. Die bei Gesamt-Embryonen-Extrakt auftretende Bande von ca. 40 kDa ist nicht mehr erkennbar. Weiterhin ist eine Verschiebung der Mengenverhältnisse

zwischen der 21 kDa und 18 kDa Bande zu beobachten. (Abb. 3.-5.). Das bei einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa auftretende Protein scheint in der Kernfraktion angereichert zu sein.

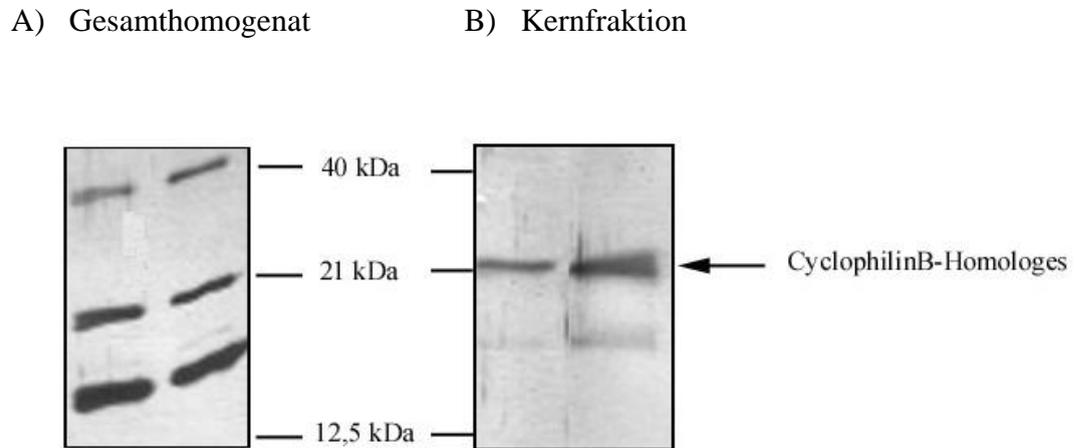


Abbildung 3.-5. A) SDS-Polyacrylamidgel (15%, Silberfärbung) von isolierten Cyclophilinen aus *D. melanogaster* Embryonen (Wildtyp *CantonS*), 0-24 Stunden alt (Gesamtextrakt) (A) und SDS-Polyacrylamidgel (15%, Silberfärbung) von isolierten Cyclophilinen aus *D. melanogaster* Embryonen (Wildtyp *CantonS*), 0-24 Stunden alt (Kernextrakt) (B). Das Cyclophilin B Homologe Protein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der über die Kernfraktion und die CsA-Säule angereicherte CsA-Bindungspartner wurde aus dem Gel ausgeschnitten und N-terminal sequenziert. Die erhaltene Sequenz

Asp Asp Lys Gly Pro Lys Val Thr Glu Lys Val Phe Phe Asp Ile Thr Ile Gly Gly Glu Pro

stimmt mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klonen 2 ab Position 20 überein. Mit MALDI-TOF-Massenspektroskopie wurde ein Molekulargewicht von 20,3 kDa bestimmt.

Der Wert der Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_m für die Beschleunigung der *cis* nach *trans* Isomerisierung der Xaa-Pro-Bindung im Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid beträgt $1,24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Der im Hefedi-hybrid-System identifizierte putative Bindungspartner von SU(VAR)3-9 stellt somit einen neuen Vertreter von Cyclophilinen mit *cis/trans*-Isomerase-Aktivität aus *Drosophila melanogaster* dar. Er konnte der Cyclophilin B-Subfamilie zugeordnet werden, und wurde in der Kernfraktion nachgewiesen.

3.3. Konstruktion verschiedener CypB cDNA-EGFP Fusionsproteine und Herstellung transgener Fliegenlinien

Da das Cyclophilin B-Homologe aus *D. melanogaster* als potentieller Wechselwirkungs-partner für das Heterochromatin assoziierte Protein SU(VAR)3-9 im Hefediybrid-Screen identifiziert wurde und auch in der Kernfraktion angereichert scheint, sollte durch die Fusion der cDNA des Cyclophilin B-Homologen mit EGFP die räumliche Verteilung des Proteins gezeigt werden. Die cDNA wurde sowohl C- als auch N-terminal mit EGFP fusioniert (Abb. 3.-7.). Die Expression der verschiedenen Fusionsproteine erfolgte unter Kontrolle des Hitzeschock-Promotors hsp70 durch Klonierung der cDNA in den Vektor pP{GS[ry+, hs, EGFP]} (Schotta und Reuter, 2000).

Durch P-Element vermittelte Transformation in der Keimbahn von *Drosophila melanogaster* wurden verschiedene transgene Linien geschaffen (Tabelle 3.-1. und 3.-2.). Die Balancierung der Stämme erfolgte über CyO für das 2. Chromosom und TM3 für das 3. Chromosom. Für das Konstrukt pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} wurden 12 stabile Linien etabliert, für das Konstrukt pP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 8 Linien.

Tab. 3.1.: Transgene Fliegenlinien mit CypB cDNA-EGFP (EGFP C-terminal)

Nummer der transgenen Linie	Insertion auf Chromosom	Homozygot lebensfähig
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 1	2	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 2	3	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 3	2	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 4	3	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 5	2	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 6	3	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 7	3	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 8	3	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 9	2	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 10	2	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 11	2	+
pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} 12	2	+

Tab. 3.2.: Transgene Fliegenlinien mit CypB cDNA-EGFP(EGFP N-terminal)

Nummer der transgenen Linie	Insertion auf Chromosom	Homozygot Lebensfähig
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 1	2	+
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 2	3	-
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 3	3	-
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 5	3	+
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 7	2	+
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 8	3	-
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 9	3	+
PP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} 11	3	+

Die verschiedenen transgenen Linien wurden auf Insertion der Konstrukte untersucht. Dafür wurde aus allen Linien DNA isoliert und mittels PCR analysiert. Es wurden EGFP interne und Cyclophilin interne Primer verwendet, mit denen ein spezifisches 1,3 kb-Fragment amplifiziert wurde. Für alle Linien konnte die Insertion des jeweiligen Konstruktes nachgewiesen werden (Abb. 3.-6.). Als Negativ-Kontrolle diente der Wildtypstamm N1.



Abbildung 3.-6. Nachweis des EGFP-Konstruktes in verschiedenen transgenen Linien mittels PCR. Von 100 Fliegen wurde DNA isoliert. Das zu erwartende 1,3 kb große Fragment wurde mit EGFP und Cyclophilin spezifischen Primern amplifiziert. Der Wildtypstamm N1 diente als Negativkontrolle. Bahn 1-12: Linien 1-12 mit dem pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} Transgen; Bahn 13-17: Linie 1, 2, 3, 5 und 7 mit dem pP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} Transgen.

3.4. Nachweis und zelluläre Verteilung der CypB cDNA-EGFP-Fusionsproteine

Um eine mögliche Kernlokalisierung des CypB aus *D. melanogaster* nachzuweisen, wurden die transgenen Linien für einen cytologischen Nachweis der Fusionsproteine genutzt.

Dafür wurden Larven des 3. Entwicklungsstadiums der jeweiligen transgenen Linie 45 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für die Translation und Faltung des EGFP für 3 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Es wurden dann die Speicheldrüsen präpariert und mit dem Confocalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Für alle Linien mit dem pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]}-Transgen konnte das Fusionsprotein cytoplasmatisch nachgewiesen werden. Alle Linien mit dem pP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]}-Transgen zeigen eine diffuse Verteilung der Grünfluoreszenz im Kern (Abb. 3.-8.). Da sich die verschiedenen Linien untereinander in der Lokalisation nicht unterscheiden, sind stellvertretend für alle Linien, die Linie 2, 6 und 8 für die C-terminale Fusion abgebildet. Für die N-terminale Fusion sind stellvertretend die Linien 8, 9 und 11 gezeigt.

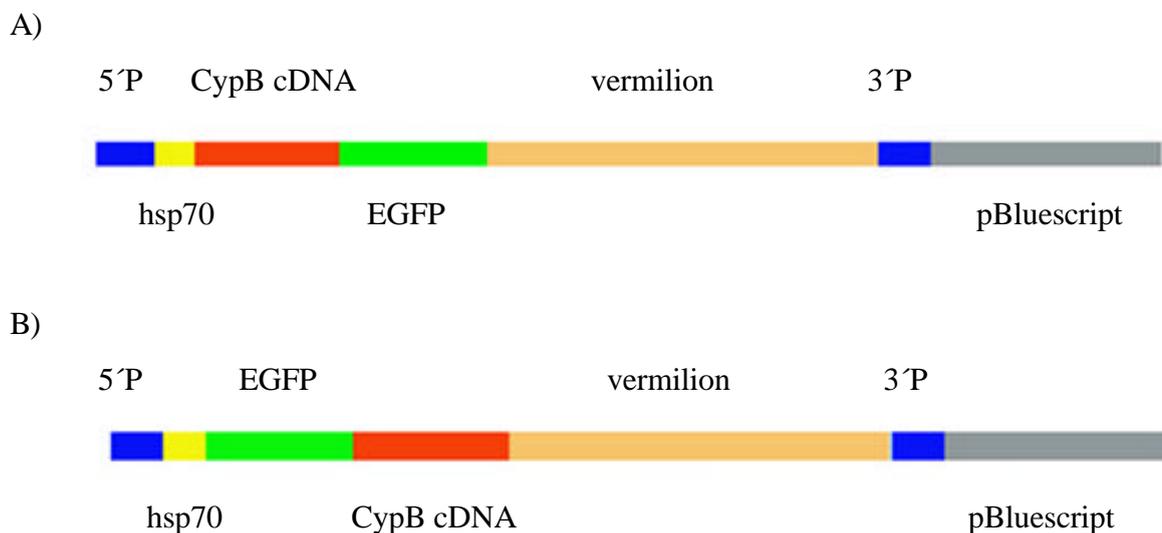


Abbildung 3.-7. Struktur der verschiedenen CypB cDNA-EGFP Konstrukte. A) pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} Konstrukt (C-terminale Fusion von EGFP); B) pP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} Konstrukt (N-terminale Fusion von EGFP)

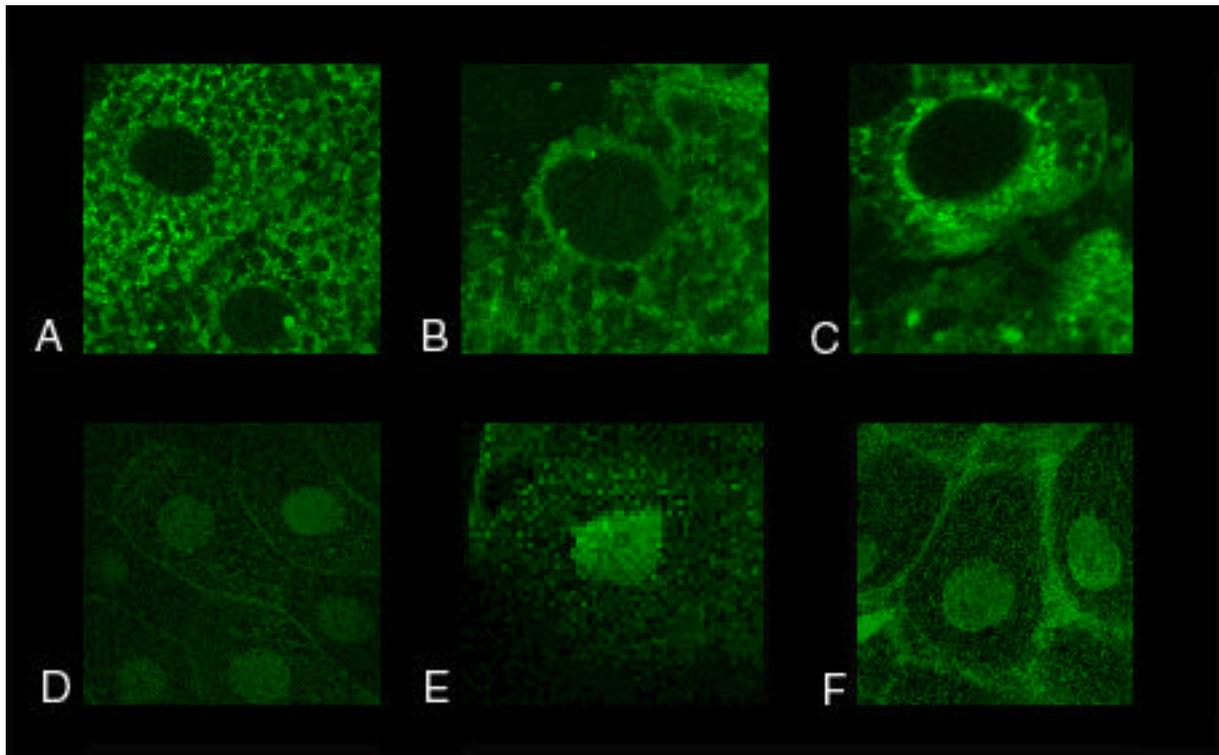


Abbildung 3.-8. Nachweis der verschiedenen CypB cDNA-EGFP Fusionsproteine in Speicheldrüsenzellen verschiedener transgener Linien nach Hitzeschock mittels Confocaler Laserscanning-Mikroskopie: A-C) Linien mit pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} Transgen (C-terminale Fusion von EGFP); A) Linie 2; B) Linie 6; C) Linie 8; D-F) Linien mit pP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} Transgen (N-terminale Fusion von EGFP); D) Linie 8; E) Linie 9; F) Linie 11

Inwieweit es sich bei den detektierten grün-fluoreszierenden Proteinen um die verschiedenen CypB-EGFP Fusionsproteine handelt sollte in einer Westernblot-Analyse gezeigt werden. Dafür wurden zehn Larven des 3. Stadiums der jeweiligen transgenen Linien gesammelt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten zehn Larven des 3. Stadiums der jeweiligen transgenen Linien, die keinem Hitzeschock ausgesetzt wurden. Nach drei Stunden wurden die Larven homogenisiert und auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Für den Immunoblot mit polyklonalem CypB-Antikörper konnte für alle Linien mit dem pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} Transgen (EGFP C-terminal) neben dem internen 21 kDa Wildtyp-Cyclophilin B auch das 46 kDa große Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 3.-9.).

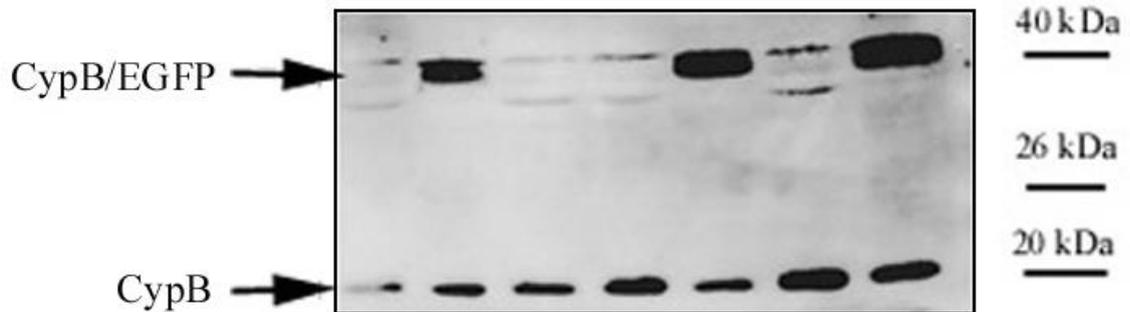


Abbildung 3.-9. Immunoblot mit polyklonalen Anti-CypB an transgenen pP{GS[ry+, hs (CypB cDNA) EGFP]} Linien (EGFP C-terminal fusioniert) Bahn 1) Kontrolle Wildtyp *CantonS*; Bahn 2) Linie 2 mit Hitzeschock; Bahn 3) Linie 2 ohne Hitzeschock; Bahn 4) Linie 6 ohne Hitzeschock; Bahn 5) Linie 6 mit Hitzeschock; Bahn 6) Linie 8 ohne Hitzeschock; Bahn 7) Linie 8 mit Hitzeschock

Für die Linien mit dem pP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} Transgen (EGFP N-terminal) konnte nur das interne Wildtyp-Cyclophilin B nachgewiesen werden (Abb. 3.-10.) Das Fusionsprotein ist nicht detektierbar. Deshalb wurde ein weiterer Immunoblot mit monoklonalen GFP-Antikörper angefertigt. Hier konnte für alle N-terminale EGFP-Linien nur ein 26 kDa großes Protein nachgewiesen werden, welches dem GFP ohne Fusionsanteil entspricht (Abb. 3.-11.).

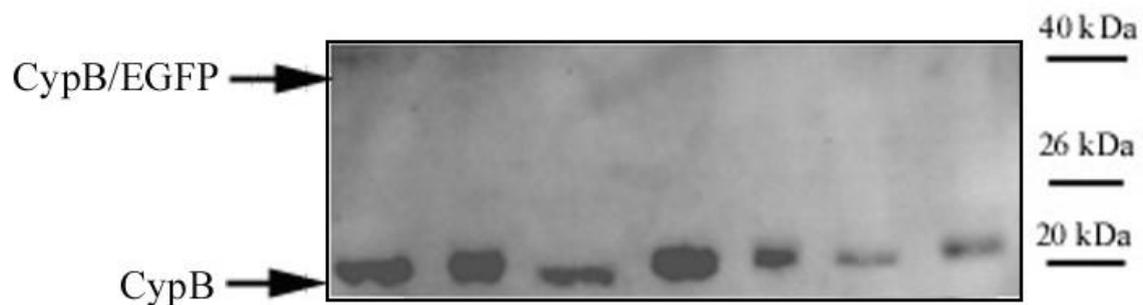


Abbildung 3.-10. Immunoblot mit polyklonalen Anti-CypB an transgenen pP{GS[ry+, hs EGFP (CypB cDNA)]} Linien (EGFP N-terminal fusioniert) Bahn 1) Kontrolle Wildtyp *CantonS*; Bahn 2) Linie 8 ohne Hitzeschock; Bahn 3) Linie 8 mit Hitzeschock; Bahn 4) Linie 9 ohne Hitzeschock; Bahn 5) Linie 9 mit Hitzeschock; Bahn 6) Linie 11 ohne Hitzeschock; Bahn 7) Linie 11 mit Hitzeschock

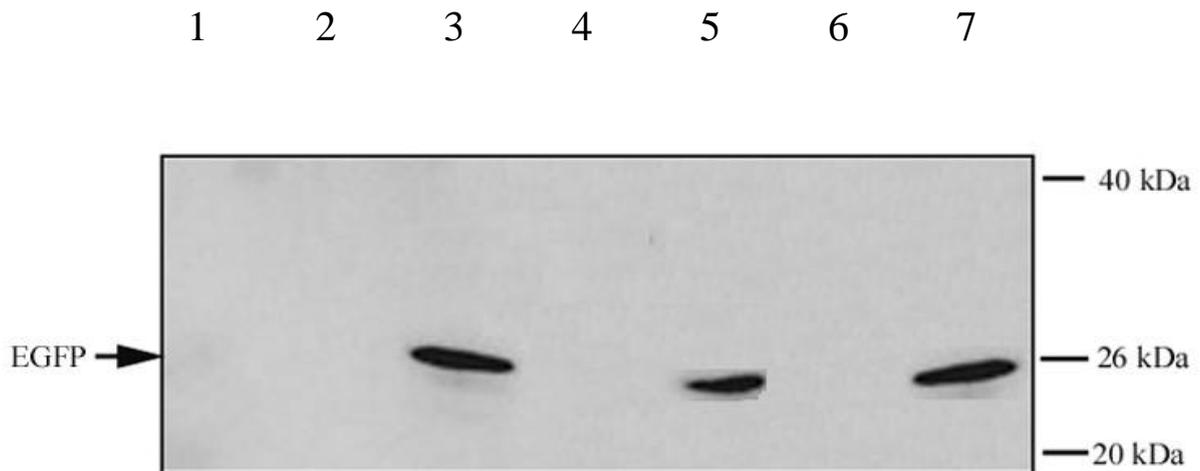


Abbildung 3.-11. Immunoblot mit monoklonalen GFP-Antikörper an transgenen $pP\{GS[ry+, hs\ EGFP\ (CypB\ cDNA)]\}$ Linien (EGFP N-terminal fusionierten) Bahn 1) Kontrolle Wildtyp *CantonS*; Bahn 2) Linie 8 ohne Hitzeschock; Bahn 3) Linie 8 mit Hitzeschock; Bahn 4) Linie 9 ohne Hitzeschock; Bahn 5) Linie 9 mit Hitzeschock; Bahn 6) Linie 11 ohne Hitzeschock; Bahn 7) Linie 11 mit Hitzeschock

Es konnte mit diesen Experimenten eine cytoplasmatische Lokalisation des Cyclophilin B-Homologen aus *D. melanogaster* nachgewiesen werden. Für alle Linien mit dem $pP\{GS[ry+, hs\ (CypB\ cDNA)\ EGFP]\}$ Transgen konnte die Expression des Fusionsproteins gezeigt werden. Alle Linien mit dem $pP\{GS[ry+, hs\ EGFP\ (CypB\ cDNA)]\}$ Transgen (EGFP-N-terminal) exprimieren das Fusionsprotein nicht. Wahrscheinlich wird die N-terminale Zielsequenz mit dem EGFP-Fusionsanteil abgespalten, was zu einer diffusen Anreicherung von EGFP im Kern führte.

3.5. Fütterungsexperimente mit CsA und CsH

Fütterungsexperimente werden in *Drosophila* zu Gentoxizitätsstudien (Kaya et al., 1999 und 2000) benutzt. In einem Fütterungsexperiment sollte der Einfluß von Cyclosporin A auf die Entwicklung von *Drosophila melanogaster* überprüft werden. Die Enzymaktivität der Cyclophiline sollte durch CsA kompetitiv inhibiert werden. Gleichzeitig wurde in einem anderen unabhängigen Fütterungsexperiment die Wirkung von CsH überprüft. Dieses D-¹¹MeVal-Cyclosporin besitzt vergleichsweise zu CsA eine minimale Affinität zu Cyclophilinen (Harrison und Stein, 1992). Es wurde die Schlupfrate von Adulten untersucht. Der Lebenszyklus von *Drosophila* erstreckt sich vom Ei über Larve und Puppe zum erwachsenen Tier. Bei 25°C dauert dieser Zyklus etwa 10 Tage.

Es wurden in diesem Experiment die Anzahl der geschlüpften Tiere gezählt. Auf alle Futterröhrchen (mit und ohne Zusatz) wurden 20 gleichaltrige Weibchen und 10 Männchen gesetzt und für genau 36 Stunden bei 25°C darauf belassen. Danach wurden die Adulten aus diesen Röhrchen entfernt und weiter bei 25°C kultiviert. Damit sollte in allen Futterröhrchen eine statistische Gleichverteilung an Emryonen gesichert sein. Nach 9 Tagen schlüpften die ersten Adulten. Am 11. Tag waren alle Tiere geschlüpft. Alle Puppen, die bis dahin nicht geschlüpft waren, verließen dieses Entwicklungsstadium nicht. In Abbildung 3.-12. ist die Auswertung der Fütterungsexperimente dargestellt. Die Anzahl der Adulten bei Futter ohne Zusatz diente als Kontrolle. Dieser Wert wurde auf 100% gesetzt. Die Anzahl der erwachsenen Tiere, die auf dem Futter mit den verschiedenen CsA- und CsH-Konzentrationen heranwuchsen, wurden entsprechend ins Verhältnis gesetzt. Bei Haltung der Tiere auf 1 µM CsA konnte im Vergleich zur Kontrolle ein Rückgang der Schlupfrate auf etwa 50% am 9., 10. und 11. Tag nach der Eiablage beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 10 µM CsA ging die Schlupfrate auf etwa 30-40% pro Tag zurück. Setzte man CsA in einer Konzentration von 20 µM zu, schlüpften am 9. Tag keine Tiere, am 10. Tag 20% und am 11. Tag 30% Tiere im Vergleich zur Kontrolle. Für alle CsH-Konzentrationen konnte ein gleichbleibender Rückgang der Schlupfrate auf 50% beobachtet werden (Abb. 3.-12.).

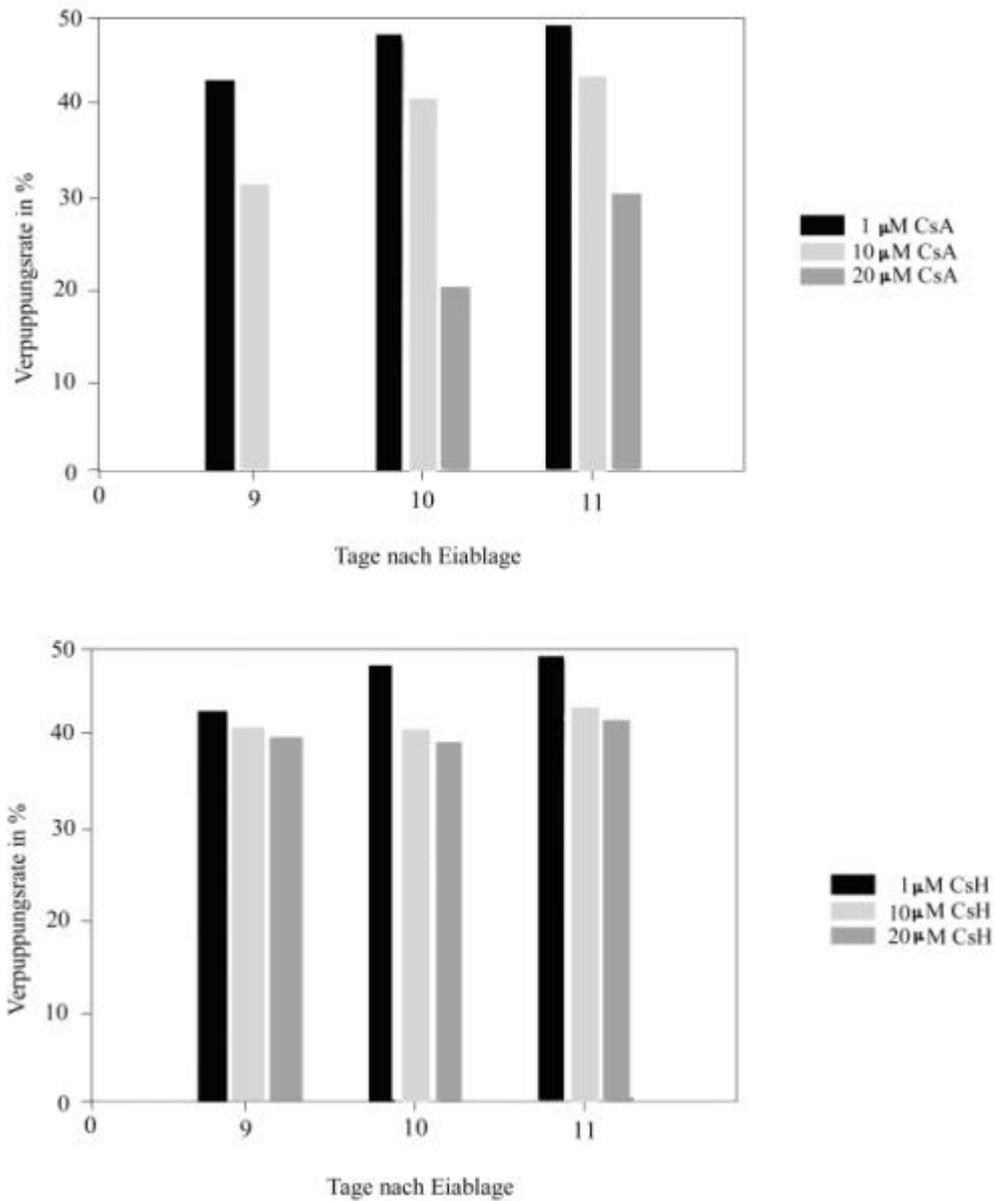


Abbildung 3.-12. Darstellung der im Fütterungsexperiment erhaltenen Daten. *Drosophila*-Standardmedium wurden CsA und CsH in Endkonzentrationen von 1 μ M, 10 μ M und 20 μ M zugefügt. Es wurde die Schlupfrate von Adulten nach 9-11 Tagen bei einer optimalen Inkubationstemperatur von 25°C berechnet. Dabei diente die Schlupfrate von Adulten, die auf Medium ohne Zusatz wuchsen als Kontrolle. Diese Schlupfrate wurde 100% gesetzt und die anderen Schlupfraten prozentual ins Verhältnis gesetzt.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass CsA und CsH die Schlupfrate an Adulten beeinflussen. CsA hat im Vergleich zu CsH größere Auswirkungen auf die Schlupfrate, was wahrscheinlich auf die Inhibierung der verschiedenen Cyclophiline zurückzuführen ist. Für eine Konzentration von 20 μM CsA im Futter ging die Zahl der geschlüpften Tiere im Vergleich zur Kontrolle drastisch zurück. Weiterhin verlängert sich der Entwicklungszyklus um einen Tag. Da der Rückgang der geschlüpften Tiere nicht auf eine spezifische Wechselwirkung von CypB und CsA zurückzuführen ist, sollte eine Mutantenanalyse, die das CypB-Gen betrifft, zu Aussagen über die mögliche Funktion dieser PPIase führen.

3.6. Molekulare und genetische Charakterisierung der EP-Insertionslinie 2294

Um die biologische Relevanz des Cyclophilin B-Homologen aus *Drosophila melanogaster* untersuchen zu können, sollte nach Phänotypen gesucht werden, die auf Mutationen dieses Cyclophilins zurückzuführen sind. Für Mutagenese-Experimente kann die Insertion von transponiblen Elementen genutzt werden. Diese transponiblen Elemente können durch ihre Integration in einer bestimmten genomischen Region zu Mutationen führen.

Es wurde deshalb in der *Drosophila* BDGP Datenbank nach Elementen gesucht, die in der Nähe der genomischen Region von 2R 58 F liegen. Mit der Insertionslinie EP2294 wurde ein solches transponibles Element gefunden (Rorth 1996 und Rorth et al. 1998). Die Linie wurde durch das Stammzentrum in Szeged/Ungarn zur Verfügung gestellt.

Die Linie EP2294 ist im Vergleich zum Wildtyp semiletal und männlich steril. Es musste geklärt werden, ob der auftretende Phänotyp auf die Insertion dieses transponiblen Elementes zurückzuführen ist und inwieweit das CypB-Gen von der Insertion betroffen ist.

Mit 3' und 5' P-Element spezifischen Primern, sowie mit 3' und 5' spezifischen Cyclophilin-Primern wurde zunächst die Insertionsrichtung des EP-Elementes bestimmt. Nach allen möglichen Kombinationen der Primer untereinander konnte festgestellt werden, dass das EP-Element in 5' \rightarrow 3' Richtung vom Cyclophilin inseriert ist (Abb. 3.-13.). Um den genauen Insertionsort des EP-Elementes zu bestimmen wurde mit dem 3'Cyclophilin-Primer Cy down und dem P-Element spezifischen Primer Pry2 ein PCR-Produkt amplifiziert, welches in den pGEM^T-Vektor (Promega) kloniert wurde. Das ca. 200 bp große Fragment wurde anschließend sequenziert. Das EP-Element 2294 ist genau 66 bp vom Translationsstart des Cyclophilin B integriert (Anhang Abb. 7.-2.).

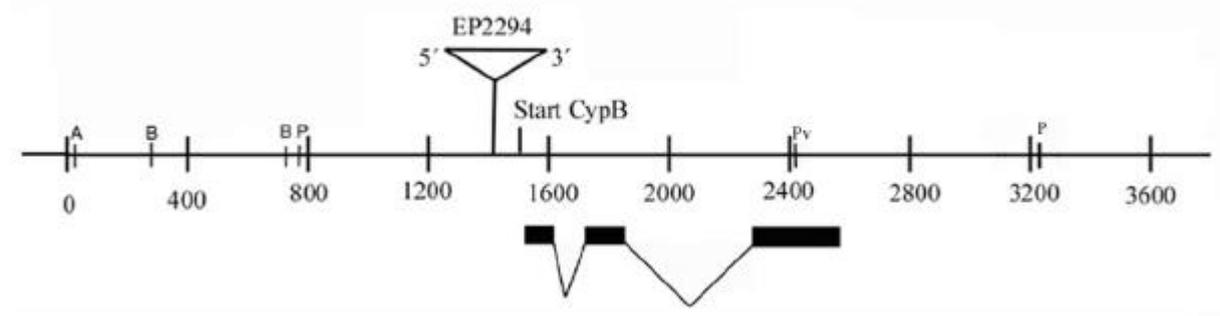


Abbildung 3.-13. Genomische Region des Cyclophilin B Gens mit ausgewählten Restriktionsstellen: A=*ApaI*; B=*BamHI*; P=*PstI*; Pv=*PvuII* und dem Insertionsort des EP-Elementes der Linie EP2294. Das EP-Element liegt in 5'→3'-Richtung zum Cyclophilin-Gen und ist 66 bp von dessen Translationsstart entfernt.

Um zu klären, ob die Insertion des EP-Elementes im Promotorbereich des Cyclophilins zu einer Verringerung der Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp führt, wurde die Methode der RT-PCR gewählt. Es wurde dafür RNA von Wildtyptieren, heterozygoten EP2294-Tieren und homozygoten EP2294-Tieren isoliert und in einem ersten Schritt mit dem Primer Cyp intern down (Tabelle 2.-3.) revers transkribiert. Die so gewonnene cDNA wurde für PCR mit den Gen-spezifischen Primern Cyp intern up und Cy down (Tabelle 2.-3.) eingesetzt. Das Transkript konnte in allen Tieren nachgewiesen werden. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass das Transkript mit der erwarteten Fragmentgröße von 200 bp in homozygoten EP2294-Tieren im Vergleich zu heterozygoten EP2294-Tieren und Wildtyptieren in sehr viel geringerer Menge amplifiziert wurde. Die RT-PCR konnte nur semiquantitativ durchgeführt werden. Als Kontrolle, dass gleiche Mengen an RNA für die RT-Reaktion eingesetzt wurden, diente ein 300 bp Fragment, aus der mRNA für Actin-C-5. (Abb. 3.-14.).

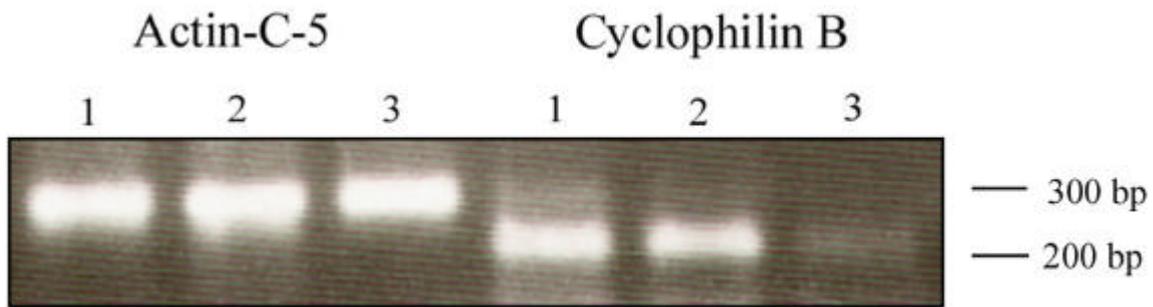


Abbildung 3.-14. Agarosegel nach RT-PCR-Analyse an gesamt RNA des Wildtypstammes *CantonS* (1); von heterozygoten EP2294-Tieren (2) und homozygoten EP2294-Tieren (3) mit Primern für die cDNA des Actin-C-5 Gens und des Cyclophilin B Gens.

Für den Beweis, dass durch die Insertion des EP-Elementes nicht nur die Transkriptmenge sondern auch die Menge des Genproduktes beeinflusst wird, wurde an Gesamtprotein-Extrakt adulter Wildtypiere, heterozygoter EP2294-Tiere und homozygoter EP2294-Tiere eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Detektion des Cyclophilins erfolgte mit polyklonalen CypB-Antikörper, der gegen rekombinantes *D. melanogaster* CypB gewonnen wurde. Die Menge des nachweisbaren Genproduktes ist auch hier bei den homozygoten EP2294-Tieren im Vergleich zu heterozygoten EP2294 Tieren und Wildtyp-Tieren geringer (Abb. 3.-15.). Das Auftragen gleicher Protein-Konzentrationen wurde durch Proteinbestimmung nach Bradford sichergestellt. Da der polyklonale Antikörper nicht nur das CypB spezifisch erkennt, sondern auch eine Kreuzreaktivität mit einem weiteren putatives Cyclophilin von 40 kDa zeigt, dient dies als zusätzliche quantitative Kontrolle.

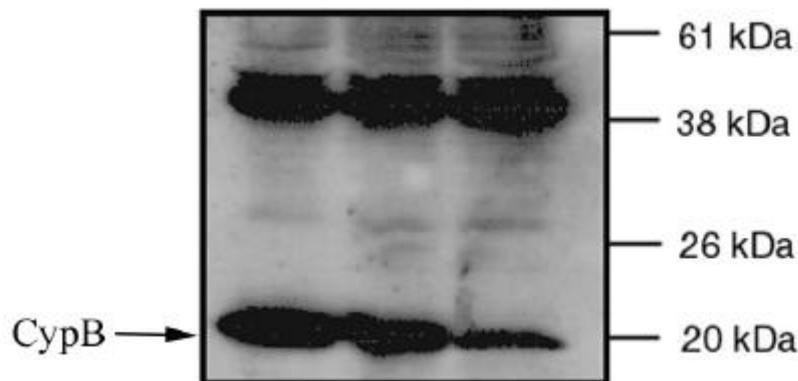


Abbildung 3.-15. Westernblot-Analyse mit polyklonalen CypB-Antikörper (1) Wildtyp *CantonS*, (2) heterozygoten EP2294-Tieren und (3) homozygoten EP2294-Tieren (3).

Durch die Insertion des EP-Elementes im Promotorbereich des Cyclophilin B-Gens wurde sowohl die Transkriptmenge als auch die Menge des Genproduktes stark reduziert. Es handelt sich somit nicht um eine Nullmutation, sondern um eine hypomorphe Mutation für das Cyclophilin B-Gen.

3.7. Reversion des EP2294-Elementes

Im weiteren Verlauf der Arbeit musste überprüft werden, inwieweit der auftretende Mutanten-Phänotyp der EP2294 Linie mit der Insertion des EP-Elementes zusammenfällt.

Dafür wurde ein genetisches Experiment gewählt, in dessen Folge das EP-Element remobilisiert wurde. Das transponible Element der EP2294 Linie wurde durch Kreuzung mit einer Linie, die eine stabile Transposase Quelle exprimiert, remobilisiert. Infolge der Remobilisierung des EP Elementes erfolgt der Ausbau des selbigen und die Insertion an einer beliebigen Stelle des Genoms. Die Anwesenheit des EP-Elementes lässt sich jederzeit anhand des *white*-Gens (w^+) verfolgen, welches das Element als genetischen Marker trägt (Rorth 1996). Im Verlauf der Remobilisierung kann es zu fehlerhaften Ausbauten kommen. In Folge dessen kommt es zum Verlust des transponiblen Elementes. Dieser führt in einigen Fällen zur Wiederherstellung der Wildtypsituation (Engels 2000).

In diesem Experiment wurden 700.000 Fliegen im *white*⁻-Background auf Verlust des EP-Elementes untersucht. Das EP-Element der Insertionslinie EP2294 enthält das *mini-white* Gen. Revertanten wurden als *w*⁻ Nachkommen der F2 Generation isoliert. Das Kreuzungsschema ist Abb. 2.-1. zu entnehmen. Der Verlust des EP-Elementes wurde anhand des fehlenden Pigmentfarbstoffes in den Augen verfolgt. Insgesamt konnten 279 stabile Linien etabliert werden. Von diesen waren 198 Stämme rezessiv letal, für 97 Stämme wurden homozygote Nachkommen erhalten. Alle männlichen homozygoten Tiere waren weiterhin steril. Um die Stämme molekular charakterisieren zu können, wurde DNA isoliert und diese dann für eine PCR mit genomischen Cyclophilin B spezifischen Primern eingesetzt. Der 5' Primer F2 wurde dabei so gewählt, dass er in der genomischen Region vor der EP-Insertion liegt, die beiden 3' Primer B1 und B2 (Tabelle 2.-3.), die sich in der Distanz zum 5' Primer unterscheiden, wurden hinter der Insertion abgeleitet (Abb. 3.-16.). Bei vollständigem Ausbau sollten Fragmente mit einer Länge von 737 bp, für die Primer-Kombination F1/B1 und 897 bp für die Primer-Kombination F1/B2 zu erwarten sein (Abb. 3.-17.).

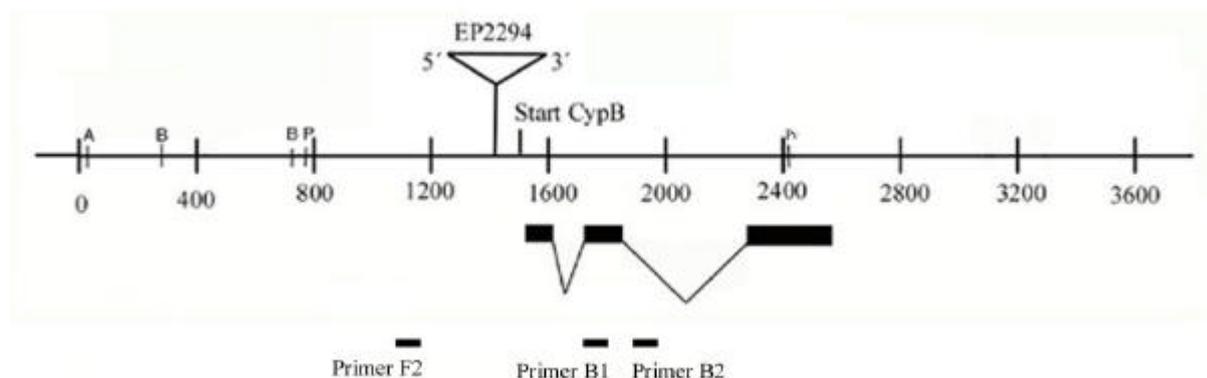


Abbildung 3.-16. Genomische Region mit ausgewählten Restriktionsstellen und den Bindungsstellen der Cyclophilin internen Primer zur Charakterisierung, der im Reversionsexperiment erhaltenen Linien.

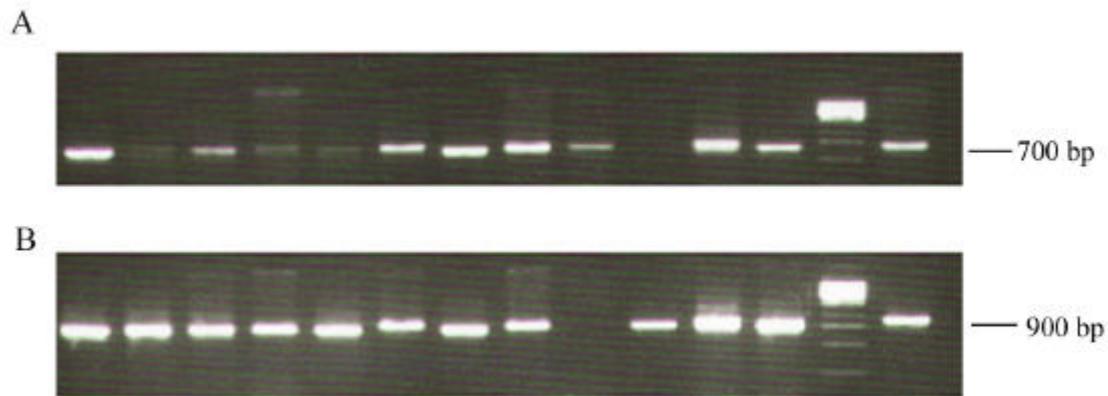


Abbildung 3.-17. PCR-Analyse verschiedener im Reversionsexperiment erhaltener Linien. Es wurde von allen stabilen Linien (295) DNA isoliert und diese per PCR analysiert. Bei vollständigem Ausbau des EP2294-Elementes sollte mit Primerkombination F2/B1 ein 737 bp großes Fragment amplifiziert werden (A), mit der Primerkombination F2/B2 ein 897 bp großes Fragment (B).

Von den 97 stabilen Linien, für die homozygote Nachkommen erhalten wurden, konnten 22 Linien isoliert werden, in denen gehäuft homozygote Tiere auftraten. Diese Linien konnten aber nicht als homozygot lebensfähig etabliert werden, da auch hier alle männlichen Nachkommen steril waren. Es musste nun überprüft werden, inwieweit das EP-Element vollständig bei diesen Linien ausgebaut wurde. Dafür wurde von homozygoten Tieren DNA isoliert und durch PCR mit dem Primerpaar F2 und B2 ein 897 bp Fragment amplifiziert. Das Fragment wurde in pGEM^T kloniert und mit dem Primer B1 sequenziert. Nach Auswertung der Sequenzierung konnte für die Linie HL8, 138 und II18 festgestellt werden, dass das EP-Element vollständig ausgebaut und somit die Wildtypsituation in dieser Region wieder hergestellt wurde (Tab. 3.-3.). Für 16 Linien konnte nach der Sequenzierung festgestellt werden, dass am EP-Insertionsort ein C→T Austausch statt gefunden hat. Für die Linien HL4, HL5 und HL6 wurde am vorherigen EP-Element-Insertionsort ein CT→TA Austausch nachgewiesen (Tab. 3.-3.). Alle Stämme unterschieden sich phänotypisch nicht voneinander. Für weitere 75 Linien, wurden zwar homozygote Nachkommen erhalten. Es traten aber auf 100 Tiere nur 1-3 homozygote Tiere auf, die männlich steril waren. Es wurde versucht von diesen homozygoten Tieren ein PCR-Fragment zur Klonierung in pGEM^T zu gewinnen, um es zu sequenzieren. Dies gelang aber nur für die Linien 35, II56 und II74. In diesen Linien konnte ein G-Einschub im EP-Element-Insertionsort gezeigt werden. Das EP-Element ist in keiner dieser drei Linien partiell vorhanden (Tab. 3.-3.).

Tabelle 3.-3. Sequenzen verschiedener Linien am EP-Element-Insertionsort nach Reversion des EP-Elementes und deren Phänotyp

Linie	DNA-Sequenz der Linie	Phänotyp homozygoter Tiere für die Reversion des EP-Elementes
	vollständige Reversion des EP-Elementes	
<i>CantonS</i>	TTTGGCTTTT AAGTCAGCAC TTTATAGGTA	Wildtyp
HL8	TTTGGCTTTT AAGTCAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
138	TTTGGCTTTT AAGTCAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
II18	TTTGGCTTTT AAGTCAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
	C-->T Austausch	
HL3	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
39	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
69	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
86	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
91	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
131	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
142	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
158	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
162	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
182	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
II1	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
II2	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
II10	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
II12	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
II14	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
II97	TTTGGCTTTT AAGTTAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
	CT-->TA Austausch	
HL4	TTTGGCTTTT AAGATAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
HL5	TTTGGCTTTT AAGATAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
HL6	TTTGGCTTTT AAGATAGCAC TTTATAGGTA	homozygot, männlich steril
	G-Einschub	
35	TTTGGCTTTT AAGTGCAGCAC TTTATAGGTA	Semiletal
II56	TTTGGCTTTT AAGTGCAGCAC TTTATAGGTA	Semiletal
II74	TTTGGCTTTT AAGTGCAGCAC TTTATAGGTA	Semiletal

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Semiletalität von der Insertion des EP-Elementes hervorgerufen wird. Durch die Wiederherstellung der Wildtypsituation in der genomischen Region des Cyclophilin B konnten wieder gehäuft homozygote Nachkommen erzeugt werden. Die Sterilität der homozygoten Männchen konnte jedoch durch die Reversion des EP-Elementes nicht gerettet werden. Wahrscheinlich wird sie von einer zweiten unabhängigen Mutation auf dem 2. Chromosom hervorgerufen.

3.8. Isolation und Nachweis einer Deletion für das Cyclophilin B aus *Drosophila melanogaster*

Da die Insertion des EP2294-Elementes zu keiner Nullmutation des Cyclophilin B-Gens führte, sollte durch Reversion dieses transponiblen Elementes eine Deletion erzeugt werden. Infolge des Doppelstrangbruches, der vor der Transposition des Elementes stattfindet (Gloor *et al.*, 1991), entsteht ein Gap. Normalerweise dient der Schwesterstrang als Template für die Reparatur des Gap (Engels *et al.*, 1990). Bei fehlerhafter Reparatur können durch inhomologe Paarung, Insertionen und Deletionen entstehen (Johnson-Schlitz und Engels 1993; Nassif *et al.* 1994). Es wurde das gleiche Experiment wie unter 3.7. beschrieben durchgeführt. Im Verlauf des Reversionsexperimentes konnte eine Linie isoliert werden, bei der mit der Primerkombination F2/B2 ein um etwa 250 bp verkürztes PCR-Fragment auftrat (Abb. 3.-18.).

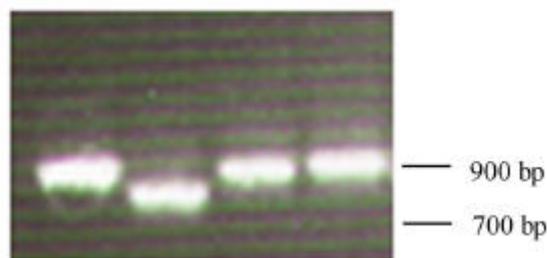


Abbildung 3.-18. Isolation eines um 250 bp verkürzten PCR-Fragmentes mit der Primerkombination F2/B2. Dieses Fragment wurde mit dem Primer B1 sequenziert und als CypB-Defizienz von 287 bp identifiziert.

Dieses Fragment wurde in den Vektor pGEMT kloniert und mit dem Primer B1 sequenziert. Danach konnte eine Deletion festgestellt werden, die sich ausgehend von der vorherigen EP-Element-Insertionsstelle vom ersten Exon, über das erste Intron bis zum zweiten Exon erstreckt (Abb. 3.-19.). Neben der Deletion ist das EP-Element in der Insertionsstelle mit 81 bp partiell vorhanden (Anhang Abb. 7.-2.). Die Deletion des Cyclophilin B-Gens führt zur rezessiven Lethalität.

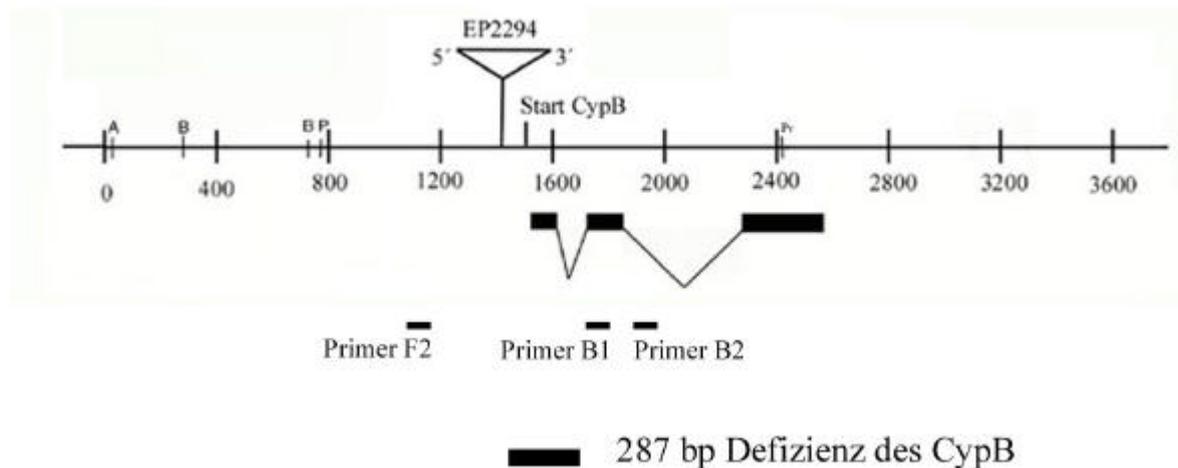


Abbildung 3.-19. Genomische Region mit ausgewählten Restriktionsstellen und den Bindungsstellen der Cyclophilin internen Primer zur Charakterisierung, der im Reversionsexperiment erhaltenen Linien. Weiterhin ist die 287 bp-Defizienz des Cyclophilin-Gens dargestellt, die sich ausgehend von der vorherigen EP-Element-Insertionsstelle über das erste Exon und erste Intron erstreckt. .

Die Linie, die diese Deletion trägt wird im weiteren als Defizienz Df(2R58F) CypB bezeichnet. Da die Defizienz zu rezessiver Lethalität führt, treten nur für die Deletion heterozygote Tiere in der Nachkommenschaft auf. Um trotzdem eine Nullmutation nachweisen zu können, wurde ein GFP markierter Balancer für das 2. Chromosom verwendet (Rudolph *et al.*, 1999). Damit ist eine Unterscheidung der Allele möglich: heterozygote Allele für die Deletion (+/-) führen zur Grünfluoreszenz der Tiere, homozygote Allele für die Deletion (-/-) führen zu keiner Fluoreszenz. Damit ist auch eine Aussage möglich, bis zu welchem Entwicklungsstadium die Individuen überleben, die für die Defizienz des *CypB* Gens homozygot sind. Homozygote Tiere konnten über alle larvale Stadien bis in das Stadium der Puppe nachgewiesen werden, was für eine sehr starke maternale Komponente spricht.

Für den Nachweis der Nullmutation wurden für die Deletion homozygote und heterozygote 2. und 3. Larven gesammelt und in einem Westernblot mit polyklonalen CypB-Antikörper analysiert. Es konnte für die Defizienz Df(2R58F) CypB der völlige Ausfall des Cyclophilin B-Genproduktes nachgewiesen werden (Abb. 3.-20.).

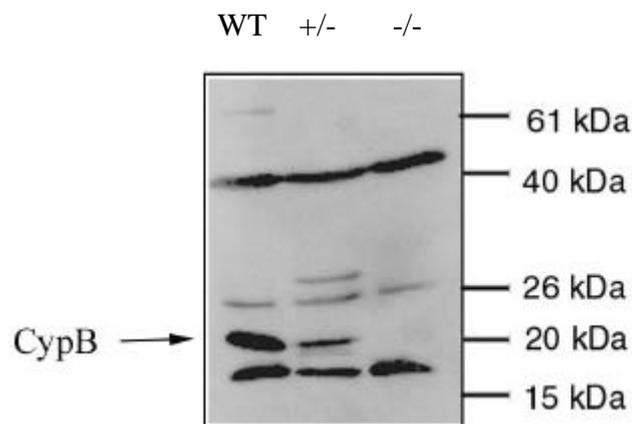


Abbildung 3.-20. Immunoblot mit CypB Antikörper (1:2000), Bahn 1) Wildtyp *CantonS*; Bahn 2) heterozygote (+/-) Tiere für CypB; Bahn 3) homozygote (-/-) Tiere für die CypB.

3.9. Reinigung des polyklonalen CypB Antikörpers über die Mutante mit CypB-Defizienz

Da der polyklonale CypB-Antikörper nicht nur spezifisch Cyclophilin B erkennt, wurde versucht, diesen über die Mutante mit der Defizienz Df(2R58F) CypB zu reinigen. Für die Aufreinigung des Antikörpers wurden homozygote Larven für die CypB-Deletion gesammelt und homogenisiert. Anschließend wurde der Antikörper in einer 1:200 Verdünnung für 24 Stunden auf diesem Homogenat inkubiert. Um eine noch größere Reinigungseffizienz zu erzielen, wurde ein Teil des Überstandes auf frisches Mutanten-Homogenat überführt und für weitere 24 Stunden darauf inkubiert. Für Western-Analysen wurden die Homogenate zentrifugiert und in einer 1:5 Verdünnung (Endkonzentration des Antikörpers 1:1000) verwendet. Da den homozygoten Tieren für Df(2R58F) CypB das Cyclophilin-Genprodukt fehlt, sollte eine Wechselwirkung mit dem Antikörper ausbleiben, und dieser im Überstand verbleiben, während die anderen Cyclophiline im Homogenat binden.

Für die Analyse wurde Wildtyp-Homogenat, der aus Larven des 3. Entwicklungsstadiums gewonnen wurde, auf drei unterschiedlichen Bahnen in der gleichen Konzentration aufgetragen, in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf einer Nylonmembran fixiert. Die auf der Nylonmembran immobilisierten Proteine wurden mit den unterschiedlich aufgereinigten Antikörpern untersucht. Wie in Abbildung 3.-21. zu sehen gelingt mit dieser Methode eine vollständige Aufreinigung. Allerdings reicht eine einmalige Inkubation nicht aus. Nach einer einmaligen Inkubation auf Mutanten-Homogenat, kann die 40 kDa-Bande eliminiert werden, nicht aber die 18 kDa Bande. Erst nach wiederholter Inkubation, bei der der präinkubierte Antikörper auf frisches Mutanten-Homogenat überführt wurde gelang die vollständige Aufreinigung (Abb. 3.-21.).

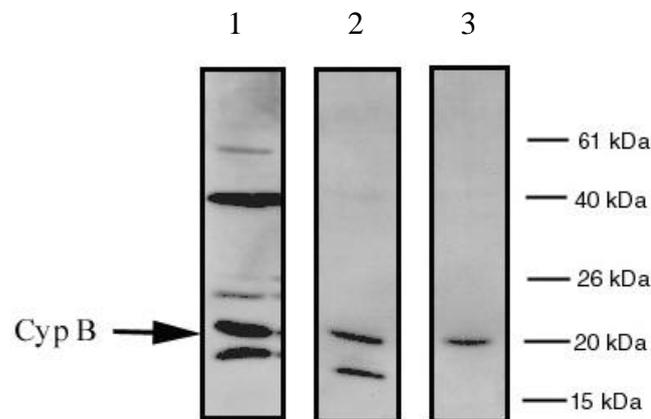


Abbildung 3.-21. Immunoblot mit verschiedenen aufgereinigten polyklonalen CypB-Antikörper (1:1000), Bahn 1-3 Adulte Wildtyp *CantonS*, Bahn 1) CypB-Antikörper ungereinigt; Bahn 2) CypB-Antikörper nach einmaliger Präinkubation auf Df(2R58F) für 24 Stunden; Bahn 3) CypB-Antikörper nach zweimaliger Präinkubation Df(2R58F) Cyp B über 48 Stunden, wobei zweimal frisches Mutanten-Homogenat verwendet wurde.

3.10. Immunozytologische Charakterisierung des CYPB-Proteins

Immunozytologische Techniken erlauben eine Analyse der zeitlichen und räumlichen Lokalisation von Proteinen. Mit Hilfe dieser Technik sollte untersucht werden, ob das CYPB-Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung Chromatin assoziiert ist und wie sich das Protein während der Embryonalentwicklung verhält. Bei allen angewandten Techniken wurde das entsprechende Präimmenserum getestet. Es zeigte keine Reaktion. Für die Färbungen wurde der über die Defizienz gereinigte CypB-Antikörper verwendet.

Das CYPB-Protein konnte im präblastodermalen Embryonen sehr stark nachgewiesen werden (Abb. 3.-22. A-C), was für eine starke maternale Komponente des Proteins spricht. Eine Kernlokalisierung konnte zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung gezeigt werden. In Abb. 3.-22. D-I sind optische Schnitte durch einen Embryo während der Interphase des Kernteilungszyklus 13 zu sehen. Die Abb. 3.-22. D-F zeigen einen optischen Schnitt durch die Mitte des Embryos, die Abb. 3.-22. G-I einen optischen Schnitt an der Oberfläche des Embryos. Während die Peripherie außerhalb der Kerne deutlich markiert ist (Abb. 3.-22. D und F), konnte in der Nähe der polyploiden Dotterkerne kein CYPB nachgewiesen werden.

Eine Vergrößerung der Kerne an der Peripherie ist in Abb. 3.-23. zu sehen. Das Cyclophilin B konnte in den Polzellen, welche die spätere Keimbahnzellen bilden, nachgewiesen werden. In späteren Stadien konnte für das Cyclophilin keine organspezifische Verteilung beobachtet werden. Es ist ubiquitär im Embryo verteilt (Abb. 3.-24 A-I).

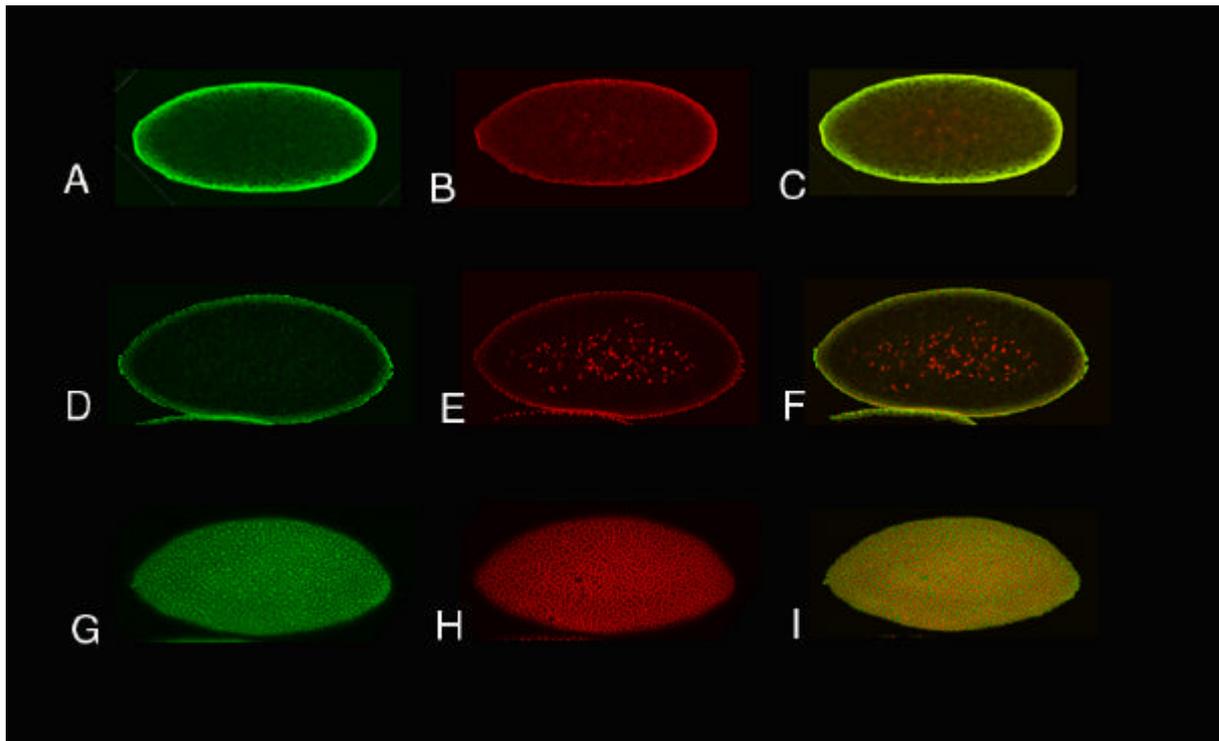


Abbildung 3-22. Immunmarkierung von Wildtypembryonen (CantonS) mit dem Antikörper Cyp B (1:1000) A-C) präblastodermaler Embryo in der Interphase Kernteilungszyklus 5; D-I) Embryo während des syncytialen Blastoderms Interphase Kernteilungszyklus 13; D-F) optischer Schnitt durch die Mitte des Embryos, G-I) optischer Schnitt an der Oberfläche des Embryos; A,D,G) Anti-Cyp B; B,E,H) DNA-Färbung mit Propidiumjodid; C,F,I) Überlagerung von DNA- und Antikörperfärbung

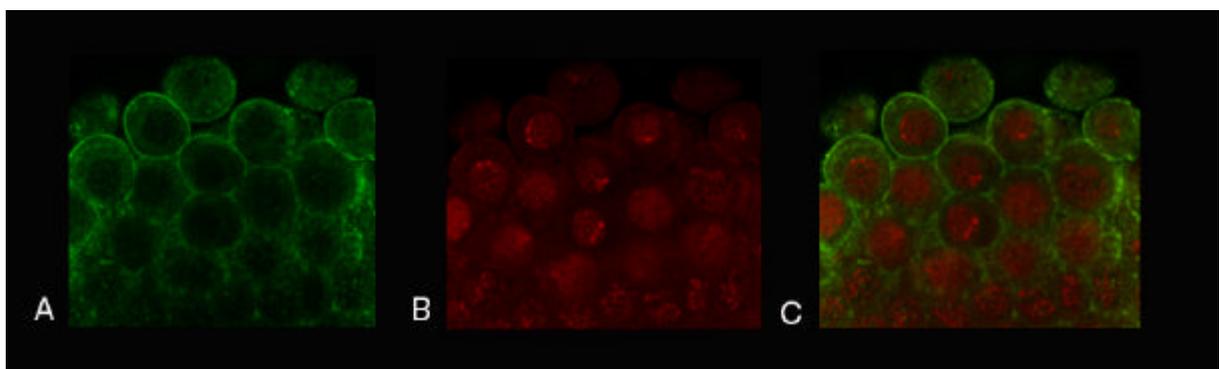


Abbildung 3-23. Immunmarkierung von Polzellen des Wildtyps *CantonS* mit Anti-Cyp B A) Anti-Cyp B (1:500); B) DNA-Färbung mit Propidiumjodid; C) Überlagerung von DNA- und Antikörperfärbung

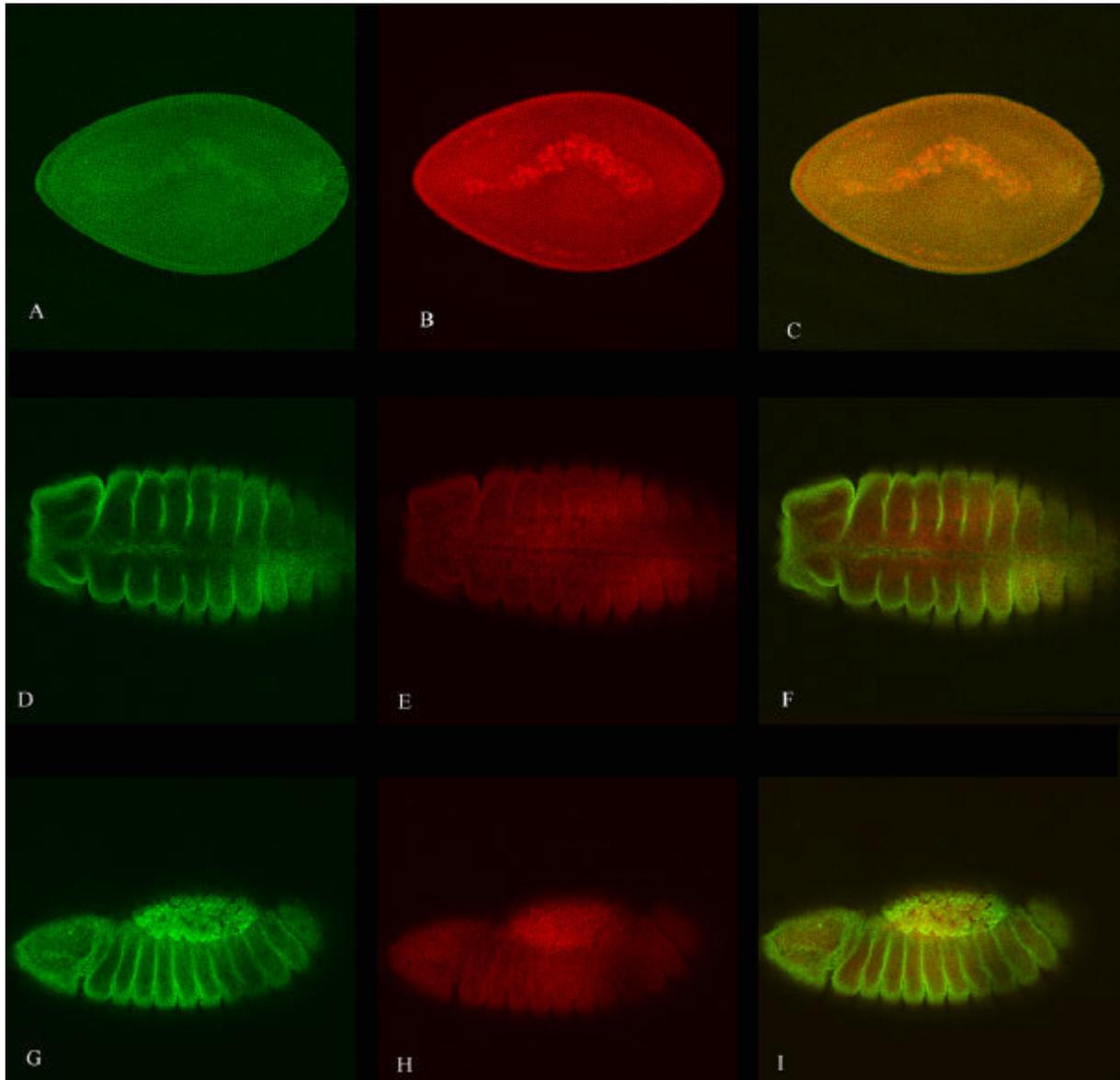


Abbildung 3.-24. Immunmarkierung von Wildtypembryonen (CantonS) mit dem Antikörper Cyp B (1:1000)
A-C) Embryo im Entwicklungsstadium 4 (1-2 Stunden alt); D-I) Embryo im Entwicklungsstadium 12 (7-9
Stunden alt); D-F) Embryo im Entwicklungsstadium 13 (9-10 Stunden alt); A,D,G) Anti-Cyp B; B,E,H) DNA-
Färbung mit Propidiumjodid; C,F,I) Überlagerung von DNA- und Antikörperfärbung

Zum Nachweis einer maternalen Proteinkomponente wurden Ovarien des Wildtyp *Canton S* mit dem CypB-Antikörper immunmarkiert. Das Protein konnte in den Follikelzellen und in den Nährzellen der Eizelle nachgewiesen werden (Abb. 3.-25.). Eine Vergrößerung der Follikelzellen ist in Abb. 3.-26. zu sehen

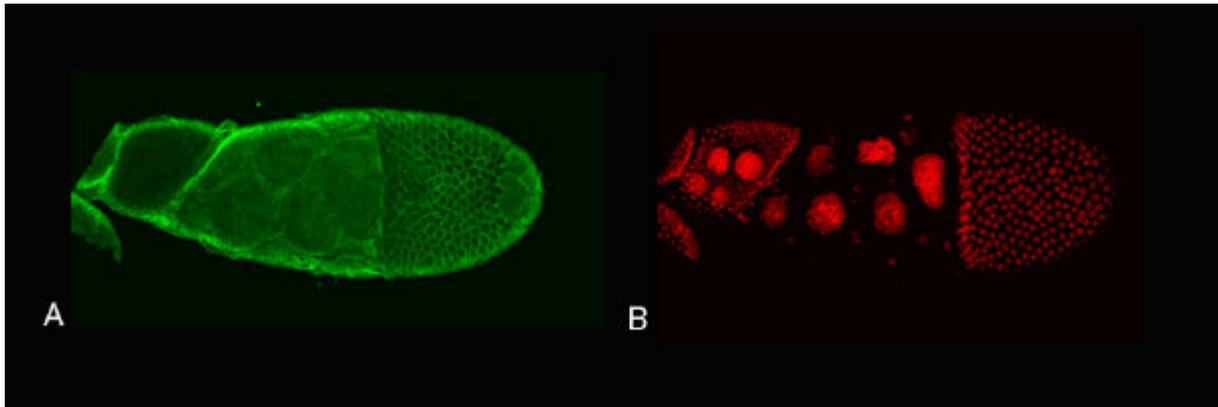


Abbildung 3.-25. Immunmarkierung eines Ovarium des Stadium 9 (Wildtyp *CantonS*). A und B) Schnitt an der Oberfläche der Oocyte; A) Antikörperfärbung Anti-CypB (1:500); B) DNA-Färbung mit Propidiumjodid

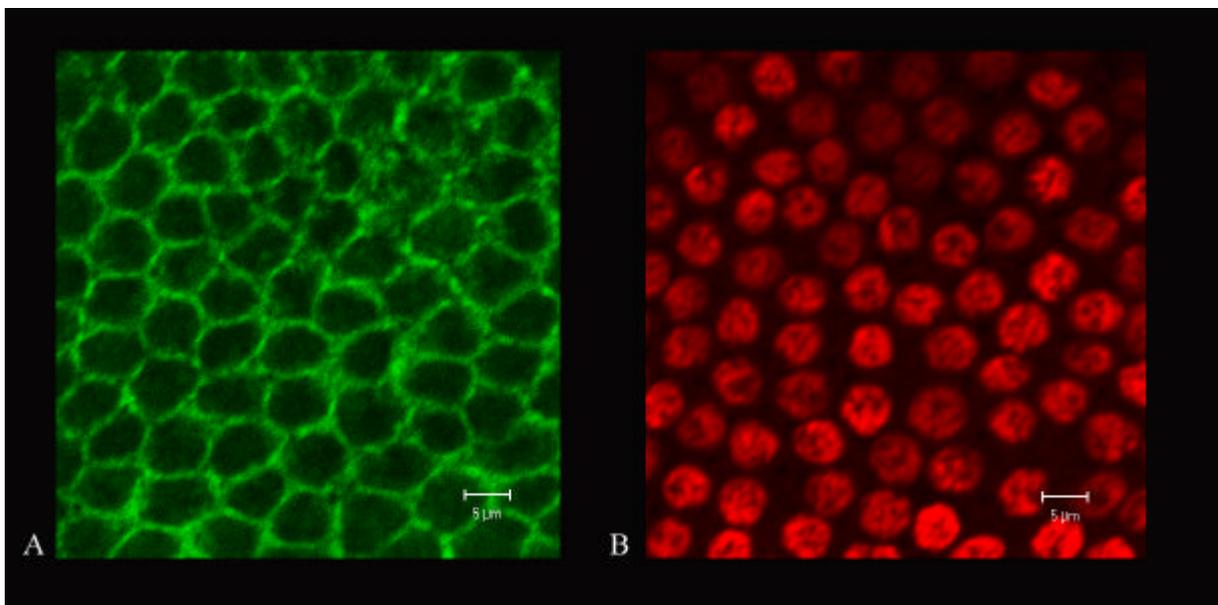


Abbildung 3.-26. Immunmarkierung eines Ovarium des Stadium 9 (Wildtyp *CantonS*) (Vergrößerung der Follikelzellen aus Abbildung 3.-25.). A und B) Schnitt an der Oberfläche der Oocyte; A) Antikörperfärbung Anti-CypB (1:500); B) DNA-Färbung mit Propidiumjodid

3.11. Nachweis der maternalen Komponente durch Northernblot- und Westernblot-Analyse, sowie durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Das Überleben der homozygoten Tiere für die Defizienz Df(2R58F) CypB über alle larvalen Stadien bis in das Stadium der Puppe, sowie der Nachweis des CYPB-Proteins in den Ovarien adulter Weibchen und frühen Embryonen, spricht für eine starke maternale Kontrolle des Genproduktes.

Zur Charakterisierung der zeitabhängigen CypB-Gen-Expression wurden Northernblot-Analysen durchgeführt. Als Sonde diente ein EcoRI/Xho-Fragment aus dem cDNA-Klon 2. Das CypB-Transkript konnte sehr stark in 0-6 Stunden alten Embryonen nachgewiesen werden (Abb. 3.-27. A).

Für die zeitabhängige CYPB-Proteinexpression wurden Embryonen der Zeitintervalle 0-6 h, 6-12 h und 12-24 h untersucht. Die Embryonen wurden homogenisiert. Die Cyclophiline, die sich im Homogenat befanden, wurden mit Hilfe der Cyclosporin A-Affinitätssäule aufkonzentriert und somit von anderen Proteinen gereinigt. Die Auftrennung der Eluate erfolgte mittels SDS-PAGE. In Abb. 3.-27. B ist das Gel mit Banden von einem Molekulargewicht von 18 kDa und 20 kDa zu sehen. Auch hier variiert die Stärke der Banden in Abhängigkeit vom Alter der Embryonen. Die Cyclophilin B-Konzentration nimmt mit zunehmenden Alter der Embryonen ab, während das Cyclophilin 18 konstitutiv exprimiert wird. In einer Westernblot-Analyse wurde dieses Ergebnis bestätigt (Abb. 3.-27. D).

Zur Präzisierung und Verifizierung der in der SDS-PAGE ermittelten Molekulargewichte wurden Messungen der MALDI-TOF-Massenspektrometrie herangezogen. Die Masse des 18 kDa-Protein entspricht dem Cyclophilin A aus *Drosophila melanogaster* und beträgt 17.806 Da. Die Masse des 21 kDa-Proteins entspricht dem Cyclophilin B aus *Drosophila melanogaster* und beträgt 20.259 Da. Da mit der MALDI-TOF keine Quantifizierung der Substanzmengen möglich ist, wurden die Spektren auf eine einheitliche Größe des Cyclophilin A-Peaks normiert. Damit war eine Aussage über die Veränderung des Verhältnisses CypA/CypB möglich. Auch hier nimmt der Cyclophilin B-Gehalt in den Embryonen mit zunehmenden Alter immer weiter ab, um im Stadium 12-24 h schließlich unter die Detektionsgrenze der Massenspektrometrie zu fallen. Der höchste Gehalt an Cyclophilin B konnte in 0-3 h alten Embryonen detektiert werden (Abb. 3.-27. C).

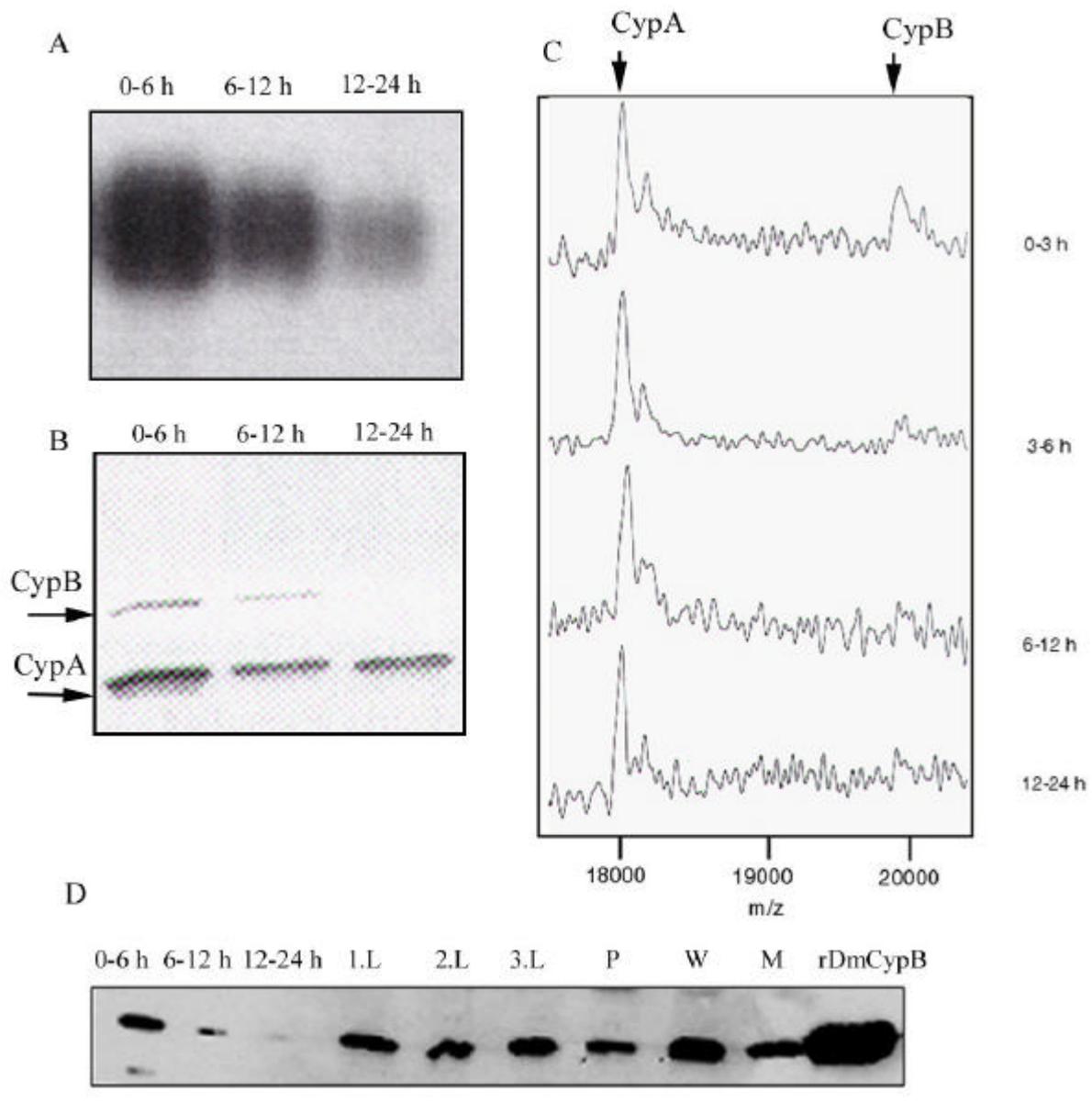


Abbildung 3.-27. Nachweis der maternalen Komponente mittels A) Northernblot-Analyse; B) SDS-PAGE; C) MALDI-TOF-Massenspektroskopie und D) Westernblot-Analyse.

A) Northernblot an Gesamt-RNA verschiedener Embryonalstadien mit cDNA-CypB-Sonde aus dem cDNA-Klon 2: Bahn 1) 0-6 h alte Embryonen; Bahn 2) 6-12h alte Embryonen; Bahn 3) 12-24 h alte Embryonen.

B) Auftrennung der CsA-Eluate im SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung: Bahn 1) Embryonalstadium 0-6 h; Bahn 2) Embryonalstadium 6-12 h; Bahn 3) Embryonalstadium 12-24 h.

C) MALDI-Spektren von Cyclosporin A-Eluaten der AMC-CsA-Säule. Es wurden Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien verwendet.

D) Westernblot an Wildtyp *CantonS* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit polyklonalen CypB-Antikörper; Bahn 1) Embryonalstadium 0-6 h; Bahn 2) Embryonalstadium 6-12h; Bahn 3) Embryonalstadium 12-24h; Bahn 4) 1. Larve; Bahn 5) 2. Larve; Bahn 6) 3. Larve; Bahn 7) Puppe; Bahn 8) adulte Weibchen; Bahn 9) adulte Männchen; Bahn 10) rekombinantes CypB.

3.12. Herstellung von Konstrukten zur Rettung des Mutantenphänotyps

Für die Rettung des lethalen Phänotyps der Nullmutante, wurden verschiedene genomische Konstrukte angefertigt, um die entwicklungspezifische Genexpression sicherzustellen. Es wurde eine rekombinante Phagenbibliothek mit genomischen Inserts vom Typ λ -FIX II (Stratagene) gesichtet. Als Sonde diente die 0,8 kb große cDNA des Klons 2. Im Verlauf der Sichtung wurden 300.000 Plaques getestet. Es konnten fünf unabhängige Phagen isoliert werden. Phage 1 wurde in den Vektor pP{GS[v⁺]} (Schotta und Reuter, 2000), Phage 2 in pBlue Script-KS subkloniert. Die Sequenzierung der Phagen erfolgte mit Primern, die aus der cDNA abgeleitet wurden sowie den Sequenzierprimern pT3 und pT7. Beide Phagen überlappen mit der genomischen Sequenz der Region 2R 58F (Abb. 3.-28.). Ausgehend von beiden Subklonen wurde mittels PCR ein 2 kb großes Fragment amplifiziert und in den Vektor pP{GS[v⁺, EGFP]} kloniert. Auf diese Weise sollte ein GFP markiertes CYPB-Protein erhalten werden (Abb. 3.-29.). Nach P-Element vermittelter Transformation in *Drosophila melanogaster* konnte für dieses Konstrukt bisher nur eine Linie aufgebaut werden. Das Transgen inserierte auf dem 4. Chromosom. Es konnte durch PCR in dieser transgenen Linie nachgewiesen werden. Durch Westernblot-Analyse konnte die Expression des CypB-EGFP Proteins in dieser Linie nicht gezeigt werden, so dass ein Versuch zur Mutantenrettung nicht möglich war. Deshalb wurde ausgehend von den genomischen Phagen ein weiteres Konstrukt angefertigt. Durch Restriktion der Phagen mit *Xba*I konnte ein 5,5 kb großes Fragment isoliert werden. Dieses wurde in den P-Vektor pGS{v+} kloniert und für eine P-Element vermittelte Transformation in der Keimbahn von *Drosophila melanogaster* vorbereitet (Abb. 3.-29.).

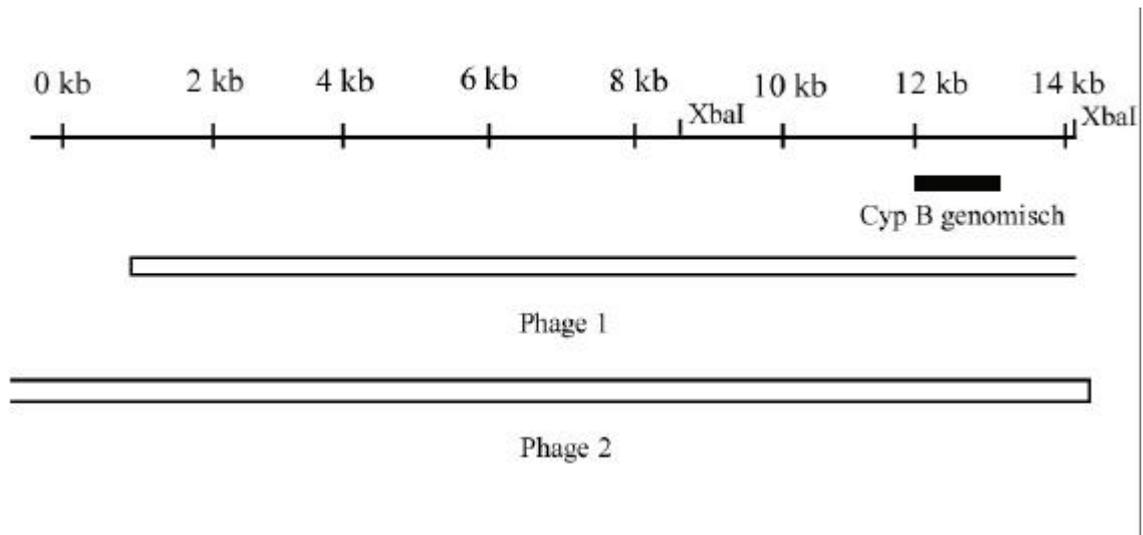


Abbildung 3.-28. 2R 58F-Region mit gesichteten rekombinanten Phagenklonen und ausgewählten *XbaI* Restriktionsstellen

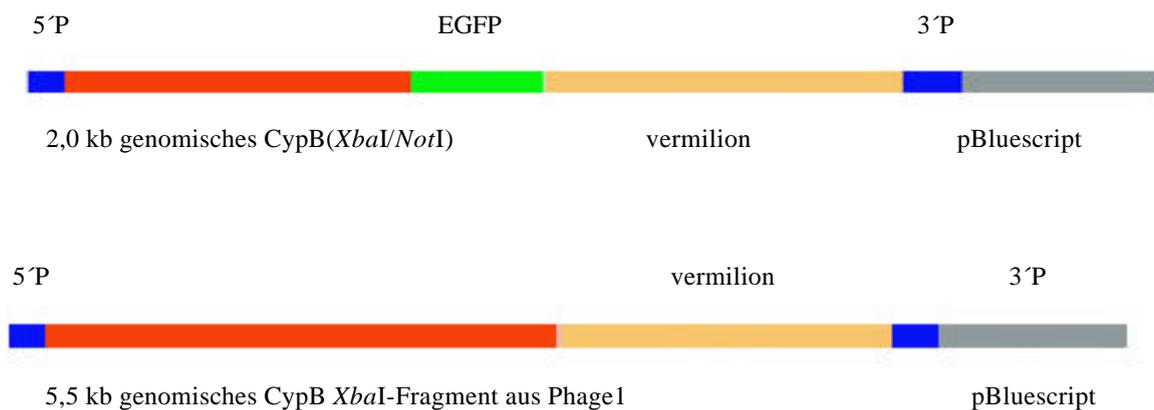


Abbildung 3.-29. Struktur der verschiedenen Konstrukte zur Rettung des Mutanten-Phänotyps der CypB-Defizienz Df(2R58F) CypB. A) pP{GS[v⁺, (2 kb genomisches *NotI/XbaI* Fragment) EGFP]}. B) pP{GS[v⁺, (5,5 kb genomisches *XbaI* Fragment)]}

3.13. Untersuchungen von Protein-Protein Interaktionen mit Hilfe eines rekombinanten CypB/EGFP-Fusionsproteins und nativer Gelelektrophorese

Für den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen werden Bindungs-Assays, wie beispielsweise das Hefe-Dihybridsystem eingesetzt (Brent und Ptashne, 1985; Fields und Song, Durfee *et al.*, 1993). Prinzipiell bestehen diese Systeme aus drei Komponenten. Eine Komponente ist das „bait“-Plasmid, welches die DNA-Bindungsdomäne und ein bekanntes Protein enthält („bait“-Protein). Die zweite Komponente sind Markergene zum Nachweis der Wechselwirkung. Die dritte Komponente bilden die von einer cDNA-Expressionsbibliothek kodierte Proteine („target“-Proteine). Aufgrund der limitierenden Möglichkeiten spezifische Liganden zu verwenden, die eine Überprüfung der biologischen Signifikanz ermöglicht, können in einigen Fällen mit dieser Methode falsch-positive Interaktionen nachgewiesen werden. Ein idealer Ligand sollte folgenden Eigenschaften besitzen: er sollte einfach, sensitiv und direkt detektierbar sein, sollte korrekt gefaltet sein und seine natürliche Aktivität besitzen, um mit einem weiteren putativen Liganden zu interagieren.

Für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde deshalb das Cyclophilin B Homologe aus *D. melanogaster* mit EGFP fusioniert, in *E. coli* überexprimiert und gereinigt (siehe Material und Methoden 2.5.). Abbildung 3.-30. zeigt die Expression des rekombinanten DmCypB-EGFP mit (1) und ohne (2) IPTG-Induktion. Mittels SDS-Page konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein mit der erwarteten Molekularen Masse von 46 kDa migriert.

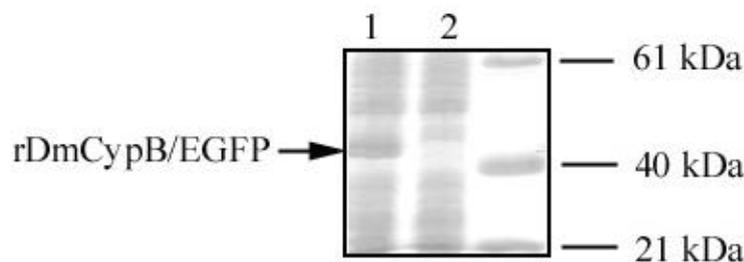


Abbildung 3.-30. Expression von rDmCypB-EGFP in *E. coli*. SDS-Polyacrylamidgel (15%, Coomassie-Färbung) von induzierten (1) und nicht induzierten (2) *E. coli*-Extrakten. Das rekombinante Fusionsprotein migriert mit der erwarteten Molekularen Masse von 46 kDa.

Abbildung 3.-31. Bahn 1 zeigt das Fusionsprotein nach Auftrennung im nativen TBE Polyacrylamidgel (6%, Novex, San Diego). Die Fluoreszenz-Detektion erfolgte mit CCD-Kamera und UV-Transilluminator. Dieser Fluoreszenz-Test gibt weiterhin Informationen über die strukturelle Integrität des Fusionspartners innerhalb des Fusionsproteins. EGFP fluoresziert nur im nativen Zustand. Aufgrund der C-terminalen Fusion und dem Wissen, dass der Faltungsprozess vom N- zum C-Terminus erfolgt, kann von einer korrekten Faltung, die das rDmCypB und den EGFP-Fusionsanteil beinhaltet, ausgegangen werden (Waldo *et al.*, 1999). Da eine korrekte Faltung des Fusionsproteins keine Rückschlüsse auf die enzymatische Aktivität zulässt, wurde die *cis/trans* Isomerisierung mit dem Standardsubstrat Ac-Ala-Ala-Pro-Phe-4-Difluoroanilid im Protease-freien Assay bestimmt. Der k_{cat}/K_M -Wert von $2.0 \pm 0,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ist vergleichbar mit Daten anderer PPIasen (Fischer, 1994).

Nach Etablierung des Fluoreszenz-markierten Cyclophilins wurde eine elektrophoretische Methode genutzt, um die Interaktion von Bindungspartnern sichtbar zu machen. Die Methode der band-shift Analyse ermöglicht die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Protein-Ligand Komplexe migrieren in nativen Polyacrylamidgelen anders als ihre individuellen Komponenten, aufgrund der dreidimensionalen Struktur des Komplexes (Cann, 1996).

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cyclophiline an das Kapsid-Protein p24 von HIV-1 (Franke *et al.*, 1994) binden. Bei Präinkubation von rekombinanten DmCypB-EGFP mit p24 konnte mit Erhöhung der p24 Konzentration ein deutlicher band-shift beobachtet werden (Kiessig *et al.*, 2001), der auf eine Komplexbildung zurückzuführen ist. Die beobachtete Interaktion ist spezifisch für rDmCypB-EGFP und p24, da Kontrollexperimente mit Rinder-Serumalbumin unter gleichen Bedingungen keinen Einfluß auf die Migration von rDmCypB-EGFP hatte (Kiessig *et al.*, 2001).

In dem folgenden Experiment wurden cytosolische Extrakte aus *D. melanogaster* Embryonen (0-24h) mit rDmCypB-EGFP inkubiert und durch native Gelelektrophorese analysiert. Die Bahn 1 und 2 in Abbildung 3.-31. zeigen einen band-shift für rDmCypB-EGFP, der für p24 ähnlich ist (Kiessig *et al.*, 2001). Dieser Migrations-shift könnte für die Interaktion des CypB mit einem putativen endogenen Liganden sprechen. Deshalb wurden die folgenden Kontrollexperimente durchgeführt. Um zu prüfen, ob die Interaktion für CypB spezifisch ist, wurde nur EGFP mit *D. melanogaster* Extrakten inkubiert (Abb. 3.-31. Bahn 5 und 6). Wie erwartet konnte kein band-shift beobachtet werden.

Weiterhin wurde das Fusionsprotein mit cytosolischen Extrakten anderer Spezies inkubiert, um die Spezifität der Interaktion nachzuweisen. Wie in Abb. 3.-31. Bahn 7-10 zu sehen, konnte für die Protein-Lösungen (BSA, Hefe, T-Zellen und *E. coli*) keine Verschiebung des rDmCypB-EGFP-Signals beobachtet werden. Die Inhibierung der rDmCypB-Interaktion mit dem putativen Liganden aus *D. melanogaster* wurde durch Zugabe von CsA untersucht. Bahn 3 und 4 in Abb. 3.-31. demonstriert, dass eine partielle Inhibierung der Interaktion nur möglich ist, wenn rDmCypB-EGFP mit CsA vorbehandelt wurde. Die Behandlung des rDmCypB-EGFP-Ligand-Komplexes mit CsA führt zu keinem weiteren band-shift.

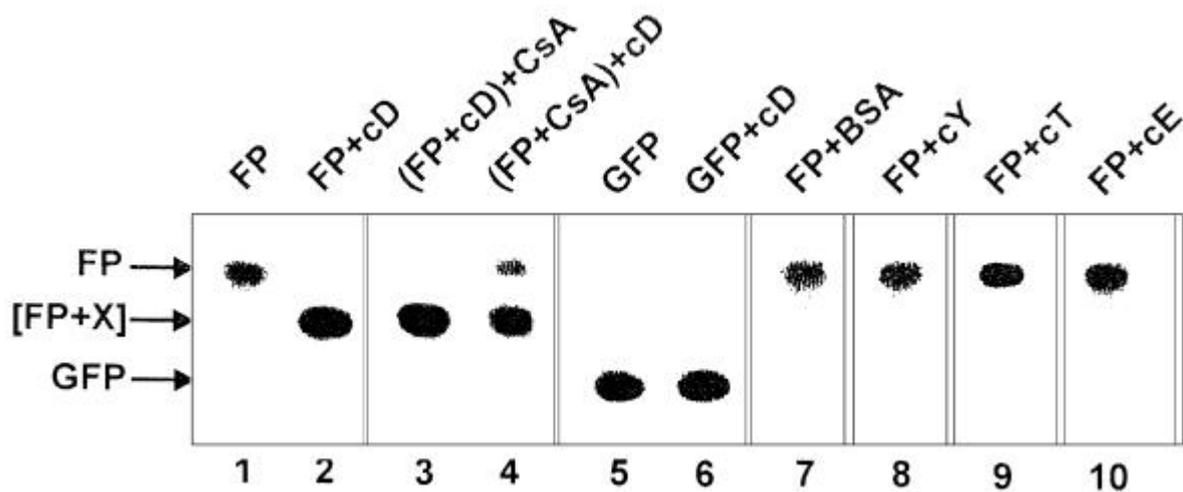


Abbildung 3.-31. Nachweis einer Interaktion von rDmCypB mit Komponenten aus *D. melanogaster* mittels band-shift-Analyse. Proben von rDmCypB-EGFP (FP, 6 µM, Bahn1) wurden mit Gesamtextrakt aus *Drosophila melanogaster* Embryonen inkubiert (FP+cD, Bahn 2). Für Verdrängungsexperimente wurde das Fusionsprotein zuerst mit cytosolischen Extrakten aus Embryonen inkubiert und dann erst mit CsA (3 µM, FP+cD+CsA, Bahn 3) und umgekehrt (FP+CsA+cD, Bahn 4). Zur Kontrolle wurde einfaches EGFP (6 µM, GFP, Bahn 5) und EGFP nach Inkubation mit cytosolischen Extrakten (GFP+cD, Bahn 6) aufgetragen. Weiterhin wurde das Fusionsprotein (6 µM) mit BSA (75 µM, FP+BSA, Bahn 7) cytosolischen Extrakten aus Hefe (FP+cY, Bahn 8), cytosolischen Extrakten aus T-Zellen (FP+cT, Bahn 9) und cytosolischen Extrakten aus *E. coli* (FP+cE) inkubiert. Alle Banden wurden durch Fluoreszenz-Imaging sichtbar gemacht.

Diese Ergebnisse sprechen für eine Wechselwirkung des rDmCypB-EGFP mit einem endogenen Liganden aus *D. melanogaster*. Da eine partielle Inhibierung der Interaktion nur möglich ist, wenn rDmCypB-EGFP mit CsA vorbehandelt wurde, könnte dies für eine hohe Affinität des putativen Liganden zu CypB sprechen. Der Ligand kann nicht durch CsA ersetzt werden, wenn der Komplex schon gebildet wurde.

4. Diskussion

Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen sind eine Klasse von Enzymen, welche die *cis/trans* Isomerisierung von Xaa-Pro-Bindungen katalysieren. Diese Isomerisierung stellt einen langsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Rückfaltung von Proteinen dar. PPIasen sind ubiquitär verbreitet. Sie werden in drei Familien unterteilt. Die starke phylogenetische Konservierung und hohe intrazelluläre Konzentration der PPIasen deuten auf eine Beteiligung an wesentlichen zellulären Prozessen hin. Obwohl eine Vielzahl an genetischen Daten vorliegen, ist die physiologische Rolle der PPIasen relativ wenig verstanden (Galat und Metcalfe, 1995; Pliyev und Gurvits, 1999; Schiene und Fischer 2000). Durch die Identifikation eines neuen Cyclophilins aus *Drosophila melanogaster* als putativen Interaktionspartner für das Heterochromatin-assoziierten SU(VAR)3-9 Protein war die Möglichkeit gegeben, neue Erkenntnisse über die *in vivo* Funktion von PPIasen, insbesondere dieses Cyclophilins zu gewinnen.

Mit der Konstruktion einer Null-Mutante für das Cyclophilin-Homologe aus *D. melanogaster* konnte erstmals eine essentielle Funktion für Cyclophiline *in vivo* gezeigt werden.

4.1. Charakterisierung der cDNA eines Cyclophilin B-homologen Gens aus *Drosophila melanogaster*

Für die Charakterisierung eines im Hefedihybrid-System identifizierten Cyclophilins wurde dessen vollständige cDNA aus einer embryonalen cDNA-Bibliothek isoliert. Alle bei dieser Sichtung erhaltenen Klone unterschieden sich nicht im 5'-Bereich und kodierten für ein 21 kDa großes Protein. Bei einem Datenbankvergleich der abgeleiteten Proteinsequenz konnte eine hochkonservierte Cyclophilin Domäne identifiziert werden. Das abgeleitete Protein besitzt 69% Identität zum humanen Cyclophilin B (NCBI Blast). Die Cyclophilin A-Subfamilie unterscheidet sich von der Cyclophilin B-Subfamilie durch das Fehlen einer N-terminalen Signalsequenz. Weiterhin enthalten Cyclophiline, die der CypB-Subfamilie zugeordnet werden eine variable C-terminale Domäne (Price *et al.*, 1991). Aufgrund des N-Terminus, der eine ER-gerichtete Signalsequenz enthält und der variablen C-terminalen Domäne, kann das, aus der cDNA abgeleitete, Protein der Cyclophilin B-Subfamilie zugeordnet werden.

4.2. Der CypB-Locus kodiert für ein cytoplasmatisch lokalisiertes Protein

Cyclophiline wurden sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten gefunden. Durch immunocytologische Techniken konnten sie in der Kernmembran, dem Cytoplasma, in cytoplasmatischen Vesikeln und im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (McDonald *et al.*, 1992, Azhderian *et al.*, 1993). Das hoch abundante, cytosolische Cyclophilin A war das erste Cyclophilin, welches aufgrund seiner hochaffinen Bindung an das Undekapeptid Cyclosporin A isoliert wurde (Handschuhmacher *et al.*, 1984; Harding *et al.*, 1986).

Die putative Interaktion des neu identifizierten Cyclophilin Homologen aus *Drosophila melanogaster* mit dem Heterochromatin assoziierten SU(VAR)3-9 Protein ließ eine mögliche Kernlokalisierung vermuten. Zur Isolation von Cyclophilinen aus *Drosophila melanogaster* Homogenaten wurde an AffiGel 10 immobilisiertes [Amino-(tetramethylencarboxamidomethyl)-D-Ser]⁸-Cyclosporin A verwendet. Aus Gesamtembryonen-Extrakt konnten mit dieser Methode drei CsA Bindungspartner unterschiedlichen Molekulargewichts identifiziert werden. Es handelt sich dabei um Proteine mit Molekulargewichten von 40 kDa, 21 kDa und 18 kDa. Um die putative Kernlokalisierung nachzuweisen, wurde Gesamtextrakt aus 0-24 Stunden alten Embryonen mit einem aus 0-24 Stunden alten Embryonen gewonnenen Kernextrakt verglichen. Im Gegensatz zu den anderen CsA Bindungspartnern war das Cyclophilin B in der Kernfraktion angereichert. Der über die Kernfraktion und die CsA-Säule angereicherte CsA-Bindungspartner wurde N-terminal sequenziert. Die erhaltene Sequenz

Asp Asp Lys Gly Pro Lys Val Thr Glu Lys Val Phe Phe Asp Ile Thr Ile Gly Gly Glu Pro

stimmt mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klones 2 ab Position 20 überein. Mit MALDI-TOF-Massenspektroskopie wurde ein Molekulargewicht von 20,3 kDa bestimmt. Der Wert der Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_m für die Beschleunigung der *cis* nach *trans* Isomerisierung der Xaa-Pro-Bindung im Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid beträgt $1,24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und ist vergleichbar mit Werten, die für andere Cyclophiline beschrieben wurden (Fischer, 1994). Es gelang hiermit die Isolation einer neuen PPIase mit nachgewiesener Enzym-Aktivität aus *Drosophila melanogaster*.

Bei Vergleich der Aminosäuresequenzen von Cyclophilin B Homologen aus Mensch, Maus, und der Fruchtfliege (NCBI Blast Search) fällt der veränderte C-Terminus in dem *Drosophila melanogaster* Homologen auf. Die Aminosäuresequenz –VEKPFAlAKE-COOH, die eine Sekretion vom Endoplasmatischen Retikulum verhindert, fehlt und ist durch -VSEAFSVAKADATD-COOH ersetzt. Es wird angenommen, dass die variablen N- und C-terminalen Regionen die Kompartimentierung der Cyclophiline beeinflussen (Price *et al.*, 1991). Eine Sequenz, die für eine mögliche Kernlokalisierung kodieren könnte, fehlt dem Cyclophilin B-Homologen aus *D. melanogaster*.

Für funktionelle Analysen von Genen stellt die Herstellung transgener Linien eine wichtige Methode in der *Drosophila* Genetik dar. Seit Rubin und Spradling (1982) das erste Vektorsystem für eine P-Element vermittelte Transformation in der Keimbahn entwickelten, wurden verschiedene P-Element Transformationsvektoren konstruiert (Ashburner, 1989; FlyBase ftp.Bio.indiana.edu). Das von Schotta und Reuter (2000) entwickelte pP{GS} Vektorsystem ermöglicht unter anderem eine Analyse der Verteilung von Genprodukten über eine GFP-Fusion des zu untersuchenden Gens. Nach Isolierung der vollständigen cDNA für das Cyclophilin B Homologe aus *Drosophila melanogaster* konnten verschiedene GFP-Fusionsproteine konstruiert werden, die unter Kontrolle des Hitzeschock-Promotors hsp70 stabil in *Drosophila melanogaster* exprimiert wurden. Die Lokalisation der Fusionsproteine unterschied sich in Abhängigkeit von der C-terminalen bzw. N-terminalen Fusion des GFP-Fusionsanteils. Für die C-terminale Fusion konnte das Protein cytoplasmatisch nachgewiesen werden, für die N-terminale Fusion war das Protein diffus im Kern lokalisiert. Der aufgetretene Widerspruch kann wie folgt erklärt werden. Es wurde jeweils die vollständige cDNA fusioniert, das heißt beginnend vom Start ATG (Methionin) bis zur letzten codierenden Aminosäure (Threonin). Erst nach der N-terminalen Aminosäure-Sequenzierung des aus Embryonen isolierten nativen Proteins konnte festgestellt werden, dass die folgende Aminosäure-Sequenz beginnend mit dem Start Methionin bis zum ersten Aspartat im Vergleich zur translatierten cDNA fehlt: MKLFLSVFVVALVAGVVVA. Das native Protein beginnt mit einem Aspartat: NH₂-DDSK.....und endet mit DATD-COOH. Für eine N-terminale GFP-Fusion würde das heißen, dass der GFP-Fusionsanteil mit dieser Sequenz durch eine Signalpeptidase abgespalten würde. Im Vergleich dazu bleibt bei C-terminaler GFP-Fusion der Fusionsanteil erhalten.

N-terminale Fusion:

GFP-NH₂-MKLF₂SVFVVALVAGVVVADDSK.....DATD-COOH

↑

Signalpeptidase

C-terminale Fusion:

NH₂-MKLF₂SVFVVALVAGVVVADDSK.....DATD-COOH-GFP

↑

Signalpeptidase

Für GFP ohne Fusionsanteil konnte eine diffuse Verteilung im Kern nachgewiesen werden (Rippmann *et al.*, 2000). Bei der oben beschriebenen aminoterminalen Sequenz handelt es sich um eine Signalsequenz, die zur Anlagerung eines aktiv synthetisierenden Ribosoms an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums führt und für die Translokation des Cyclophilins durch diese Membran essentiell ist. Durch Sabatini und Blobel (1970) wurde erstmals postuliert, dass das Signal für die Bindungsstelle eine Aminosäuresequenz nahe am Aminoende der neu entstehenden Polypeptidkette ist. Diese Signalthypothese fand bald Unterstützung, indem Milstein und Brownlee entdeckten, dass eine *in vitro* von freien Ribosomen synthetisierte Immunglobulinkette eine aminoendständige Sequenz aus 20 Aminosäure-Resten enthält, die das reife *in vivo* synthetisierte Protein nicht hat (Stryer, 1994). Eine Consensus-Sequenz ist in den verschiedenen bisher bekannten aminoterminalen Signalsequenzen nicht zu erkennen, jedoch sind sie zwischen 13 und 36 Resten lang und das aminoterminalende enthält mindestens einen positiv geladenen Rest. Ein stark hydrophober Abschnitt bildet das Zentrum der Signalsequenz und ist 10-15 Aminosäure-Reste lang. In dieser Region sind Alanin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Valin häufig anzutreffen. All diese Eigenschaften treffen auf die oben aufgeführte Signal-Sequenz zu. Da für die C-terminale Fusion ein cytoplasmatisches Signal erhalten wurde, wäre eine Lokalisation im ER denkbar, eine Feinlokalisierung ist aber auf Grund der Überexpression durch den Hitzeschock-Promotor nicht möglich. Hier könnten elektronenmikroskopische Aufnahmen in Zusammenhang mit Immunogold-Färbungen genaueren Aufschluß geben. Für die Lokalisation im ER spricht ebenfalls die Anreicherung des CypB Homologen in der Kernfraktion. Der Kern ist über die Kern-Lamina mit dem Endoplasmatischen Retikulum

verbunden. Es ist bei dieser Präparationsmethode möglich, dass das ER nicht vollständig vom Kern abgetrennt wurde und das ER-lokalisierte CypB angereichert wurde.

Da bei der N-terminalen Fusion mit GFP die oben beschriebene Signalsequenz nicht mehr amino-ständig ist, kann sie wahrscheinlich auch nicht mehr die eigentliche Funktion ausüben, die zur Lokalisation im ER führt. Denkbar wäre ein Abbau der fehlgeleiteten Proteine und die Anreicherung von GFP ohne Signalsequenz im Kern. Damit wäre auch der Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz zwischen C- und N-terminaler Fusion erklärbar.

Westernblot-Analysen an den verschiedenen Linien bestätigen die aufgeführte Hypothese. In den Linien, welche das C-terminale GFP-Fusionsprotein exprimieren, konnte mit dem CypB Antikörper nach Hitzeschock neben dem internen Wildtyp-Cyclophilin von 20 kDa auch das GFP-Fusionsprotein von 46 kDa nachgewiesen werden. Linien, die das N-terminale GFP-Fusionsprotein exprimierten, zeigten im Westernblot mit dem CypB Antikörper nur das interne Cyclophilin von 20 kDa. Mit monoklonalen GFP-Antikörper konnte für die transgenen Linien, die das N-terminale Fusionsprotein exprimieren, ein ca. 26 kDa großes Protein nach Hitzeschock gezeigt werden, welches dem GFP ohne Fusionsanteil entspricht. Diese Tatsache stützt die Aussage, dass in den Linien mit N-terminalen Fusionsprotein nur GFP detektiert wurde. Die diffuse Kernlokalisierung wird wahrscheinlich durch GFP ohne Fusionsanteil hervorgerufen.

4.3. Die Deletion des CypB-Gens führt zu rezessiver Lethalität

Drosophila melanogaster ist ein attraktiver Modellorganismus für die Beantwortung einer Vielzahl biologischer Fragen. Für die Untersuchung der *in vivo* Funktion verschiedener Gene wurden Methoden entwickelt, mit denen eine umfangreiche Mutantanalyse durchgeführt werden kann. Dazu gehören beispielsweise EMS Mutagenese (Alderson, 1965; Lewis und Bacher 1996), P-Element vermittelter Gentransfer (Rubin und Spreadling, 1982; Spreadling and Rubin, 1982; Karess und Rubin, 1984), P-Element vermittelte Mutagenese oder der Aufbau gezielter Überexpressions-Systeme (Brand und Perrimon, 1993; Rorth, 1996). In einigen Beispielen wurde beschrieben, dass die Existenz eines P-Elementes in der Nähe des Locus des gewünschten Gens zu einer Mutation führt, oder aber eine Mutation nach der Remobilisierung des P-Elementes auftreten kann (Littleton *et al.*, 1993; Tower *et al.*, 1993; Zinnsmaier *et al.*, 1994).

Zur Analyse der *in vivo* Funktion des Cyclophilin Homologen aus *Drosophila melanogaster* wurde nach einer P-Element Insertion im CypB Locus gesucht. Mit Hilfe des *Drosophila* Genom-Projektes (Berkeley *Drosophila* Genome Project, www.fruitfly.org) konnte mit der EP

2294 Insertionslinie ein solches Element identifiziert werden. Die Linie entstand beim Aufbau eines modularen Missexpressions-Screens (Rorth, 1996). Sie diente als Ausgangspunkt für ein Mutagenese-Experiment, das zur Deletion des Cyclophilins führen sollte.

Homozygote Tiere für die EP-Element-Insertion der Linie EP2294 sind semiletal und männlich steril. Der genaue Insertionsort des EP-Elementes konnte durch Sequenz-Analysen bestimmt werden. Er befindet sich im Promotor-Bereich des Cyclophilin-Gens, 66 bp vom Translationsstart entfernt. Mit Hilfe von RT-PCR und Westernblot-Analysen konnte sowohl eine Verringerung der Transkriptmenge als auch eine Verringerung der Proteinmenge in adulten, für die EP-Element-Insertion, homozygoten Tiere nachgewiesen werden. Da die Insertion des EP-Elementes zu keiner Nullmutation führte, kann von einer hypomorphen Mutation ausgegangen werden. Um zu zeigen dass, der Phänotyp mit der hypomorphen Mutation des Cyclophilin Gens korreliert, wurde das EP-Element remobilisiert. Ausgehend von der EP2294-Insertionslinie konnte durch Remobilisierung und Selektion auf Verlust des EP-Elementes drei Revertanten erzeugt werden. Diese entsprechen auf molekularer Ebene wieder vollständig dem Wildtyp. Phänotypisch konnte kein Wildtyp erzeugt werden. Es traten zwar wieder gehäuft homozygote Tiere auf, die männliche Sterilität konnte aber durch die Reversion des EP-Elementes nicht gerettet werden. Sie scheint somit nicht mit der hypomorphen Mutation, die durch die Insertion des EP-Elementes im Promotorbereich ausgelöst wird, zu korrelieren. Wahrscheinlich wird sie durch eine weitere Mutation, die auf dem 2. Chromosom liegt, ausgelöst. Mittels Rekombination in Weibchen könnte dieser putative Mutationsort gegen Wildtyp-Chromosom ausgetauscht werden.

Im Verlauf des Remobilisierungsexperimentes konnte eine Linie isoliert werden, bei der die Remobilisierung des EP-Elementes mit der Deletion des 1. Exons und des 1. Introns des CypB verbunden war. Diese Mutation führte zur rezessiven Lethalität.

Um zeigen zu können, dass die Deletion zum völligen Verlust des CypB-Genproduktes führt, mussten homozygote Allele von heterozygoten Allelen für die CypB Defizienz unterscheidbar sein. Zu diesem Zweck wurde ein spezielles GFP markiertes Balancerchromosom verwendet. Mit Hilfe solcher Stabilisierungschromosomen wird Crossover zwischen beiden homologen Chromosomen wirksam ausgeschlossen. Der von Rudolph *et al.* (1999) etablierte *CyO* GFP Balancer erlaubt eine einfache Differenzierung zwischen für eine Mutation homo- oder heterozygoten Tieren. Aufgrund der Fluoreszenz-Markierung des Balancers ist eine Differenzierung während der Embryonalentwicklung über alle larvalen Stadien, der Puppe bis hin zum adulten Tier möglich. Im Westernblot konnte daraufhin der völlige Ausfall des CypB Genproduktes gezeigt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass einzelne Individuen,

die für die CypB-Defizienz homozygot sind, bis zum Puppenstadium überlebten. Die späte Lethalität der homozygoten Tiere für die Nullmutation spricht für eine sehr starke maternale Komponente des Cyclophilins.

Die rezessive Lethalität der Deletionsmutante spricht für eine essentielle Funktion des Cyclophilins. In einem Rescue-Experiment muß gezeigt werden, dass die rezessive Lethalität mit dem Verlust des CypB korreliert. Dafür wurden genomische Phagen isoliert und charakterisiert. Ausgehend davon wurde ein genomisches CypB-Fragment konstruiert, welches mit GFP fusioniert wurde. Mittels P-Element vermittelter Transformation konnte das Konstrukt zwar in das Genom integriert werden, es konnte aber keine stabile Linie mit Balancern für das 2. und 3. Chromosom aufgebaut werden. Da auch kein X-chromosomaler Erbgang zu beobachten war, musste davon ausgegangen werden, dass das Konstrukt auf dem 4. Chromosom integrierte. Dieses Chromosom liegt fast ausschließlich in der kondensierten, heterochromatischen Form vor. Mittels PCR konnte für diese Linie die Integration des Konstrukts nachgewiesen werden, im Western-Blot konnte aber weder mit dem CypB-Antikörper noch mit dem monoklonalen GFP-Antikörper das Protein detektiert werden. Wahrscheinlich wird die Transkription durch euchromatische Positionseffekte unterdrückt. Für einen weiteren Rescue-Versuch wurde ein 5,5 kb *XbaI*-Fragment zur Herstellung transgener Fliegenlinien fertiggestellt.

4.4. Das Cyclophilin B-Protein wird maternal exprimiert

Die späte Lethalität der homozygoten Tiere für die Nullmutation spricht für eine sehr starke maternale Komponente des Cyclophilins. Immunocytoologische Analysen führen zu Aussagen über die zeitliche und räumliche Verteilung von Proteinen. Mit der Überexpression des CypB Homologen aus *Drosophila melanogaster* in *E. coli* war es möglich einen polyklonalen Antikörper zu gewinnen, der gegen dieses Protein gerichtet ist. In Fliegen-Homogenat konnten drei Proteine mit den Molekulargewichten von 40 kDa, 20 kDa und 18 kDa detektiert werden. Dabei handelt es sich um die CsA-Bindungspartner, die über die CsA-Affinitäts-Säule isoliert wurden. Cyclophiline verfügen über eine hochkonservierte, etwa 130 Aminosäure umfassende, Kerndomäne (Kallen *et al.*, 1991, Pflügel *et al.*, 1993), in der die Bindung von Peptidsubstraten und CsA erfolgt.

Über die Deletionsmutante gelang die Gewinnung eines CypB spezifischen Antiköpers durch Inkubation auf Homogenat von Larven, die für die CypB-Deletion homozygot sind. Mit

diesem aufgereinigten Antikörper erfolgten immunocytoologische Analysen an Wildtyp-Embryonen und Wildtyp-Ovarien. Das Cyclophilin wird in starkem Maße in den Ovarien exprimiert. Zu keinem Zeitpunkt der Oogenese konnte eine Kernlokalisierung gezeigt werden. Es ist im Cytoplasma sowohl in den Follikelzellen als auch in der Oocyte nachweisbar. Während der Embryogenese ist das Protein sehr stark in frühen Embryonen exprimiert. Es ist aber auch hier zu keinem Zeitpunkt im Kern lokalisiert. Die erhöhte Expression von Cyclophilinen in frühembryonalen Entwicklungsstadien wurde auch für Cyclophilin 3 (Dornan *et al.*, 1999) und Cyclophilin 4 (Page und Winter, 1999) aus *Caenorhabditis elegans*, für ein Cyclophilin Homologes aus *Digitalis lanata* (Scholze *et al.*, 1999) und Cyp2 und 3 aus *Dictyostelium discoideum* (Tapparo *et al.*, 1999) gezeigt.

Zusätzlich konnte mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektroskopie und Westernblot-Analysen die erhöhte Expression des Cyclophilin B in frühembryonalen Stadien nachgewiesen werden. Northern-Analysen zeigten eine erhöhte Konzentration an CypB kodierender mRNA in frühen Embryonen. Ab dem 1. Larvenstadium setzt die zygotische Expression des CypB ein, wie in Northern- und Western-Analysen gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse korrelieren mit der späten Letalität der homozygoten Deletionsmutanten. Die ersten embryonalen Kernteilungszyklen bei *Drosophila melanogaster* werden durch maternale Produkte ermöglicht. Die zygotische Expression beginnt erst während der Kernteilungszyklen 11-13 (Foe *et al.*, 1993). Denkbar ist, dass CypB als starke maternale Komponente auf den für die CypB-Defizienz homozygoten Embryo übertragen wird. Mit der später einsetzenden zygotischen Expression, fehlt diesen Embryonen das Genprodukt aufgrund der Nullmutation. Sie sterben in Abhängigkeit von der Stärke der maternalen Komponente.

Genetisch müsste die maternale Komponente über folgendes Experiment abgesichert werden: Man müsste eine stabile Linie mit einem genomisches Konstrukt aufbauen. Dieses Konstrukt müsste zum Beispiel mit GFP fusioniert sein. Man kreuzt nun Weibchen dieser Linie gegen Wildtypmännchen bzw. Männchen dieser Linie gegen Wildtypweibchen. Dabei wird das erstmalige Auftreten des GFP fusionierten genomischen Konstruktes verfolgt. Bei einer maternalen Komponente sollte das Transkript in 0-2 Stunden alten Embryonen auftreten. Fehlt diese Komponente erscheint das Transkript erst nach drei Stunden, mit dem Beginn der zygotischen Teilungen.

Die Deletion des Cyclophilin B in *Drosophila melanogaster* führt zu rezessiver Lethalität. Die starke frühembryonale Expression könnte ein Hinweis auf deren Bedeutung während der

Embryonalentwicklung sein. Eine essentielle Funktion für PPIasen wurde bisher nur für das Ess1, einem Parvulin aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Im Gegensatz dazu besitzt die Hefe acht verschiedene Cyclophiline und vier FKBP, die weder allein oder in Kombination essentiell sind (Dolinski *et al.*, 1997). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass es sich bei den PPIasen um orthologe Gene handelt. Scheinbar kann die Funktion dieser Genprodukte durch andere Genprodukte übernommen werden. Andere Experimente zeigen, dass jede PPIase vielmehr eine ihr zugeordnete Funktion besitzt. Diese Aussage wurde durch Studien an *Drosophila melanogaster* und Säugern gefestigt. Die Cyclophiline NinaA und RanBP2 aus *Drosophila* sind bei der Reifung von Opsin essentiell (Baker *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1996), FKBP12 aus *Mus musculus* bildet die Untereinheit des Ryanodin-Rezeptors (Brillantes *et al.*, 1994; Shou *et al.*, 1998).

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression des Cyclophilin A Gens letale Mutationen des *ess1* Gens suppremiert (Wu *et al.*, 2000; Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2000). Enzymatisch inaktive Varianten von CypA konnten den lethalen Phänotyp nicht retten. Es ist das erste Beispiel für eine funktionelle Überlappung zweier verschiedener Familien der PPIasen. Es wurde weiterhin getestet, ob die Enzym-Aktivität des Cyclophilins A für die Suppression der *ess1* Mutation verantwortlich ist. Dafür wurden Wachstumsversuche bei sehr hohen CsA-Konzentrationen durchgeführt (100 µg/ml). CsA hatte auf das Wachstum von Wildtyp keinen Effekt. Es verhinderte aber die Suppression der Letal-Mutation von *ess1* durch CypA.

In dieser Arbeit durchgeführte Fütterungsexperimente mit CsA an *Drosophila* führten zu einer Verlangsamung der Entwicklung und zu einer starken Verringerung der Schlupfraten. Gleichzeitig wurde in einem anderen unabhängigen Fütterungsexperiment die Wirkung von CsH überprüft. Dieses D-¹¹MeVal-Cyclosporin besitzt vergleichsweise zu CsA eine minimale Affinität zu Cyclophilinen (Harrison und Stein, 1992). CsH hatte keinen Einfluß auf die Entwicklungszeit, beeinflusste aber die Schlupfraten. Durch das *Drosophila*-Genom-Projekt wurden 14 putative Cyclophiline und 8 FKBP für die Fruchtfliege vorausgesagt (Adams *et al.*, 2000). Da bei diesen Fütterungsexperimenten das Cyclophilin B-Homologe aus *Drosophila melanogaster* wahrscheinlich nicht spezifisch inhibiert werden konnte, sind diese Ergebnisse auf die Inhibierung verschiedener Cyclophiline in *Drosophila* zurückzuführen.

4.5. Nutzung des CyclophilinB/EGFP-Fusionsproteins zum Studium von Protein-Protein-Interaktionen

Es ist bekannt, dass Cyclophiline in verschiedene Protein-Interaktionen involviert sind. Sie interagieren beispielsweise mit Steroid-Rezeptoren (Ku *et al.*, 1992), dem Transkriptionsfaktor c-Myb (Levenson und Ness, 1998), dem Capsid-Protein p24 des HIV-1 (Franke *et al.*, 1994; Luban, 1996) und dem Rhodopsin der Fruchtfliege (Zuker, 1996), um nur einige zu erwähnen. Zur Identifikation von Proteinen, die mit spezifischen Isoformen der Cyclophilin-Familie interagieren, wurden bisher das Hefe-Dihybridsystem oder „pull down“ Assays verwendet (Phizicky, 1995). In einigen Fällen wurden mit diesen Methoden falsch-positive Interaktionen nachgewiesen, da die Möglichkeit fehlt, die biologische Relevanz der identifizierten Liganden zu überprüfen. Eine weitere Möglichkeit Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu beobachten, wäre die direkte Visualisierung des Interaktionspartners in der Zelle oder deren Extrakte.

Für diesen Zweck wurde deshalb rekombinantes DmCypB-EGFP konstruiert. Nach Überexpression und Reinigung konnte das fluoreszierende Fusionsprotein nach nativer PAGE unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. (Kiessig *et al.*, 2001). Der Fluoreszenz-Test gab weiterhin Informationen über die strukturelle Integrität des Fusionspartners innerhalb des Fusionsproteins. EGFP fluoresziert nur im nativen Zustand. Aufgrund der C-terminalen Fusion und dem Wissen, dass der Faltungsprozess vom N- zum C-Terminus erfolgt, konnte von einer korrekten Faltung, die das rDmCypB und den EGFP-Fusionsanteil beinhaltet, ausgegangen werden (Waldo *et al.*, 1999). Da eine korrekte Faltung des Fusionsproteins keine Rückschlüsse auf die enzymatische Aktivität zulässt, wurde die *cis/trans* Isomerisierung mit dem Standardsubstrat Ac-Ala-Ala-Pro-Phe-4-DFA im Protease-freien Assay bestimmt. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $2.0 \pm 0,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ist vergleichbar mit Daten anderer PPIasen (Fischer, 1994).

Die Nutzung des Fluoreszenz-markierten CypB aus *Drosophila* in Kombination mit elektrophoretischen Methoden konnte für die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen etabliert werden. Es wurde dazu die bekannte Bindung von Cyclophilinen an das Kapsid-Protein p24 von HIV-1 (Franke *et al.*, 1994) genutzt. Die Methode der band-shift Analyse ermöglichte die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Protein-Ligand Komplexe migrieren in nativen Polyacrylamid-Gelen anders als ihre individuellen Komponenten, aufgrund der dreidimensionalen Struktur

des Komplexes (Cann, 1996). Mit Erhöhung der p24 Konzentration konnte ein deutlicher band-shift beobachtet werden, der auf eine Komplexbildung zurückzuführen ist. Die beobachtete Interaktion ist spezifisch für rDmCypB-EGFP und p24, da Kontrollexperimente mit Rinder-Serumalbumin unter gleichen Bedingungen keinen Einfluß auf die Migration von rDmCypB-EGFP hatte (Kiessig *et al.*, 2001).

Für die Analyse entwicklungspezifischer putativer Interaktoren für das Cyclophilin wurde rekombinantes DmCypB-EGFP mit cytosolischen Extrakt aus *Drosophila melanogaster*-Embryonen inkubiert. Mittels nativer Elektrophorese konnte eine Verschiebung des rDmCypB-EGFP-Signals beobachtet werden, der für eine Interaktion des Cyclophilins mit einem putativen, endogenen Liganden spricht. Zur Überprüfung, ob dieser shift spezifisch für die Cyclophilin-Interaktion ist, wurde reines GFP mit cytosolischem Extrakt behandelt. Hier konnte kein shift beobachtet werden. Eine Inhibierung der rDmCypB-GFP-Interaktion mit dem putativen Liganden sollte mit CsA erfolgen. Es konnte aber nur eine partielle Inhibierung der Interaktion beobachtet werden, wenn rDmCypB-GFP mit CsA vorbehandelt wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass der putative Ligand eine hohe Affinität für dieses Cyclophilin hat, die nicht durch CsA zerstört werden kann, wenn der Komplex schon gebildet wurde (Kiessig *et al.*, 2001). Um welchen Liganden es sich dabei handelt müsste im Folgenden geklärt werden.

Die Nutzung eines GFP markierten Cyclophilins in Kombination mit nativer PAGE führte zur Voraussage eines putativen endogenen Liganden aus embryonalen Zellextrakten von *Drosophila melanogaster*. Die Methode scheint auf andere Proteine übertragbar zu sein, so dass hier eine neue Möglichkeit für das Auffinden und die Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen unter zellulären Bedingungen beschrieben werden konnte.

Zur Isolation weitere putativer Interaktoren für das CypB Homologe aus *D. melanogaster* wurde rekombinantes DmCypB-GST konstruiert, überexprimiert und gereinigt. Der Nachweis der Interaktion des CYP B-Proteins mit dem Heterochromatin assoziierten SU(VAR)3-9-Protein gelang bisher nicht. Es wurde embryonaler Extrakt einer GFP-fusionierten Su(var)3-9-Überexpressionslinie mit rekombinanten DmCypB-GST inkubiert und co-immunopräzipitiert. Über eine anschließende Westernblot-Analyse konnte keine SU(VAR)3-9-GFP-Bande nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Wahrscheinlich lag die eingesetzte Konzentration an SU(VAR)3-9-GFP-Protein bezogen auf die eingesetzte Gesamt-Proteinkonzentration für den monoklonalen GFP-Antikörper unter der Detektionsgrenze. Hier müsste eine Kernfraktion eingesetzt werden, die zu einer Anreicherung des SU(VAR)3-9-

GFP-Proteins führt. Außerdem müssten sehr frühe Embryonen eingesetzt werden. Eine Interaktion des Cyclophilins mit SU(VAR)3-9 kann nur außerhalb des Kerns möglich sein. Sie könnte in den präblastodermalen Embryonen stattfinden. Heterochromatin, und damit die typische Form somatischen Chromatins wird erst kurz nach der Furchung aufgebaut. Bei *Drosophila melanogaster* wandern zu diesem Zeitpunkt die Kerne zur Peripherie des Eies. Biochemisch unterscheidet sich dieses neu formierte somatische Chromatin durch den Einbau des Linkerhistons H1 und anderer Nucleohistonproteine. So kann Histon H1 als essentieller Chromatinbestandteil, erst ab dem Kernteilungszyklus 8 in den Kernen detektiert werden (Ner und Travers, 1994). Dieser Umbau konnte durch biochemische Analysen von *Xenopus laevis* Embryonen vor und nach dem Blastulastadium nachgewiesen werden (Wolffe, 1994). Damit wäre auch erklärbar, dass sowohl die transgenen CypB/GFP Linien als auch die CypB-Defizienz keinen Einfluß auf PEV haben, da CypB als maternale Komponente auf den Embryo übertragen wird und somit wahrscheinlich nicht direkt am Aufbau von Chromatin beteiligt ist. Denkbar wäre, dass Cyclophilin B als Faltungshelfer von SU(VAR)3-9 agiert, und/oder sich am Aufbau von Komplexen, die für die Bildung von Heterochromatin essentiell sind, beteiligt.

Für Cyclophilin A und Ess1 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde erstmals eine Interaktion mit Komponenten der Sin3-Rpd3 Histon-Deacetylase (HDAC) beschrieben (Aravelo-Rodriguez *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass Chromatin-Remodeling durch Histon-Deacetylierung wichtig für die Kontrolle von Genen ist, die den Zellzyklus beeinflussen (Brehm *et al.*, 1998). Rpd3 und sin3 Gene regulieren sowohl positiv als auch negativ die Transkription vieler Gene (Vidal und Gaber, 1991; Vidal *et al.*, 1991). Aus der Wechselwirkung von Ess1 und Sin3-Rpd3 HDAC wurde geschlossen, dass Ess1 einen Antagonisten darstellt, der die HDAC-Aktivität beeinflusst. Der Verlust von Ess1 erhöht die Deacetylase-Aktivität, die zur Repression von Zellzyklus-Genen und damit zu mitotischem Arrest führt (Aravelo-Rodriguez *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2000).

Für *Drosophila melanogaster* wurden gezeigt, dass Su(var)2-1 Mutationen die Histon H4 Deacetylierung beeinflussen (Dorn *et al.*, 1986). Für Rpd3 Histonacetylase wurden wiederum enhancer loss-of-function und Suppressor gain-of-function Mutationen isoliert (De Rubertis *et al.*, 1996; Mottus *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieser Mutationen könnte die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Genen gelingen, welche höher geordnete Chromatin Strukturen kontrollieren. Die putative Wechselwirkung des Su(var)3-9 Proteins mit dem Cyclophilin B-Homologen, als auch die die in Hefe erzielten Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Cyclophilinen am Chromatin-Remodeling.

Eine Beteiligung von Cyclophilinen an der Regulation von Transkriptionsfaktoren wurde für Cyp 40 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der protooncogene Transkriptionsfaktor c-Myb negativ durch Cyp 40 reguliert wird (Levenson und Ness, 1998). Die DNA-Bindungsaktivität des c-Myb ist wiederum von der PPIase-Aktivität abhängig. Bei Zugabe von rekombinanten Cyp40 zu Kernextrakten wurde die Bindungsaktivität des c-Myb aufgehoben. Umgekehrt bewirkte die Zugabe von CsA eine Wiederherstellung der DNA-Bindungsaktivität des Protooncogens, aufgrund der Neutralisierung der N-terminalen PPIase-Domäne des Cyp40 (Levenson und Ness, 1998). Cyclophiline scheinen somit an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt zu sein, die für die Transformation und Differenzierung von Zellen von Bedeutung sind. Ähnliche Funktionen wurden für die Heterochromatin-assoziierten SET-Domänen Proteine beschrieben. So konnte für das humane MMSET-Protein ein oncogenes Potential bei Überexpression gezeigt werden. Die durch eine Translokation hervorgerufene Überexpression des Wildtyp-Proteins führt zu einer malignen Transformation und zur Entstehung eines multiplen Myeloms. Der Phosphorylierungsstatus der SET-Domäne ist ein wichtiger Schaltmechanismus zwischen ruhenden Zellen in der G₀-Phase und ungehemmt proliferierenden Zellen. Durch Phosphorylierung von HRX, dem humanen Homologen von Trithorax aus *Drosophila melanogaster*, an einem Tyrosinrest in der SET Domäne entfaltete dieses Protein sein oncogenes Potential und führte zur Transformation von Zelllinien (Cui *et al.*, 1998).

Erstmalig konnte in der vorliegenden Arbeit eine Prolyl-Peptidyl *cis-trans* Isomerase aus *Drosophila melanogaster* als essentiell beschrieben werden. Die Expression des untersuchten Cyclophilin B Homologen unterliegt einer starken mütterlichen Kontrolle. Damit gelang eine wichtige Aussage zur Funktion dieser PPIase *in vivo*. Die vermutete wichtige biologische Bedeutung dieser Enzymklasse wurde damit bestätigt. Mit dem Aufbau verschiedener transgener Linien für dieses Cyclophilin, der Charakterisierung einer Deletionsmutante und der Konstruktion verschiedener rekombinanter Proteinvarianten, sowie der Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen Cyclophilin B wurde eine Reihe von Möglichkeiten geschaffen dieses Enzym weiter zu charakterisieren und putative Wechselwirkungspartner zu finden. Im Folgenden müsste geklärt werden, ob die rezessive Lethalität mit dem Verlust der *cis/trans*-Isomeraseaktivität zusammenhängt. Für die Lösung dieser Fragestellung wurde eine Punktmutation im hochkonservierten Kernbereich der Cyclophilin-Domäne eingeführt. Es wurde die geladene Aminosäure Arginin in Position 61 gegen die ungeladene Aminosäure Alanin ausgetauscht. Arginin in Position 61 ist sowohl in die Cyclosporin A als auch in die

Substratbindung einbezogen (Kallen *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1991; Pflügl *et al.*, 1993; Theriault *et al.*, 1993). Mutationen für das *Drosophila melanogaster* NinaA wurden über die Fehlleitung von Rhodopsin und der daraus resultierenden Fehlentwicklung des Auges isoliert (Stamnes and Zuker, 1990; Stamnes *et al.*, 1991). In einem genetischen Screen wurden ca. 700.000 Ethylmethyl-Sulfonat behandelte Tiere auf den sichtbaren Phänotyp der Pseudopupille untersucht und siebenzig unabhängige *nina A* Mutanten-Allele isoliert. Alle Missens-Mutationen wurden lokalisiert und mit dem 42% identischen humanen CypA verglichen. Von 20 Aminosäure-Austauschen fallen 14 in die Region, die mit dem humanen CypA identisch ist, und die CsA bindende Region sowie die Substratbindungsstelle bilden (Ondek *et al.*, 1992). Die Punktmutation R61A im Cyclophilin B Homologen aus *D. melanogaster* sollte zu einer inaktiven Enzym-Variante führen. Es wurde rekombinantes CypR61A-GST konstruiert, überexprimiert und gereinigt. Nach Bestimmung der katalytischen Aktivität konnte ein Verlust der Enzymaktivität bestätigt werden. Es sollte nach dem Aufbau stabiler transgener Linien, die diese Punktmutation tragen und nach dem Einkreuzen in die Deletionmutante, keine Rettung der Lethalität erfolgen. Damit wäre der Beweis erbracht, dass der Verlust der katalytischen Aktivität zur Lethalität führt.

5. Zusammenfassung

PPIasen katalysieren die *cis/trans* Isomerisierung von Xaa-Pro-Peptidbindungen. Es gibt verschiedene Vertreter dieser Enzymklasse, die entsprechend ihrer Bindung an immunsuppressive Inhibitoren eingeteilt werden. Diese ubiquitär vorkommenden Enzyme sind in der Lage, die sehr langsam verlaufende Reaktion mit hoher Effizienz zu beschleunigen. Die vorliegende Arbeit beschreibt die genetische und molekulare Charakterisierung einer bisher unbekanntenen PPIase, dem Cyclophilin B aus *Drosophila melanogaster*.

Um Cyclophiline während der Entwicklung von *D. melanogaster* zu charakterisieren, wurde eine CsA-Affinitäts-Säule präpariert. Es konnten drei CsA Bindungspartner isoliert werden. Mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie konnte das Cyclophilin mit einer Masse von 20.3 kDa als Cyclophilin B Homologes aus *D. melanogaster* identifiziert werden. Das Gen, welches für dieses Cyclophilin codiert, ist auf dem 2. Chromosom in Region 2R58F2-3 lokalisiert und besteht aus drei Exonen und zwei Intronen.

Mit der Aufklärung der genomischen Situation war es möglich nach Insertionen von transponiblen Elementen zu suchen. Mit der Linie EP2294 wurde eine solche Insertion gefunden. Diese Linie ist semiletal und männlich steril. Es konnte der Insertionsort des EP-Elementes bestimmt werden. Das Element befindet sich im Promotorbereich des Cyclophilin-Gens genau 66 Basenpaare vom Translationsstart entfernt. Durch diese Insertion wird eine hypomorphe Mutation ausgelöst, die zu einer Verringerung des CypB Transkripts als auch zu einer Verringerung des CypB Genproduktes führt.

Im Verlauf eines Reversionsexperimentes wurden 700.000 Fliegen auf Verlust des EP-Elementes untersucht. Dieses Experiment sollte zur Herstellung der Wildtyp-Situation führen. Im Verlauf des Experimentes konnten 279 stabile Linien etabliert werden, die mittels PCR charakterisiert wurden. Ausgewählte Linien wurden per Sequenzanalyse ausgewertet. Auf diese Weise wurden 3 Revertanten identifiziert, die den Phänotyp der EP2294 Linie nicht vollständig retten konnten. Die Semiletalität wurde aufgehoben, nicht aber die männliche Sterilität. Durch dieses Experiment konnte weiterhin eine Linie charakterisiert werden, bei der infolge der Remobilisierung des EP-Elementes eine Deletion entstand, die mit einer

Länge von 287 bp das erste Exon und erste Intron des Cyclophilin-Gens betrifft. Die Deletion führt in *Drosophila melanogaster* zu rezessiver Lethalität. Diese essentielle Funktion wurde für ein Cyclophilin erstmals beschrieben.

Durch den Einsatz von CyO/GFP-Balancern war es möglich heterozygote Allele von homozygoten Allelen für die CypB-Deletion zu unterscheiden. Im Westernblot konnte damit der völlige Ausfall des Cyclophilin-Genproduktes gezeigt werden. Weiterhin ermöglichte dieser Balancer Aussagen bis zu welchem Stadium der Fliegenentwicklung das homozygote Individuum lebensfähig war. Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Individuen bis zum Puppenstadium überlebten. Dieser Umstand spricht für eine sehr starke maternale Komponente des Cyclophilins. Weitere Nachweise, die für eine maternale Komponente sprechen, folgten mit Northern- und Westernblot-Analysen, sowie mit Hilfe der MALDI-TOF-Massen-Spektroskopie. Es konnte gezeigt werden, dass das CypB Transkript während der Embryogenese in frühembryonalen Stadien sehr stark exprimiert wird. Durch den Einsatz immunocytologischer Methoden konnte das CypB-Protein in den Ovarien und frühen embryonalen Stadien gezeigt werden.

Weiterhin konnten im Verlauf der Arbeit transgene Fliegenlinien etabliert werden, die ein CypB cDNA-EGFP-Konstrukt unter Kontrolle des Hitzeschockpromoters hsp70 exprimieren. Für diese Linien konnte das Fusionsprotein cytoplasmatisch nachgewiesen werden.

Mit der Sichtung einer rekombinanten Phagenbibliothek konnten 5 Phagen isoliert werden, die Ausgangspunkt für die Herstellung verschiedener Konstrukte zur Rettung des Mutantenphänotypen der CypB-Defizienz waren. Es wurde ein genomisches GFP Konstrukt, sowie ein 5,5 kb *Xba*I-Fragment fertiggestellt.

Die Nutzung des Fluoreszenz-markierten CypB aus *Drosophila* in Kombination mit elektrophoretischen Methoden konnte für die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen etabliert werden. Dazu wurde rekombinantes DmCypB-EGFP konstruiert, überexprimiert und gereinigt. Es wurde die bekannte Bindung von Cyclophilinen an das Kapsid-Protein p24 von HIV-1 genutzt. Die Methode der band-shift Analyse ermöglichte die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter nicht-denaturierenden Bedingung. Die Methode führte zur Voraussage eines putativen endogenen Liganden aus embryonalen Zellextrakten von *Drosophila melanogaster*.

Um zeigen zu können, dass die rezessive Letalität mit dem Verlust der PPIase-Aktivität zusammenhängt wurde eine Punktmutation im hochkonservierten Kernbereich der Cyclophilin-Domäne eingeführt. Es wurde die geladene Aminosäure Arginin in Position 61 gegen die ungeladene Aminosäure Alanin ausgetauscht. Arginin in Position 61 ist sowohl in die Cyclosporin A als auch in die Substratbindung einbezogen. Es wurde rekombinantes CypR61A-GST konstruiert, überexprimiert und gereinigt. Die Punktmutation führt zum Verlust der katalytischen Aktivität. Es sollte nach dem Aufbau stabiler transgener Linien, die diese Punktmutation tragen und nach dem Einkreuzen in die Deletionmutante, keine Rettung der Lethalität erfolgen. Damit wäre der Beweis erbracht, dass der Verlust der katalytischen Aktivität zur Lethalität führt.

Erstmalig konnte in der vorliegenden Arbeit eine Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase aus *Drosophila melanogaster* als essentiell beschrieben werden. Die Expression des untersuchten Cyclophilin B Homologen unterliegt einer starken mütterlichen Kontrolle. Damit gelang eine wichtige Aussage zur Funktion dieser *cis/trans* Isomerase *in vivo*. Die vermutete wichtige biologische Bedeutung dieser Enzymklasse wurde damit bestätigt. Mit dem Aufbau verschiedener transgener Linien für dieses Cyclophilin, der Charakterisierung einer Deletionsmutante und der Konstruktion verschiedener rekombinanter Proteinvarianten, sowie der Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen Cyclophilin B wurde eine Reihe von Möglichkeiten geschaffen diese PPIase weiter zu charakterisieren und putative Wechselwirkungspartner zu finden.

6. Literatur

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

Aghdashi, B., Ye, K., Resnick, A., Huang, A., Ha, H. C., Guo, X., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Snyder, S. H. (2001) FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *PNAS*, 27, 2425-2430

Alderson, T. (1965) Chemically induced delayed germinal mutation in *Drosophila*. *Nature*. 207, 164-167

Andreeva, A., Heads, R., Green C. J. (1999) Cyclophilins and their possible role in stress response. *Int. J. Exp. Path*, 80, 305-215

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223-230

- Anson, M.L. (1945) Protein denaturation and the properties of protein groups. *Adv. Prot. Chem.* 2, 361-368
- Arevalo-Rodriguez, M., Gardenas, M. A., Wu, X., Hanes, S. D., Heitman, J. (2000) Cyclophilin A and ESS1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 Histon Deacetylase. *Embo J.*, 19, 3739-3749
- Azhderian, E. M., Kolipaka, J., Lentz, S. Lorbeer, M.I. (1993) Nuclear membrane-associated cyclophilins of potential importance in cyclosporine immunosuppression. *Transplantation Proc.* 25, 524-526
- Bächinger, H. P., (1987) The influence of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase on the in vitro folding of type III collagen. *J. Biol. Chem.*, 262, 17144-17148
- Baker, E. K., Colley, N. J., Zuker, C. S. (1994) The cyclophilin homologue NinaA functions as a chaperone, forming stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *EMBO J.*, 13, 4886-4895
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- Brand, A. H., Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-415
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., Brennan, M, (1975) Consideration of the possibility that slow step in protein denaturation reactions is due to *cis-trans* isomerism of prolin residues. *Biochemistry*, 14, 4953-4963
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., Kouzarides, T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histon deacetylase to repress transcription. *Nature*, 391, 587-601
- Brent, R., Ptashne, M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43, 729-736
- Brillantes, A. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., Marks, A. R. (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506 binding protein. *Cell*, 77, 513-523
- Brunke, M., Dierks, T., Schlotterhose, P., Escher, A., Schmidt, B., Szalay, A. A., Lechte, M., Sandholzer, U., Zimmermann, R., (1996) Luciferase assembly after transport into mammalian microsomes involves molecular chaperones and peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. *J. Biol. Chem.*, 271, 23487-23494
- Cann, J. R. (1996) Theory and Practise of Gel Electrophoresis of interacting Macromolecules. *Anal. Biochem.*, 237, 1-16
- Chazin, W.J., Kördel, J., Drakenberg, T., Thulin, E., Brodin, P., Grundström, T., Forsen, S., (1989), Prolin isomerism leads to multiple folded conformation of calbindin D_{9K}: direct evidence from two-dimensional ¹N-NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2195-2198

- Chen, Y. G., Liu, F., Massague, J. (1997) Mechanism of TGF beta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.*, 16, 3866-3876
- Colgan, J., Asmal, M., Luban, J. (2000) Isolation, characterisation and targeted disruption of mouse ppiA: Cyclophilin A is not essential for mammalian cell viability. *Genomics*, 68, 167-178
- Colley, N. J., Baker, E. K., Stamnes, M. A., Zuker, C. S. (1991) The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway. *Cell* 67, 255-263
- Cooley, L., Kelley, R., Spreadling, A. (1988) Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P-elements. *Science*.239, 1121-1128
- Cui, X., Devivo, I., Slany, R., Miyamoto, A., Firestein, R., Cleary, M. L. (1998) Association of SET domain and myotubularin-related proteins modulates growth control. *Nature Genetics*, 18, 331-337
- De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., Spierer, P. (1996) The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and Yeast. *Nature*, 384, 589-591
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M., Heitmann, J. (1997) All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensible for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13093-13098
- Dorn, R., Heymann, S., Lindigkeit, , Reuter, G. (1986) Suppressor mutation of position-effect variegation affecting chromatin properties. *Chromosoma*, 93, 398-403
- Dorman, J., Page, A. T., Taylor, P., Wu, S. Y., Winter, A. D. (1999) Biochemical and structural characterization of a divergent loop cyclophilin from *Ceanorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 274, 34877-34883
- Duina, A. A., Marsh, J. A., Gaber, R. F. (1996) Identification of two Cyp-40 like cyclophilins in *Saccharomyces cerevisiae*, one of which is required for normal growth. *Yeast*, 12, 943-952
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., Elledge, S. J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type I catalytic subunit. *Genes & Dev.*, 7, 555-569
- Elgin, C. R. and Hood, L. E., (1973) Chromosomal Proteins of *Drosophila* embryos, *Biochemistry*, 24, 4984-4991
- Engels, B. (2001) P-Elements, Research Summary, Bill Engels home page. <http://www.wisc.edu/genetics/CATG/engels>
- Engels, W. R., Johnson-Schlitz, D. M., Eggleston, W. B., Sved, J. (1990) High frequency P element loss in *Drosophila* is homolog-dependent. *Cell*, 62, 515-525
- Evans, P.A., Dobson, C.M., Kautz, R.A., Hatful, G., Fox, R.O., (1987) Proline isomerism in staphylococcal nucleus characterized by NMR and site directed mutagenesis. *Nature*, 329, 266-268

- Feinberg, A. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA construction fragments to high specific activity. *Anal Biochem.*, 137, 266-267
- Ferreira, P. A., Nakayama, T. A., Pak, W. L., Travis, G. H. (1996) Cyclophilin related protein RanBP2 acts as a chaperone for red/green opsin. *Nature*, 383, 637-640
- Fields, S., Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 20, 245-246
- Fields, S., Sternglanz, R. (1994) The Two-Hybrid System: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics*, 10, 286-292
- Fischer, A., (1997) Molekulargenetische Untersuchung Heterochromatin assoziierter Proteine mit Hilfe des Hefe-Dihybridsystems und des Telomer-Positionseffektes in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, MLU Halle
- Fischer, G., Bang H., Mech, C. (1984) Detection of enzyme catalyses for *cis-trans* isomerisation of peptide bonds using prolin containing peptides as substrate. *Biomed. Biochem. Acta*, 43, 1101-1112
- Fischer, G., Schmid, F.X. (1990) The mechanism of proteinfolding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, 29, 2205-2212
- Fischer, G. (1994) Über peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angew. Chem.*, 106, 1479-1501
- Foe, V. E., Odell, G. M., Edgar, B. A. (1993) Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: Point and counterpoint. *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Franke, E. K., Yuan, H. E., Luban, J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions, *Nature*, 372, 359-362
- Franke, E.K., Luban, J. (1996) Inhibition of HIV-1 replikation by cyclosporin A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology* 222, 279-282
- Freedman, R.L. (1992) Protein folding in the cell. In Creighton, T.E. (ed), *Protein folding*. Freedman, New York, pp 455-539
- Fumihiro, F., Katsuhiko, T., Chiyoko, U., Takafumi, U. (1999) Mice lacking Pin 1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G₀ arrest. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265, 658-663
- Gallat, A. and Metcalfe, S. M. (1995) Peptidyl *cis/trans* isomerases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 63, 67-118
- Gething, M.J., Sambrook, J (1992) Protein folding in the cell. *Nature*, 355, 33-45

- Gloor, G. B., Nassif, N. A., Johnson-Schlitz, D. M., Preston, C. R., Engels, W. R. (1991) Targeted gene replacement in *Drosophila* via P-element-induced gap repair. *Science*. 1991, 1110-1117
- Gold, B. G. (1997) FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.*, 15, 2855-306
- Grathwohl, C., Wüthrich, K. (1981) NMR-studies of the rates of proline cis/trans isomerization. *Biopolymers*, 20, 2623-2633
- Grebe, M., Gadea, J., Steinmann, T., Kientz, M., Rahfeld, J. U., Salchert, K., Koncz, C., Jurgens, G. (2000) A conserved domain of the arabidopsis GNOM Protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding. *Plant Cell*, 12(3); 343-356
- Handschuhmacher, R. E., Haeding, M. W., Rice, J., Drugge R. J., Speicher, D. W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 226, 544-546
- Hanes, S. D., Shank, P. R., Bostian, K. A. (1989) Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 5, 55-72
- Hani, J., Stumpf, G., Domdey, H. (1995) Ptf1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows a strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Lett.*, 365, 198-203
- Harding, M. W., Handschuhmacher, R. E., Speicher, D. E. (1986) Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.*, 261, 8547-8555
- Harrison, R. K. und Stein, R. L. (1990) Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, 29, 3813-3816
- Higgins, K.A., Craik, D.J., Hall, J.G. Andrews, P.R. (1988) *Cis-Trans* isomerisation of the prolin residues in insulin studied by 13 C-NMR spectroscopy. *Drug Des. Deliv.*, 3,159-170
- Hobohm, U., Sander, C. (1994) Enlarged representative set of protein structures. *Protein Sci.*, 3, 522-524
- Jaenicke, R. (1993) What does protein refolding in vitro tell us about protein folding in the cell? *Philos. Trans. R. Soc. London Biol.*, 339, 287-294
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., Reuter, G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *CMLS*, 54, 80-93
- Johnson-Schlitz, D. M., Engels, W. R. (1993) P-element-induced interallelic gene conversion of insertions and deletion in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.*, 13, 7006-1018
- Jones, R. S., Gelbart, W. M. (1993) The *Drosophila* polycomb-group gene *Enhancer of zeste* contains a region with sequence similarity to *trithorax*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 6357-6366

- Jowett, T. (1986) Extraction of high molecular weight DNA. In D. B. Roberts, editor, *Drosophila – A practical approach*, IRL Press, Oxford page 276
- Kallen, J., Spitzfaden, C., Zurini M. G. M., Wider, G., Widmer, H., Wuthrich, K., Walkinshaw, M. D. (1991) Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature*. 353, 276-279
- Karess, R. E., Rubin, G. M. (1984) Analyses of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell*. 38, 1007-1015
- Kaya, B., Yanikoglu, A., Marcos, R. (1999) Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratog. Carcinog. Mutagen*, 19, 304-312
- Kaya, B., Yanikoglu, A., Creus, A., Marcos, R. (2000) Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, 16, 77-84
- Kiessig, S., Reissmann, J., Thunecke, F., Küllertz, G., Bang H. (in Druck) Application of a green fluorescent cyclophilin to study its protein-protein interactions by electrophoretic methods
- Kruse, M., Brunke, M., Esche, A., Szalay, A. A., Tropschug, M., Zimmermann, R. (1995) Enzyme assembly after de novo synthesis in rabbit reticulocyte lysate involves molecular chaperones and immunophilins. *J. Biol. Chem.*, 270, 2588-2594
- Ku, P. K., Albers, M. A., Chang, H., Faber, L. E., Schreiber, S. L. (1992) *Science*, 256, 1315-1318
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- Larrivee, D. C., Conrad, S. K., Stephenson, R. S., Pak, W. L. (1981) Mutation that selectively affects rhodopsin concentration in the peripheral photoreceptors of *Drosophila melanogaster* *J. Gen. Physiol.*, 78, 521-545
- Lebeau, M. C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L. E., Renoir, J. M., Radanyi, C., Baulieu, E. E. (1992) P58, an hsp 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide-directed polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 267, 4281-4284
- Levenson, J. D., Ness, S.A., (1998) Point-mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin catalyzed negative regulatory mechanism. *Mol. Cell*, 1, 203-211
- Lewis, E. B., Bacher, F. (1968) Methods of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Dros. Inf. Serv.* 43, 5316-5325
- Lindsley, D. and Zimm, G.G. (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, New York
- Littleton, J. T., Stern, M., Schulze, K., Perin, M., Bellen, H. J. (1993) Mutational analyses of *Drosophila synaptagmin* demonstrates its essential role in Ca²⁺ activated neurotransmitter release. *Cell*. 74, 1125-1134

- Lu, K. P., Hanes, S. D., Hunter, T. (1996) A human peptidyl prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*, 380, 544-547
- Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X., Davies, P., Lu, K. P. (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*, 399, 784-788
- Luban, J., (1996) Absconding with chaperone: essential cyclophilin A interaction in HIV-1 virions. *Cell*, 87,1157-1159
- Lyons, W. E., Steiner, J. P., Snyder, S. H., Dawson, T.M. (1995) Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP-12. *J. Neuroscience*, 15, 2985-2994
- Malezka, R., Hanes, S. D., Hackett, H.G., De Couet, H. G., George, L. (1996) The *Drosophila melanogaster* *dod* gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the *ESS1* cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93; 447-451
- Matouschek, A., Rospert, S., Schmid, K., Glick, B. S., Schatz, G. (1995) Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 6319-6323
- Mazo, A., Huang, D., Mozer, B., Dawid, I. (1990) The trithorax gene, a trans acting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc. Natl. Sci. USA*, 87, 2112-2116
- McDonald, M. L., Ardito, T., Marks, W. H., Kashgarian, M., Lorbeer, M. I. (1992) The effect of cyclosporine administration on the cellular distribution and content of cyclophilin. *Transplantation*, 53, 460-466
- Mitchison, T. J. and Sedar, J. W. (1983) Localization of antigenic determinants in whole *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* 99, 261-264
- Montague, J. W., Gaido, M. L., Frye, C., Cidlowski, J. A. (1994) a calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin – recombinant cyclophilins A, B, C have nuclease activity. *J. Biol. Chem.*, 269, 18877-18880
- Montague, J. W., Hughes, JR., F. M., Cidlowski, J. A. (1997) Native recombinant Cyclophilins A, B and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase Activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272, 6677-6684
- Morris, A.L., (1992) stereochemical quality of protein structure coordinates. *Prot. Struct. Funct. Genet.* 12. 345-364
- Mottus, R. , Sobel, R., Grigliatti, T. A. (2000) Mutational analysis of a histon deacetylase in *Drosophila melanogaster*: Missense mutations suppress gene silencing associated with position-effect variegation. *Genetics*, 154, 657-668
- Nassif, N., Penney, J., Paes, J., Engels, W. R., Gloor, G. B. (1994) Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol. Cell Biol.*, 14, 1613-1625

- Ner, S. S., Travers, A.A. (1994) HMG-D, the *Drosophila melanogaster* homologue of HMG1 protein, is associated with early embryonic chromatin in the absence of histon H1. EMBO J. 13, 1817-1822
- Okadome, T., Oeda, E., Saitoh, M., Ichijo, H., Moses, H. L., Miyazono, K., Kawabata, M... (1996) Characterisation of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor beta type I receptor *in vivo* J. Biol. Chem., 271, 21687-21690
- O'Keffe , M.P., Nedelkov, D., Bieber, A.L. Niemann, R.A., (1996) Evidence for isomerisation in myotoxin A from the prarie rattlesnake. Toxicon, 34, 417-434
- Ondek, B., Hardy, R. E., Baker, E. K., Stamnes, M. A., Shieh, B. H.,Zuker, C. S. (1992) Genetic dissection of Cyclophilin function, J. Biol. Chem., 267, 16460-16466
- Page, A. P., Winter, A.D. (1998) A divergent multi-domain Cyclophilin is highly conserved between parasitic and free living Nematode species and is important in larval muscle development. Molecular and Biochemical Parasitology 95, 215-227
- Pflügl, G., Kallen, J., Schirmer, T., Jansonius, J. N., Zurini, M. G. M., Walkinshaw, M. D. (1993) X-ray structure of a decameric cyclophilin cyclosporin crystal complex. Nature. 361, 91-94
- Phizicky, E. M., Fields, S. (1995) Protein-Protein interactions: methods for detection and analysis. Microbiol. Rev., 59, 94-123
- Pliyev, B.K., Gurvits, B. Ya (1999) Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerases: structures and functions. Biochemistry, 64, 883-898
- Price, E. R., Zydowsky, L. D., Jin, M., Baker, C. H., McKeon, F. D., Walsh, C. T. (1991) Human cyclophilin B: A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. Proc. Natl. Acad. Sci Usa 88, 1903-1907
- Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K., Fischer G. (1994) A novel peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase from Escherichia coli. FEBS Lett., 343, 65-69
- Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I. B., Pfanner, N., Tropschug, M. (1995) Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones hsp70 and hsp60. Mol. Cell. Biol., 15, 2654-2662
- Reimer, U., Schere, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M., Fischer, G. (1998) side chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerization. J. Mol. Biol., 432(3), 202-206
- Reuter, G., Spierer, P. (1992) Position effect variegation and chromatin protein. BioEssays, 14, 605-612
- Rippmann, J. F., Hobbie, S., Daiber, C., Guilliard, B, Bauer, M., Birk, J, Nar, H., Garin-Chesa, P., Rettig, W. J., Schnapp, A. (2000) Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin 1 is essential for tumor cell survival and entry in mitosis. Cell Growth Differ., 11, 409-416

- Rorth, P. (1996) A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. Proc. Natl. Sci. USA, 93, 12418-12422
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Lavery, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W., Cohen, S. M. (1998) Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. Development, 125, 1049-1057
- Rospert, S., Looser, R., Dubaquié, Y., Matouschek, A., Glick, B. S., Schatz, G. (1996) Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. EMBO J., 15, 764-774
- Rubin, G. M. and Spreadling, A.C. (1982) Vectors for P-element mediated gene transfer in *Drosophila*. Nucl. Acid. Res., 11, 6341-6351
- Rudolph, T., Lu, B., Westphal, T., Szidonya, J., Eissenberg, J., Reuter, G. (1999) New type of CyO and TM3 green balancers. Dros. Info. Serv. 72, 78-79
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K., Erlich, H. A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-489
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning- A Laboratory Manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger, F. S., Nicklen, S., Coulso, A. R. (1977) DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5462-5467
- Schellenberger, A. (1989) Enzymkatalyse, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg
- Schiene, C., Fischer, G. (2000) Enzymes that catalyze the restructuring of proteins. Current opinion in Structural Biology, 10, 40-45
- Schmid, F.X. (1993) Prolyl isomerase: Enzymatic catalyses of slow protein folding reactions. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22, 123-143
- Schmid, F.X., Mayr, L.M., Mücke, M., Schönbrunner (1993) Prolyl isomerases: role in protein folding. Adv. Protein Chem., 44, 25-66
- Schneuwly, S., Shortridge, R.D., Larrivee, D. C., Ona, T., Ozaki, M., Pak, W. L. (1998) *Drosophila* nina A gene encodes an eye specific cyclophil (cyclosporine A binding protein). Proc. Natl. Sci. USA, 86, 5390-5394
- Scholz, C., Peterson, A., Dietrich, B., Luckner, M. (1999) Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*. Sequences and Expression during embryogenesis and stress. J. Plant Physiol. 155, 212-219
- Schotta, G. and Reuter, G. (2000) Controlled expression of tagged proteins in *Drosophila* using a new modular P-element vector system. Mol. Gen. Genet., 262, 916-920
- Shieh, B. H., Stamnes, M. A., Seavello, S., Harris, G. L., Zuker, C. S. (1989) The ninaA gene required for visual transduction in *Drosophila* encodes a homologue of cyclosporine A-binding protein. Nature, 338, 67-70

Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong D. L., Qiuxia, G., Bao, S., Charng M. J., Mathews, L. M., Schneider, M. D., Hamilton, S. L., Matzuk, M. M. (1998) Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature*, 391, 489-492

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 78, 503-517

Spreadling, A. C., Rubin, G. M. (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*. 218, 341-347

Stamnes, M. A., Zuker, C. S. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, FK506-binding protein, ninaA : four of a kind. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2, 1104-1107

Stamnes, M. A., Shieh, B. H., Chuman, L., Harris, G. L., Zuker, C. S. (1991) The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila* rhodopsins. *Cell*, 65, 219-227

Stec, I., Wright, T. J., van Ommen, G. J. B., de Boer, P. A. J., van Haeringen, A., Moorman, A. F. M., Altherr, M. R., Den Dunnen, J. T. (1998) WHSC1, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a *Drosophila* dysmorphism gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Human Mol. Genet.*, 7, 1071-1082

Steiner, J. P., Hamilton, G.S., Ross, D.T. Valentine, H. L., Guo, H., Connolly, M. A., Liang, S., Ramsey, C., Li, J. H., Huang, W., Howorth, P., Soni, R., Fuller, M., Sauer, H., Nowotnik, A. C., Suzdak, P.D. (1997) Neutrotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 2019-2024

Steinmann, B., Bruckner, P., Superti-Furga, A. (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo*: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase. *J. Biol. Chem.*, 266, 1299-1303

Stryer, L. (1994) *Biochemie* neubearb. Auflage, Spektrum Akad. Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford

Tapparo, A., Kieffer, S., Cretin, F., Satre, M., Klein, G. (1999) The multigene immunophilin family of *Dictyostelium discoideum*. Characterization of microsomal and mitochondrial cyclophilin isoforms. *Biochemie* 81, 943-954

Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, c. T., Sodroski, J., Gottlinger, H.G. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, 372, 363-365

Theriault, Y., Logan, M. T., Meadows, R., Yu, P. L., Olejniczak, T. E., Holzman, F. T., Simmer, L. R., Fesik, W. S. (1993) Solution structure of the cyclosporine-A cyclophilin complex by NMR. *Nature*, 361, 88-91

Theurkauf, W. E. and Hawley, R. S. (1992) Meiotic spindle assembly in *Drosophila* females: behaviour of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein. *J. Cell Biol.* 166, 1167-1180

- Tower, J. G., Karpen, H., Craig, N., Spreadling A.C. (1993) Preferential transposition of *Drosophila* P-elements to nearby chromosomal sites. *Genetics*, 133, 347-359
- Trandhin, C.C., Pao, G. M., Saier Jr., M.H. (1992) Structural and evolutionary relationships among the immunophilins: two ubiquitous families of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases. *FASEB J.*, 6, 3410-3420
- Tschiersch, B., Hoffmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., Reuter, G. (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.*, 13, 3822-3831
- Vidal, M. und Gaber, R. F. (1991) RPD3 encodes a second Factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 11, 6317-6327
- Vidal, M., Strich, R., Esposito, R. E., Gaber, R. F. (1991) RPD1 (Sin3/UME4) is required for maximal activation and repression of diverse yeast genes. *Mol. Cell Biol.*, 11, 6306-6316
- Wang, T., Donahoe, P. K., Zervos, A. S., (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12, *Science*, 265, 674-676
- Wang, T., Li, B. Y., Danielson, P. D., Shah, P. C., Rockwell, S., Lechleider, R. J., Martin, J., Manganaro, T., Donahoe, P. K. (1996) The immunophilin FKBP 12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family Type I receptors. *Cell*, 86, 435-444
- Weinian Shou, Aghdasi, B., Armstrong D. L., Qiuxia, G., Bao, S., Charng M. J., Mathews, L. M., Schneider, M. D., Hamilton, S. L., Matzuk, M. M. (1998) Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature*, 391, 489-492
- Wetlaufer, D.B. (1985) Prolyl isomerization: how significant for *in vivo* protein folding. *Biopolymers*, 24, 251-255
- Wolffe, A. P. (1994) Regulation of chromatin structure and function. CRC Press, R. G. Landes Company Austin
- Wu, X., Wilcox, C. B., Devasahayam, G., Hackett, L., Arevalo-Rodriguez, M., Gardenas, M. E., Heitman, J., Hanes S. D. (2000) The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J.*, 19, 3727-3738
- Xiao, R. P., Valdivia, H. H., Bogdanov, K., Valdivia, C., Lakatta, E.G., Cheng, H. (1997) The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca²⁺ release channel closure in rat hearts. *J. Physiol.*, 500, 343-354
- Xiao, Z. Z., Kops, O., Werner, A., Pei-Jung, L., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G., Lu, K. P. (2000) Pin1-dependent Prolyl Isomerization regulates Dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular Cell*, 6, 873-883
- Xun Meng, Xiaojun Lu, Morris C. A., Keating, M. T. (1998) A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams Syndrome. *Genomics*, 52, 130-137

Yem, A. W., Tomasselli, A. G., Heinrikson, R. L., Zurcher-Neely, H., Ruff, V.A., Johnson, R. A., Deibel Jr., M. R. (1992) The hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP12 and FKBP13. *J. Biol. Chem.*, 267, 2868-2871

Zinsmaier, K. E., Eberle, K. K., Buchner, E., Walter, N., Benzner, S. (1994) Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*. *Science*. 263, 977-980

Zuker, C.S. (1996) The biology of vision in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 571-576

7. Anhang

cDNA	GAA	TTC	GGC	ACG	AGG	TCG	CTT	GAG	GAA	TAA	ACT	GAA	GCG	CTG	TGA	ATA	
CypB			9			18			27			36			45		
			M	K	L	F	L	S	V	F	V	V	A	L	V	A	G
TTT	AGA	ACG	ATG	AAG	CTG	TTC	TTA	TCC	GTT	TTC	GTG	GTA	GCC	CTG	GTG	GCC	GGC
		57			66			75			84			93			102
V	V	V	A	D	D	S	K	G	P	K	V	T	E	K	V	F	F
GTC	GTT	GTT	GCC	GAC	GAT	AGC	AAG	GGT	CCC	AAA	GTG	ACC	GAG	AAG	GTT	TTC	TTT
		11			120			129			138			147			156
D	I	T	I	G	G	E	P	A	G	R	I	E	I	G	L	F	G
GAC	ATC	ACC	ATT	GGC	GGC	GAG	CCC	GCT	GGC	CGC	ATC	GAG	ATC	GGT	CTG	TTC	GGC
		165			174			183			192			201			210
K	T	V	P	K	T	V	E	N	F	K	E	L	A	L	K	P	Q
AAG	ACG	GTG	CCC	AAG	ACG	GTG	GAG	AAC	TTC	AAG	GAG	CTG	GCG	CTG	AAG	CCG	CAG
		219			228			237			246			255			264
G	E	G	Y	K	G	S	K	F	H	R	I	I	K	D	F	M	I
GGC	GAG	GGC	TAC	AAG	GGC	AGC	AAG	TTC	CAC	CGC	ATC	ATC	AAG	GAC	TTC	ATG	ATC
		273			282			291			300			309			318
Q	G	G	D	F	T	K	G	D	G	T	G	G	R	S	I	Y	G
CAG	GGC	GGT	GAC	TTC	ACC	AAG	GGC	GAC	GGC	ACC	GGC	GGT	CGC	TCC	ATC	TAC	GGC
		327			336			345			354			363			372
E	R	F	E	D	E	N	F	K	L	K	H	Y	G	A	G	W	L
GAG	CGC	TTC	GAG	GAT	GAG	AAC	TTC	AAG	CTG	AAG	CAC	TAT	GGC	GCC	GGC	TGG	CTG
		381			390			399			408			417			426
S	M	A	N	A	G	K	D	T	N	G	S	Q	F	F	I	T	T
AGC	ATG	GCC	AAC	GCT	GGC	AAG	GAC	ACC	AAC	GGA	TCG	CAG	TTC	TTC	ATC	ACC	ACC
		435			444			453			462			471			480
K	Q	T	S	W	L	D	G	R	H	V	V	F	G	K	I	L	S
AAG	CAG	ACC	AGC	TGG	CTG	GAT	GGA	CGC	CAC	GTC	GTC	TTC	GGC	AAG	ATC	CTG	TCG
		489			498			507			516			525			534
G	M	N	V	V	R	Q	I	E	N	S	A	T	D	A	R	D	R
GGC	ATG	AAT	GTG	GTG	CGC	CAG	ATC	GAG	AAC	TCG	GCC	ACT	GAT	GCC	CGC	GAC	CGT
		543			552			561			570			579			588
P	V	K	D	V	V	I	A	N	S	G	T	L	P	V	S	E	A
CCC	GTC	AAG	GAT	GTG	GTC	ATC	GCC	AAC	AGC	GGC	ACC	CTG	CCC	GTT	TCG	GAG	GCC
		597			606			615			624			633			642

F	S	V	A	K	A	D	A	T	D	stop									
TTC	TCC	GTG	GCC	AAG	GCC	GAT	GCC	ACC	GAC	TAA	AGT	GTT	TGG	GGA	GCA	TGT	CAT		
		651			660			669			678			687			696		
CCA	TCA	GCA	ACA	TAA	CCG	ATT	TGA	ACT	AAG	CAT	AAA	CGC	ATA	ATC	GAT	TTT	TCC		
		705			714			723			732			741			750		
AGA	CAT	TTG	CAT	TTA	CCA	TAG	CTC	GCC	ATG	TTT	ATT	TAC	ATT	TCG	TTC	CGT	AAG		
		759			768			777			786			795			804		
CAA	GTA	ATT	GTG	CTC	AAC	TAA	AAA	CAG	AAA	TGG	CAT	AAA	TAA	AGA	ATG	ATT	TTT		
		813			822			831			840			849			858		
TGT	GTG	ATA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAC	TCG	AGC								
		867			876			885			894								

Abbildung 7.-1. DNA-Sequenz des cDNA-Klones 2 für das Cyclophilin B Homologe aus *Drosophila melanogaster* mit abgeleiteter Proteinsequenz.

CypB genomisch Annotated Sequence
Dienstag, 18. Juli 2000 19:54 Uhr

				MboI			
				Bsp143I			
				Sau3AI			
				XhoII			
	DraI			BamHI			ApaI
	↓	20	40	↓	60		↓ 80
CGTTTGTTTT	TAAAGCAGTC	AACATCTTTC	GGTGCGAAAT	GGCTCAGGAT	CCGAAACCAC	TTTACTTTGC	CGTGGGCCCC
			StyI				
		100	↓ 120		140		160
GGCCCCAACG	ACATTACGTG	TCCTTATTGC	AGGACCAAGG	CCAAGACCCG	TGTGGTGCCT	TCCTGGCTGC	GTTGCTGCAC
			RsaI				
		180	↓ 200		220		240
CAAGAGGCAT	CACTGCGGTG	CCTGCGGGGA	GTACCTGGGC	GTATACCGCC	GTCCACAAC	TTAGATACCC	ACTGAAGAAG
	Bsp143I						
	BamHI						
	MboI			MboI			
	XhoII			Bsp143I			
	Sau3AI			Sau3AI			
	↓	260	280	↓	300		320
GATCATCGGA	TCCGAATTAT	TATAACACAA	TGAACAAATG	TAGATCAGTT	TTGTCATTTA	ATTTATATTC	AATAATAATA
						RsaI	
		340	360		380	↓	400
ATAAATATAC	TGCTGTTTGA	AACGAATAAA	AGTTTACTAT	TTAATGTGTA	ATGCTCAAAA	TGTACTACTAT	ACTTTTTTACA
	RsaI						
	↓	420	440		460		480
CTGTACATCC	AATGGCATT	GTAACGCAGA	GAGAATAACT	CATTTGATTT	CCATGCACTA	ACTTAATTAC	CAGACCAACG
					Bsp143I	Bsp143I	
					MboI	MboI	
					Sau3AI	Sau3AI	
		500	520		↓ 540	↓	560
CCTCGGTAA	GAGAAATCGG	GAGAGTGAT	CTGATTTTGA	TTTTCCCTCC	CATGATCTCT	CCAAATTTGA	TCCATCTTTC
						↑	
						Primer CypB Xba	
		580	600		620		640
AGTCACCGAT	CGTTCTCGCT	GGAACCTCGCA	TCATGACCGT	GGACGAACCG	CAGATTGTGG	CCATCATTGT	CAGCCACAAG

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

				XhoI			
				Bsp143I			
				MboI			
				BamHI			
				Sau3AI			
	660		↓ 680		700		720
CCACAAGTGG	GATACCTGAA	GGAGGAGCCC	ACCTGGATCC	GTTGTCCTTC	GTGTGAGAAG	TCTGGAACCA	GTTTGGTGCA
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
		PstI				HindIII	
	740	↓	760		780	↓	800
ACTGGAGTTG	GTCACCTGCC	TGCAGAGATT	TCTGGGATTC	ACAAAACTTT	GGTTGGCCAT	CTGCATGAAG	CTTTATAAAT
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
	820		840		860		880
CTTTCGTAAT	GTTCACTTTA	TTTCAGTAAA	AAATGGTCTG	GCCGCCAGGA	CATCAATCAC	TATTGTTTAC	ACTGCGGTTG
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
		PvuII					
	900	↓	920		940		960
CTTCATTGGA	AGATTTGTGC	CCATCAGCTG	CATGGAACGA	TGCATTTCTGA	GATCAGCCCC	TAAACAGGCG	GCCGTGGATG
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
	980		1000		1020		1040
ATATGACCCT	GAAGACACGA	CCCAAGGATT	GCGCTGAAAG	GGCCCAGAAA	TCCAGGGAGA	AAGTTCTGGC	CAGCAGGGAG
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
		StyI			RsaI		
	1060	↓	1080		↓		1120
AAGAAGAGAG	CAGAGAAGGC	AGCCAAGGAT	ATGGACAAAT	CTCAGACGCA	AATAGCAGTA	CACCAATAAA	TAAAAGCATA
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
		RsaI					
	1140	↓	1160		1180		1200
TTTTTTTACT	TACTTTTTGT	GTACAGAACC	CTCAATAAAA	CAAGAGAGAA	TGCTACGTGC	TAATGCAAAC	TGGAATTCTA
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
	1220		1240		1260		1280
ATCCCTAAAA	TATTAATAAC	TATACCAATA	AAGTCAACTC	TTCGAACTTA	CTTTGTTTCT	TCGTACGAAA	ACCTTAACTT
_____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____							
				BclI			
				Bsp143I			
				MboI			
				Sau3AI		TaqI	
	1300		1320	↓	1340	↓	1360
ATGCTTTTCGG	CGTATTAACT	ATTTGAATTT	GAATTTTCCG	CCCGAATGTG	TGATCATCAG	ACATCGTCAT	CGAATGGTCA

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

```

          ClaI                               ClaI
          TaqI   TaqI                       TaqI
          ↓     ↓                             ↓
CACCTTAAGCA TCGATATTTT GACAAAAACA TAAAAAACGA TGGAAAACAT CGATTGGCGA TGCAACAAAG TTTTCTTACA
    
```

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

Rest P(EP) Insertion 5' (neben Deletion)

CATGATGAAATAACATAAGGTGGTCCCCGTCGATAGCCGAAGCTTACCGAAGTATACACTTAAATTCAGTGCACGTTTGCTT

P(EP) Insertion 2294

```

          -                               AatII
          1460   -   -   1480           ↓           1500           1520
TCACTAACAG AAACCGAAAA TTCAGTCGTG AAATATCCAT TGGCGACGTC GCTTGAGGAA TAAACTGAAG CGCTGTGAAT
    
```

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

Deletion Linie 11/5/1

```

          1540                               1560                               1580           MspI
          ↓                               ↓                               ↓
ATTTAGAACG ATG AAG CTG TTC TTA TCC GTT TTC GTG GTA GCC CTG GTG GCC GGC GTC GTT GTT GCC GAC GAT
          M   K   L   F   L   S   V   F   V   V   A   L   V   A   G   V   V   V   A   D   D
          ***** 1. Exon *****
    
```

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

Deletion Linie 11/5/1

```

          1600                               1620           StyI           1640                               1660           RsaI
          ↓                               ↓                               ↓
AGC AAG GGT CCC AAA GTG ACC GAG AAG GTGCGTGCTC CTTGGACTTT CGTCCTTACA TTCTGCATAC ACCACGTACA
          S   K   G   P   K   V   T   E   K
          ***** 1. Exon *****
    
```

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

Deletion Linie 11/5/1

```

          1680                               1700                               1720                               1740
TACACACACA AACACACACA CACATTTGCT GCGCCATAAA TCAAGTGAGA TGAATGTTA ATAATAAACC GCTTCCGATT
    
```

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

Deletion Linie 11/5/1

```

          1760                               1780           Mbo           Primer Cy down
          ↓                               ↓           Sau3AI           ↓
          ↓                               ↓           TaqI   Bsp143I           ↓
          ↓                               ↓           ↓           ↓           ↓
GCGTAG GTT TTC TTT GAC ATC ACC ATT GGC GGC GAG CCC GCT GGT CGC ATC GAG ATC GGT CTG TTC GGC AAG
          V   F   F   D   I   T   I   G   G   E   P   A   G   R   I   E   I   G   L   F   G   K
          ***** 2. Exon *****
    
```

2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment

Deletion Linie 11/5/1

1840 1860 1880
 ACG GTG CCC AAG ACG GTG GAG AAC TTC AAG GAG CTG GCG CTG AAG CCG CAG GGC GAG GG GTGAGTTAGG
 T V P K T V E N F K E L A L K P Q G E G
 ***** 2. Exon *****
 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

RsaI RsaI RsaI KpnI
 ↓ ↓ ↓ ↓
 1920 1940 1960
 GTACTTGAGT ACCGAAAATA CCCCAACATA GTAGGGTGCC AGGTACCGCT AGGCCAGCAA AAGATGCCGC TAATCAGCGG
 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

1980 2000 2020 2040
 CACTTTGTAG GTTATAGCGG GGCTCTCAGA TTGAAGCAAT TACGTGGCGT TTGAGCGGCC AATCGCATAC ATCAGTTGAC
 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

2060 2080 2100 2120
 AAAGCGGCAC TAATGGGTTA ACAAGAACG CCAACTGTTA TTAAGTCTAC CATACTATAA AAGTGCAGTT CTTGGGTATT
 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

NsiI TaqI DraI DraI
 ↓ ↓ ↓ ↓
 2140 2160 2180 2200
 TCTTTTTTCT TCTCTGAATT TATAAGTATG CATGTTCTTT TTTGGTTAGG TTTCGAGTTC TAAACCCAGT TTTTTTTTAA
 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

2220 2240 2260 2280
 ATTTAAATTC CCATGCTGAC AAAACTGACC ATCATGCAAC GCTCTTATAC CCCGCAGC TAC AAG GGC AGC AAG TTC
 Y K G S K F

 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

Bsp143I MboI Sau3AI StyI MspI
 ↓ ↓ ↓ ↓
 2300 2320 2340
 CAC CGC ATC ATC AAG GAC TTC ATG ATC CAG GGC GGT GAC TTC ACC AAG GGC GAC GGC ACC GGC GGT CGC
 H R I I K D F M I Q G G D F T K G D G T G G R
 ***** 3. Exon *****
 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

TaqI MspI
 ↓ ↓
 2360 2380 2400 2420
 TCC ATC TAC GGC GAG CGC TTC GAG GAT GAG AAC TTC AAG CTG AAG CAC TAT GGC GCC GGC TGG CTG AGC
 S I Y G E R F E D E N F K L K H Y G A G W L S
 ***** 3. Exon *****
 _____ 2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment _____

```

                Bsp143I
                Sau3AI
                MboI
                PvuII
                2440          ↓          2460          2480          ↓
ATG GCC AAC GCT GGC AAG GAC ACC AAC GGA TCG CAG TTC TTC ATC ACC ACC AAG CAG ACC AGC TGG CTG
M  A  N  A  G  K  D  T  N  G  S  Q  F  F  I  T  T  K  Q  T  S  W  L
***** 3. Exon *****
_____2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment_____

                Sau3AI
                XhoII
                Bsp143I
                MboI
                2500          ↓          2540          Sau3AI  TaqI          2560
GAT GGA CGC CAC GTC GTC TTC GGC AAG ATC CTG TCG GGC ATG AAT GTG GTG CGC CAG ATC GAG AAC TCG
D  G  R  H  V  V  F  G  K  I  L  S  G  M  N  V  V  R  Q  I  E  N  S
***** 3. Exon *****
_____2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment_____

                2580          2600          2620
GCC ACT GAT GCC CGC GAC CGT CCC GTC AAG GAT GTG GTC ATC GCC AAC AGC GGC ACC CTG CCC GTT TCG
A  T  D  A  R  D  R  P  V  K  D  V  V  I  A  N  S  G  T  L  P  V  S
***** 3. Exon *****
_____2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment_____

                StyI
                2640          ↓          2660          2680          2700
GAG GCC TTC TCC GTG GCC AAG GCC GAT GCC ACC GAC TAA          AGTGTTTGGG  GAGCATGTCA  TCCATCAGCA
E  A  F  S  V  A  K  A  D  A  T  D  stop
***** 3. Exon *****
_____2,0 kb XbaI/NotI Rescue-Fragment_____

                TaqI
                ClaI
                2720          ↓ 2740          2760          2780
ACATAACCGA  TTTGAACTAA  GCATAAACGC  ATAATCGATT  TTTCCAGACA  TTTGCATTTA  CCATAGCTCG  CCATGTTTAT

                2800          2820          2840          2860
TTACATTTTCG  TTCCGTAAGC  AAGTAATTGT  GCTCAACTAA  AAACAGAAAT  GGCATAAATA  AAGAATGATT  TTTTGTGTGA

                MspI
                2880          ↓          2920          MspI          2940
TAAAGAGCTG  GAATCGTTCT  GTGTGTCTAT  ACCATGATGC  CGGTGGTGTG  CAGGTTCAAT  GAACCGGTTT  TGGTCCATC

                MspI
                2960          ↓ 2980          3000          3020
GCTTCTTTT  GGCTCTGACT  TCCCTTAGTG  GCAACCGGTT  TGTGCCTTCT  TCGCCAATTT  GTTGCCTTT  GTATGTTGTG
                TaqI
                ↓          3040          3060          3080          3100

```

```
CCGTTCTCGA  TTTAGATTGC  CCATGTTCTG  TCTGTTTTTT  CTCTTTGTTG  TTGATAAACA  ACGCTCGGTT  CGTCACATTT

                               3120                               3140                               3160                               3180
TTCTGATTTG  CACACTTGCG  ACAAATTAAT  GAACACACAG  ACGAGTTCAT  TTGTATATTT  ATTCAGTTTG  TTTGGGCCTG

                               3230                               3220                               PstI                               3240
CTGGGAACTA  ATTGTATATG  ATTGAATGAA  CAGGTGCATG  ACTGTCTCTG  CAGAAGTTAA
                               ↓
```

Abbildung 7.-2. DNA-Sequenz der genomischen Region des Cyclophilin B Homologen aus *D. melanogaster* mit abgeleiteter Exon/Intron Struktur, eingezeichneter Defizienz, der P(EP)-Insertion 2294 und ausgewählter Restriktasen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Fischer für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung und Förderung der Arbeit, sowie die fachlichen Diskussionen.

Ich danke Herrn Dr. G. Küllertz für die Betreuung der Arbeit und die Unterstützung, insbesondere der proteinbiochemischen Arbeiten.

Steffen Kiessig danke ich für die Untersuchungen der Protein-Protein Interaktionen mit Hilfe des bereitgestellten CypB Fusionsproteins und nativer Gelelektrophorese.

Bei Prof. Dr. G. Reuter möchte ich mich ganz herzlich bedanken, da er mir die Möglichkeit gab in seinem Institut alle genetischen Arbeiten durchführen zu können. Weiterhin danke ich ihm für die ständige Diskussionsbereitschaft und für das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Für viele Anregungen und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der molekularen Arbeiten möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Dorn bedanken.

Bei Andreas Fischer bedanke ich mich für die Überlassung des pJG4-5 Plasmides.

Ganz besonders möchte ich mich bei Thomas für die Geduld und die Hilfestellung bei der Bewältigung der genetischen Experimente bedanken.

Dr. T. Westphal danke ich ebenfalls für seine ständige Diskussionsbereitschaft in genetischen Fragestellungen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Max-Planck-Gesellschaft „Enzymologie der Proteinfaltung“ und allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik der MLU Halle für die harmonische Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immerfort unterstützt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Halle Saale, den 31. 03. 2001

Jana Reißmann

Lebenslauf

Name: Jana Reißmann

geboren am 04.07.1973 in Halle

Familienstand: ledig

Mutter: Bärbel Reißmann (Diplomphysikerin)

Vater: Peter Reißmann (Diplomchemiker)

Bruder: Stefan Reißmann (Chemie-Student)

schulischer Werdegang

1980-1990 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule, 21. POS in Halle-Neustadt

1990-1992 Erweiterte Oberschule, ab 1991 Landesgymnasium August-Hermann-Francke in Halle

Oktober 1992-September 1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Diplomarbeit wurde am Institut für Mikrobiologie angefertigt und mit dem Prädikat gut beendet.

September 1997-September 2000 Doktorand in der Arbeitsgruppe „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft. Anfertigung der Promotionsschrift zum Thema „Molekulare und genetische Charakterisierung eines Cyclophilin Homologen aus *Drosophila melanogaster*“

Seit Oktober 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-Universität