

**CHARAKTERISIERUNG MOLEKULARER UND GENETISCHER
INTERAKTIONEN VON RASGAP IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*:
UNTERSUCHUNGEN ZUR NEURODEGENERATIONSMUTANTE VAP**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
MONIKA MÜGSCHL
AUS LEOBEN/ STEIERMARK

2008

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Mai 2008.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2008

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. med. Rosemarie Baumann	(Vorsitzende)
	Prof. Dr. Stephan Schneuwly	(1. Gutachter)
	Prof. Dr. Charlotte Förster	(2. Gutachterin)
	Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann	(3. Prüfer)

Der Weg ist das Ziel.

Konfuzius

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> als Modell für neurodegenerative Erkrankungen des Menschen.....	12
1.1.1. Neurodegenerative Erkrankungen des Menschen	12
1.1.1.1. Definition und Charakterisierung neurodegenerativer Erkrankungen.....	12
1.1.1.2. Häufigkeit neurodegenerativer Erkrankungen	12
1.1.2. Modellsysteme für Neurodegeneration.....	13
1.1.2.1. Identifizierung geeigneter Modellsysteme	13
1.1.2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellsystem	13
1.1.3. Modelle menschlicher neurodegenerativer Erkrankungen in <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.1.3.1. Mit Hilfe von <i>Reverse Genetics</i> erzeugte Modelle.....	14
1.1.3.2. Durch Expression dominanter Konstrukte entstandene Modelle.....	14
1.1.3.3. Unter Verwendung der klassischen <i>Forward Genetics</i> geschaffene Modelle	15
1.2. Die <i>Drosophila vap</i> Mutante und RasGAP	17
1.2.1. Die <i>vap</i> Mutante.....	17
1.2.1.1. Phänotypen.....	17
1.2.1.2. Allele.....	18
1.2.2. Das RasGAP Protein.....	19
1.2.2.1. Katalytische Aktivität und Expressionsmuster von <i>Drosophila</i> RasGAP	19
1.2.2.2. Struktur und Funktion von RasGAP.....	20
1.2.2.3. Interaktionspartner von RasGAP	22
1.2.2.4. Funktionen des N-terminalen Teils von RasGAP	24
1.3. RasGAP, Apoptose und Autophagie.....	25
1.3.1. RasGAP und Apoptose.....	25
1.3.1.1. Programmierter Zelltod durch Apoptose.....	25
1.3.1.2. RasGAP als Sensor für Caspase-Aktivität.....	25
1.3.2. RasGAP und Autophagie	26
1.3.2.1. Ablauf und molekulare Mechanismen der Autophagie	26
1.3.2.2. Regulation der Autophagie	27
1.3.2.3. Autophagie und Neurodegeneration.....	29
1.3.2.4. Autophagischer Zelltod.....	30
1.3.2.5. Mögliche Funktionen von RasGAP im Zusammenhang mit Autophagie	31

1.4.	Systeme zur Untersuchung von molekularen und genetischen Interaktionen.....	33
1.4.1.	Yeast Two Hybrid Screen zur Untersuchung molekularer Protein/Protein Interaktionen.....	33
1.4.2.	<i>UAS/GAL4</i> System zur Untersuchung genetischer Interaktionen durch Beeinflussung der Gendosis.....	35
1.5.	Zielsetzung der vorliegenden Dissertation.....	36

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1.	Materialien.....	38
2.1.1.	Enzyme, Standards, Kits, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	38
2.1.1.1.	Enzyme, Standards und Kits	38
2.1.1.2.	Chemikalien	38
2.1.1.3.	Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.1.4.	Geräte.....	39
2.1.2.	Puffer, Lösungen und Medien.....	40
2.1.2.1.	Puffer und Lösungen	40
2.1.2.2.	Medien	41
2.1.3.	Software	42
2.1.3.1.	Allgemeine Software.....	42
2.1.3.2.	Spezielle Programme	42
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	43
2.2.1.	Isolierung von DNA oder RNA aus <i>D. melanogaster</i>	43
2.2.1.1.	Isolierung von Einzelfliegen-DNA aus <i>D. melanogaster</i>	43
2.2.1.2.	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>D. melanogaster</i>	43
2.2.1.3.	Bestimmung von Konzentration und Reinheit von RNA	43
2.2.2.	Reverse Transkription, PCR und Genexpressionsanalyse	44
2.2.2.1.	DNase-Verdau und Reverse Transkription von RNA	44
2.2.2.2.	PCR	44
2.2.2.3.	Semi-quantitative RT-PCR zur Genexpressionsanalyse	44

2.2.3. Klonierung und Sequenzierung	45
2.2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
2.2.3.2. Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	46
2.2.3.3. Agarosegel-Elektrophorese und Gelextraktion	47
2.2.3.4. Herstellung von Insert-DNA und Ligation	47
2.2.3.5. Transformation von <i>E. coli</i>	48
2.2.3.6. Glycerolstocks von Bakterien-Kulturen	49
2.2.3.7. DNA-Sequenzierung	49
2.2.4. Yeast Two Hybrid Screen	49
2.2.4.1. Amplifizierung der Bibliothek	49
2.2.4.2. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	50
2.2.4.3. Interaktionstests	51
2.2.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> und Retransformation	54
2.2.4.5. Glycerolstocks von Hefe-Kulturen	54
2.3. Organismische Methoden	55
2.3.1. Keimbahntransformation von <i>D. melanogaster</i>	55
2.3.1.1. Injektion	55
2.3.1.2. Etablierung stabiler Linien	55
2.3.2. Fliegenhaltung und –kreuzungen	56
2.3.2.1. Fliegenhaltung	56
2.3.2.2. Kreuzungen	58
2.3.3. Versuche zu Lebenserwartung und Verhalten	58
2.3.3.1. Alterungsversuche	58
2.3.3.2. Phototaxis	58
2.4. Histologische Methoden	59
2.4.1. Paraffinschnitte und Quantifizierung der Neurodegeneration	59
2.4.1.1. Paraffinschnitte	59
2.4.1.2. Mikroskopie und Quantifizierung der Neurodegeneration	59
2.4.2. Semidünnschnitte und Toluidinblau-Färbungen	60
2.4.2.1. Semidünnschnitte	60
2.4.2.2. Toluidinblau-Färbungen und Mikroskopie	60
2.4.3. Ultradünnschnitte und Elektronenmikroskopie	61
2.4.3.1. Ultradünnschnitte	61
2.4.3.2. Kontrastierung und Mikroskopie	61

3. ERGEBNISSE

3.1. Funktionelle Analyse von <i>Drosophila</i> RasGAP	63
3.1.1. Letalität der ubiquitären <i>RasGAP</i> Überexpression.....	63
3.1.1.1. Zeitpunkt der Letalität	63
3.1.1.2. Einfluss der verschiedenen Domänen von <i>RasGAP</i> auf die Letalität.....	64
3.1.2. Einfluss der verschiedenen Domänen von <i>RasGAP</i> auf den Phototaxis-Phänotyp.....	65
3.1.3. Einfluss der verschiedenen Domänen von <i>RasGAP</i> auf den Neurodegenerations-Phänotyp.....	67
3.2. Untersuchung molekularer Interaktionen von <i>Drosophila</i> <i>RasGAP</i> mittels Yeast Two Hybrid Screen	70
3.2.1. Das ProQuest™ Two Hybrid System	70
3.2.2. Vorbereitungen.....	72
3.2.2.1. Charakterisierung der verwendeten Bibliothek	72
3.2.2.2. Herstellung der Köder-Plasmide	72
3.2.2.3. Validierung des verwendeten Systems.....	72
3.2.2.4. Bestimmung der 3AT Konzentration.....	73
3.2.3. Yeast Two Hybrid Screens mit <i>Drosophila</i> <i>RasGAP</i> und mit der SH3 Domäne aus <i>Drosophila</i> <i>RasGAP</i>	74
3.2.3.1. Transformation.....	74
3.2.3.2. Masterplatte	74
3.2.3.3. Interaktionstests.....	74
3.2.3.4. Ergebnisse der Yeast Two Hybrid Screens	76
3.3. Analyse genetischer Interaktionen von <i>RasGAP</i> mit <i>Crk</i>	78
3.3.1. Herstellung von <i>UAS-Crk</i> und <i>UAS-Crk-RNAi</i> Fliegenlinien.....	78
3.3.1.1. Beeinflussung des Gleichgewichts der Expression von <i>RasGAP</i> und <i>Crk</i>	78
3.3.1.2. Klonierung der Konstrukte	78
3.3.1.3. Keimbahntransformation und Etablierung stabiler Linien	79
3.3.2. Überprüfung der Funktionalität der Konstrukte.....	80
3.3.2.1. Nachweis der Überexpression von <i>Crk</i> mittels semi-quantitativer RT-PCR	80
3.3.2.2. Nachweis der Funktionalität von <i>UAS-Crk-RNAi</i> : der <i>bent tibia</i> Phänotyp	81
3.3.3. Auswirkungen der Überexpression der <i>Crk</i> Konstrukte mit Hilfe verschiedener Treiber	82
3.3.4. Beeinflussung des <i>vap</i> ² Neurodegenerations-Phänotyps durch Überexpression der <i>Crk</i> Konstrukte mit Hilfe neuronaler Treiber.....	83

3.4.	RasGAP und Apoptose: der N-terminale Teil von RasGAP als möglicher genereller Überlebensfaktor	86
3.4.1.	Apoptose in <i>Drosophila melanogaster</i>	86
3.4.1.1.	Anti-apoptotische Funktion von Fragment N und Induktion von Apoptose in <i>Drosophila melanogaster</i>	86
3.4.1.2.	Modellsysteme zur Untersuchung von Apoptose in Auge und Flügel der Fliege .	86
3.4.2.	Versuch der Rettung durch Expression des N-terminalen Teils von RasGAP	87
3.5.	RasGAP und Autophagie: Genetische Interaktionen von RasGAP mit PI3K/Akt/TOR und S6K.....	88
3.5.1.	Beeinflussung der Aktivität von PI3K, Akt, TOR und S6K.....	88
3.5.2.	Genetische Interaktion von RasGAP mit PI3K.....	89
3.5.3.	Genetische Interaktion von RasGAP mit Akt.....	92
3.5.4.	Genetische Interaktion von RasGAP mit TOR.....	94
3.5.5.	Genetische Interaktion von RasGAP mit S6K.....	95
3.6.	RasGAP und Autophagie: Genetische Interaktion von <i>vap</i> ¹ mit <i>car</i> ¹	97
3.6.1.	Entfernung der <i>car</i> ¹ Mutation aus dem <i>vap</i> ¹ Hintergrund durch Rekombinationskreuzung.....	97
3.6.2.	Einfluss der <i>car</i> ¹ Mutation auf die Lebensspanne von <i>vap</i> ¹	98
3.6.3.	Einfluss der <i>car</i> ¹ Mutation auf den Neurodegenerations-Phänotyp von <i>vap</i> ¹	99
3.6.4.	Einfluss der <i>car</i> ¹ Mutation auf die Anhäufung autophagischer Vakuolen in <i>vap</i> ¹	100

4. DISKUSSION

4.1.	Funktionelle Analyse von <i>Drosophila</i> RasGAP	104
4.1.1.	Letalität der ubiquitären <i>RasGAP</i> Überexpression.....	104
4.1.2.	Einfluss der verschiedenen Domänen von <i>RasGAP</i> auf Phototaxis- und Neurodegenerations-Phänotyp.....	105
4.2.	Untersuchung molekularer Interaktionen von <i>Drosophila</i> <i>RasGAP</i> mittels Yeast Two Hybrid Screen	107
4.2.1.	Verwendetes System und Köder-Vektoren	107
4.2.2.	Systemprobleme.....	108
4.2.3.	Spezifische Schwierigkeiten	110
4.3.	Analyse genetischer Interaktionen von <i>RasGAP</i> mit <i>Crk</i>	111
4.3.1.	Mögliche Bedeutung des Gleichgewichts der Expression von <i>RasGAP</i> und <i>Crk</i>	111
4.3.2.	Auswirkungen der Überexpression von <i>UAS-Crk</i>	111
4.3.3.	Auswirkungen der Expression von <i>UAS-Crk-RNAi</i>	112
4.4.	<i>RasGAP</i> und Apoptose: der N-terminale Teil von <i>RasGAP</i> als möglicher genereller Überlebensfaktor	114
4.4.1.	Induktion von Apoptose in <i>Drosophila melanogaster</i> und Untersuchung des Einflusses von „Fragment N“	114
4.4.2.	Unterschiedliche Rollen von <i>RasGAP</i> im Zusammenhang mit der Apoptose in <i>Drosophila melanogaster</i> und Säugern	115
4.5.	<i>RasGAP</i> und Autophagie: Genetische Interaktionen von <i>RasGAP</i> mit <i>PI3K/Akt/TOR</i> und <i>S6K</i>	117
4.5.1.	Zusammenhänge zwischen <i>RasGAP</i> und Akt.....	117
4.5.2.	Zusammenhänge zwischen <i>RasGAP</i> und weiteren Elementen des Signalweges.....	119
4.6.	<i>RasGAP</i> und Autophagie: Genetische Interaktion von <i>vap</i> ¹ mit <i>car</i> ¹	120
4.7.	<i>RasGAP</i> und Autophagie: Allgemeine Zusammenhänge ..	121

5. ZUSAMMENFASSUNG	123
ANHANG	126
LITERATURVERZEICHNIS	130
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	138
DANKSAGUNG	
ERKLÄRUNG	

1.1. *Drosophila melanogaster* als Modell für neurodegenerative Erkrankungen des Menschen

1.1.1. Neurodegenerative Erkrankungen des Menschen

1.1.1.1. Definition und Charakterisierung neurodegenerativer Erkrankungen

Laut Definition der *Medical Subject Heading-Datenbank* der *United States National Library of Medicine* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) handelt es sich bei neurodegenerativen Erkrankungen um erbliche und sporadisch auftretende Erkrankungen, die durch fortschreitende Dysfunktion des Nervensystems gekennzeichnet sind. Diese Störungen gehen oft mit einer Atrophie der betroffenen Strukturen des zentralen oder peripheren Nervensystems einher. Bekannte Beispiele sind unter anderem amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Chorea Huntington, Friedreich-Ataxie, Parkinson- und Alzheimer-Krankheit.

Meist treten diese Krankheiten in höherem Lebensalter auf, und mit Andauern der Erkrankung verschlechtern sich die Symptome wie Bewegungs- und Verhaltensstörungen, kognitive Schwierigkeiten bis hin zur Persönlichkeitsveränderung. Die Krankheiten sind bislang nicht heilbar und führen schließlich zum frühzeitigen Tod der Patienten (Mutsuddi & Nambu, 1998).

1.1.1.2. Häufigkeit neurodegenerativer Erkrankungen

Durch ständige Fortschritte in der medizinischen Forschung und Verbesserung der Lebensumstände steigt die durchschnittliche Lebenserwartung in Deutschland kontinuierlich: betrug sie zu Beginn des letzten Jahrhundert ungefähr 40 Jahre, so liegt sie hundert Jahre später bei etwa 80 Jahren. Vorausberechnungen des Statistischen Bundesamts zufolge wird im Jahr 2050 jeder dritte Deutsche über 65 Jahre alt sein, die Zahl der Mitbürger über 80 wird sich von derzeit knapp vier Millionen auf zehn Millionen Menschen erhöhen (Eisenmenger *et al.*, 2006).

Mit der zunehmenden Lebenserwartung steigt aber auch die Zahl derer, die an altersabhängigen Erkrankungen leiden. Beispielsweise leben im Moment in Deutschland circa eine Million Menschen mit einer Demenzerkrankung, im Jahr 2050 wird die Zahl doppelt so hoch liegen; bei zwei Dritteln der Fälle handelt es sich um eine Alzheimer-Erkrankung (Robert-Koch-Institut, 2006). Mit dem vermehrten Auftreten dieser Erkrankungen verbunden sind eine sinkende Lebensqualität für den Einzelnen ebenso wie steigende Kosten für die Allgemeinheit. Die Untersuchung der zugrunde liegenden Vorgänge und die Entwicklung effektiver Therapien sind deshalb besonders wichtig.

1.1.2. Modellsysteme für Neurodegeneration

1.1.2.1. Identifizierung geeigneter Modellsysteme

Das Fehlen nicht-invasiver neurobiologischer Techniken, die progressive Natur der neurodegenerativen Krankheiten und die Komplexität des Nervensystems stellen jedoch große Schwierigkeiten bei der Untersuchung der menschlichen Erkrankungen dar (Übersichtsartikel Celotto & Palladino, 2005). Deshalb ist die Verwendung geeigneter Modellsysteme entscheidend für den wissenschaftlichen Fortschritt auf diesem Gebiet.

Oft werden im Zusammenhang der neurodegenerativen Erkrankungen vor allem durch genetische Manipulation entstandene Modelle verwendet. Zwar überwiegt die Anzahl der sporadischen Fälle häufig die der erblichen Formen; dennoch kann die Untersuchung dieser selteneren, aber für genetische Manipulationen zugänglichen Fälle wichtige Hinweise auf die allgemeinen pathophysiologischen Ursachen der Neurodegeneration, mögliche beeinflussende Faktoren und Ansatzpunkte für die Entwicklung von Therapien liefern. Ein Modellsystem muss dabei zum einen experimentell leicht zugänglich sein, zum anderen sollten grundlegende Mechanismen nach einem ähnlichen Muster ablaufen wie im Menschen, um eine spätere Übertragbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Zell-basierte Systeme sind experimentell verhältnismäßig leicht zu manipulieren, so dass sich zelluläre Aspekte der Erkrankungen relativ einfach untersuchen lassen. Allerdings kann hier nicht die Reaktion eines gesamten Organismus vollständig rekapituliert werden; oft ist jedoch gerade diese entscheidend. In Säugetier Modellsystemen wie der Maus steht natürlich die Möglichkeit der Analyse *in vivo* offen und die Ähnlichkeiten zum menschlichen Gehirn sind groß; allerdings erfordern Untersuchungen in diesen Systemen viel Zeit und Geld (Übersichtsartikel Marsh & Thompson, 2006).

1.1.2.2. *Drosophila melanogaster* als Modellsystem

Dahingegen kann die schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster* trotz der unbestritten vorliegenden physiologischen Unterschiede als ideales Modellsystem verstanden werden: sie hat eine kurze Generations- und Lebenszeit, produziert zahlreiche Nachkommen und kann einfach und kostengünstig gehalten werden. Sie besitzt jedoch auch ein komplexes Gehirn, das in vielerlei Hinsicht dem des Menschen ähnlich und zu Lernen, Gedächtnis und komplexen Verhaltensabläufen fähig ist (Übersichtsartikel Marsh & Thompson, 2006; Übersichtsartikel Celotto & Palladino, 2005). Die Signalwege sind stark konserviert, und für etwa drei Viertel der Gene, die im Menschen für bestimmte Krankheiten verantwortlich gemacht werden, existiert in der Fliege ein orthologes (Reiter *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind genetische und molekulare Methoden für Experimente an der Taufliege gut etabliert, ihre Anatomie und Entwicklung sind genauestens beschrieben; das Genom ist vollständig sequenziert, verhältnismäßig klein und weist eine

geringe Redundanz auf, so dass es relativ einfach ist, transgene Tiere zu erzeugen und Mutagenese-Screens im großen Maßstab durchzuführen (Übersichtsartikel Kretzschmar, 2005). Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren oftmals die Taufliege für Untersuchungen über neurodegenerative Erkrankungen des Menschen verwendet. Zur Schaffung von Modellen für menschliche Krankheiten in der Taufliege gibt es verschiedene Möglichkeiten, die im Folgenden erläutert werden sollen.

1.1.3. Modelle menschlicher neurodegenerativer Erkrankungen in *Drosophila melanogaster*

1.1.3.1. Mit Hilfe von *Reverse Genetics* erzeugte Modelle

In einigen Fällen ist das krankheitsverursachende Gen aus dem Menschen bekannt; durch Erzeugung beziehungsweise Identifizierung einer entsprechenden Mutation im Fliegen genom und Analyse der Folgen kann die menschliche Erkrankung näher charakterisiert werden.

Diese Herangehensweise wurde zum Beispiel angewendet, um die Ursachen einer autosomal-rezessiv erblichen Form der Parkinson-Erkrankung in der Fliege nachzubilden, die durch *loss of function* Mutation im *parkin* Gen entsteht (Kitada *et al.*, 1998). Die *Berkeley Drosophila Genome Projekt Database* (BDGPD) wurde nach einem Orthologen dieses Gens durchsucht und mittels P-Element-Mutagenese wurden anschließend Nullallele erzeugt. Die so entstandenen Fliegenstämme zeigten der menschlichen Erkrankung ähnliche Symptome, unter anderem eine Verkürzung der Lebensspanne, lokomotorische Defekte und Degeneration von Motorneuronen (Greene *et al.*, 2003). Durch Untersuchung der Fliegen konnte zusammen mit anderen Studien ein zugrunde liegender pathogener Signalweg, der die Integrität der Mitochondrien beeinflusst, identifiziert werden; dieser Weg könnte möglicherweise einen vielversprechenden Ansatzpunkt für Therapien darstellen (Übersichtsartikel Marsh & Thompson, 2006). Auf ähnliche Weise entstand auch ein Modell für eine erbliche Form der ALS, deren Grund eine Mutation im Gen für die Superoxiddismutase ist (Deng *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1995).

1.1.3.2. Durch Expression dominanter Konstrukte entstandene Modelle

Manchen Erkrankungen des Menschen liegen dominante Gendefekte zugrunde; in einigen Fällen existiert jedoch das für eine menschliche Erkrankung verantwortlich gemachte Gen in der Fliege nicht oder zumindest nicht in der krankmachenden Form. In diesem Fall kann die krankheitsrelevante Form des menschlichen Gens in bestimmten Geweben mit Hilfe des *UAS/GAL4* Systems (Brand & Perrimon, 1993) exprimiert werden.

Oft können in diesen transgenen Tieren wichtige Symptome der menschlichen Erkrankung reproduziert und davon ausgehend manipuliert werden. Es existieren zahlreiche Beispiele solcher transgener Tiermodelle, unter anderem für dominante Formen der Parkinson-Krankheit (Feany & Bender, 2000), die Alzheimer-Krankheit (Greeve *et al.*, 2004; Wittmann *et al.*, 2001) und für Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) (Warrick *et al.*, 1998).

Eines der ersten Beispiele war ein Modell für Chorea Huntington. Diese Erkrankung zählt zu den polyQ Krankheiten; die zugrunde liegenden Gene enthalten Wiederholungen des für die Aminosäure Glutamin (Ein-Buchstaben-Abkürzung: Q) codierenden Basentriplets CAG. Wird jedoch durch krankhafte Veränderung eine bestimmte Anzahl dieser Wiederholungen überschritten, kommt es zu Neurodegeneration. Durch Expression von Konstrukten mit verschiedenen langen CAG-Wiederholungen im *Huntingtin* Gen konnten in Fliegenaugen Merkmale der menschlichen Erkrankung reproduziert werden: es bildeten sich in den Zellen Proteinaggregate, der Phänotyp war progressiv und die Schädigung der Zellen war umso stärker, je mehr Wiederholungen vorhanden waren (Jackson *et al.* 1998). Mittlerweile konnte das Modell in zahlreichen Studien genutzt werden, um die genauen zellulären Abläufe zu untersuchen und beeinflussende Faktoren zu identifizieren beziehungsweise eine eventuelle therapeutische Wirkung zu testen.

1.1.3.3. Unter Verwendung der klassischen *Forward Genetics* geschaffene Modelle

Im Gegensatz zu den beiden bisher genannten Herangehensweisen stellt die Isolierung und Charakterisierung von *Drosophila* Mutanten mit neurodegenerativem Phänotyp eine Möglichkeit dar, Einblicke in genetische und molekulare Ursachen menschlicher neurodegenerativer Krankheiten zu erlangen, ohne bereits vorab genetische Informationen zu besitzen. Dadurch können unvoreingenommen bislang unbekannte Gene, Signalwege und Mechanismen identifiziert werden, die generelle Grundlage für Neurodegeneration sein können. Dabei zeigt sich, dass die Störung verschiedenster zellulärer Funktionen zu Neurodegeneration führen kann (Übersichtsartikel Celotto & Palladino, 2005; Übersichtsartikel Kretzschmar 2005).

Ein Beispiel ist die Mutante *swiss cheese*. Sie wurde in einem Screen nach Neurodegenerationsmutanten identifiziert und das codierte Protein besitzt große Ähnlichkeit mit der menschlichen *Neuropathy Target Esterase* (NTE), die ein bekanntes Angriffsziel für Umweltgifte darstellt, welche Neuropathie hervorrufen (Kretzschmar *et al.*, 1997; Übersichtsartikel Kretzschmar 2005). Später wurde in den Fliegen eine Verbindung zwischen der fehlenden Esterase-Aktivität und einer veränderten Lipidzusammensetzung der Zellmembranen festgestellt; diese scheint generell für das Überleben von Neuronen und die korrekte Signalweiterleitung entscheidend zu sein (Muhlig-Versen *et al.*, 2005). Auf die Untersuchungen in *Drosophila* aufbauend wurde ein Maus Modell mit spezifischer

Deletion von *NTE* in neuronalen Geweben entwickelt; die Tiere zeigten Vakuolisierung von Neuronen-Zellkörpern und Dendriten (Akassoglou *et al.*, 2004). Dies ist eines der ersten Beispiele dafür, wie *Drosophila* die Grundlage für die Identifizierung einer Mutation bildete, die zu progressiver Neurodegeneration im Wirbeltier führt.

Eine weitere in einem solchen *forward genetic* Screen identifizierte *Drosophila melanogaster* Mutante mit altersabhängiger Neurodegeneration ist die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte *vap* Mutante.

1.2. Die *Drosophila vap* Mutante und RasGAP

1.2.1. Die *vap* Mutante

1.2.1.1. Phänotypen

Das erste Allel der in dieser Dissertation untersuchten Mutante, *vap*¹ (*vacuolar peduncle*), wurde in einem Screen nach neuen Fliegenstämmen mit EMS induzierten Mutationen, die histologisch sichtbare Veränderungen im Gehirn zeigen, entdeckt (Heisenberg & Böhl, 1979). In späteren P-Element-Mutagenese-Screens wurden weitere Allele identifiziert. Alle Mutanten sind homozygot lebensfähig und fertil und zeigen - mit jeweils Allel-spezifischem zeitlichem Verlauf - eine mit dem Alter zunehmende Bildung von Vakuolen im zentralen Gehirnbereich und in den optischen Loben (Abb. 1); zwei der Allele verursachen auch eine verkürzte Lebensspanne (Botella *et al.*, 2003).



Abb. 1: Phänotyp des adulten Gehirns der *vap*² Mutante.

Die Bilder zeigen horizontale Paraffinschnitte durch Köpfe von (A) 15 und (B) 25 Tage alten Männchen der Linie *vap*², gefärbt mit dem neuropilspezifischen Antikörper ab49. Mit zunehmendem Alter wird die Vakuolisierung im Zentralgehirn und den optischen Loben stärker.

Zh: Zentralgehirn, Re: Retina, La: Lamina, Me: Medulla, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte.

(Aufnahmen zur Verfügung gestellt von Dr. José Botella)

Die *vap*-Fliegen sind darüber hinaus auch in ihrem phototaktischen Verhalten gestört. In einem Verhaltenstest, der von Seymour Benzer (1967) entwickelt wurde, wird Fliegen die Möglichkeit gegeben, sich von einer im Dunkeln liegenden Startposition über mehrere Röhrchen zu einer Lichtquelle hin zu bewegen. Wildtypische Fliegen besitzen ein positiv-phototaktisches Verhalten, so dass sich am Ende eines solchen Versuchs die Mehrzahl der Fliegen im letzten Röhrchen befindet. Im Unterschied dazu bleibt der größte Teil der eingesetzten *vap*² Fliegen im ersten Röhrchen. Vom-Licht Experimente zeigten, dass die Fliegen auch hier nicht auf den Reiz reagieren, das heißt, dass es sich auch nicht um ein negativ-phototaktisches Verhalten handelt. Wie sich bei Untersuchung der lokomotorischen Aktivität zeigte, ist diese in *vap*² Fliegen jedoch normal (Kiermayer, 2003).

Blinde *sine oculis* Fliegen, die keine Augen besitzen, sich aber zufällig vorwärts und rückwärts bewegen, befinden sich zum Schluss größtenteils in einem in der Mitte zwischen Start- und Zielposition gelegenen Röhrchen. Es handelt sich bei der fehlenden Reaktion auf den Lichtreiz in den *vap* Fliegen folglich weder um ein gestörtes Sehvermögen noch um lokomotorische Probleme, sondern vermutlich um Schwierigkeiten mit der Koordination beziehungsweise der Reizverarbeitung.

1.2.1.2. Allele

Insgesamt wurden drei Allele der *vap* Mutation gefunden. Wie sich durch molekulare Untersuchungen zeigte, liegt das betroffene Gen auf dem X-Chromosom; die Transkriptionseinheit enthält acht Exons und sieben Introns (Abb. 2-A). Das *vap*³ Allel entsteht durch P-Element-Insertion im ersten Intron und verursacht eine geringfügig reduzierte Proteinmenge; die Fliegen zeigen keine verkürzte Lebensspanne und nur einen sehr schwachen Phänotyp (Botella *et al.*, 2003). Dieses Allel wird im weiteren Verlauf nicht berücksichtigt; *vap*¹ und *vap*² hingegen sind gut charakterisiert und wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

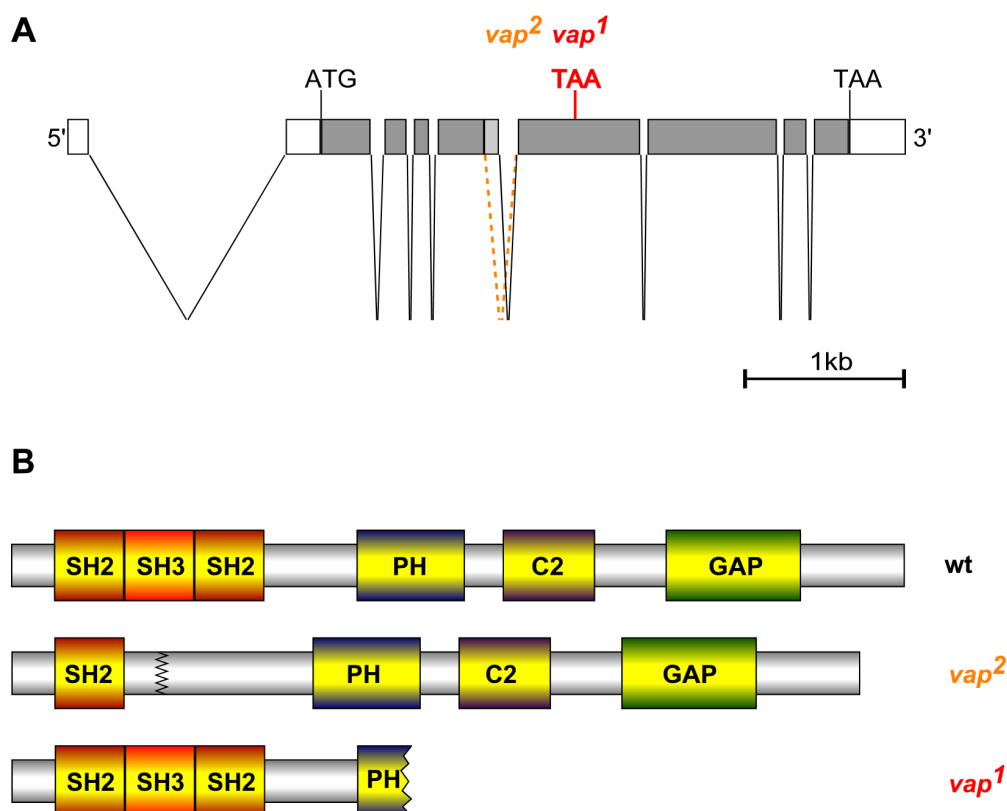


Abb. 2: Exon/Intron-Struktur des RasGAP Gens, *vap* Allele und Struktur des RasGAP Proteins im Wildtyp und in den *vap* Mutanten.

(A) Das RasGAP Gen aus *Drosophila melanogaster* besitzt neun Exons und acht Introns. (B) In der *vap*¹ Mutante erzeugt eine Punktmutation ein Stopcodon; das führt zur Entstehung eines verkürzten RasGAP Proteins ohne katalytische Domäne. In der Mutante *vap*² liegt eine Deletion von 239bp vor, die einen fehlerhaften Spleißvorgang verursacht. Dadurch entsteht ein verkürztes Transkript, in dem die SH2/SH3 Domänen betroffen sind; die katalytische Domäne bleibt erhalten.

(Schemata bearbeitet nach Botella *et al.*, 2003)

In der *vap*¹ Mutante liegt eine durch EMS induzierte Punktmutation (G→A) vor der katalytischen Domäne vor, die ein Stopcodon erzeugt, so dass das resultierende Protein in Bezug auf die katalytische Aktivität eine Nullmutante ist (Abb. 2-B); auch das restliche verbleibende Stück mit den beiden SH2 und der SH3 Domäne kann in Western Blots nicht detektiert werden (Abb. 3). Die durch P-Element-Insertion erzeugte *vap*² Mutante trägt eine Deletion von 239bp (Abb. 2); dies führt teilweise zu einem fehlerhaften, uneffizienten Spleißvorgang, so dass ein verkürztes Transkript entsteht. Die katalytische Domäne ist - im Gegensatz zur SH3 und einer der SH2 Domänen - nicht betroffen; jedoch ist auch hier die Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 3).

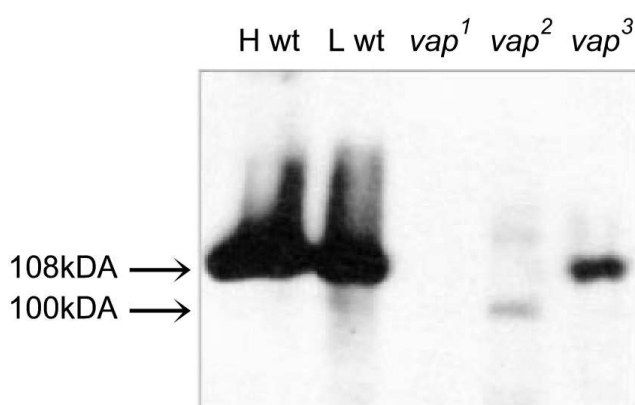


Abb. 3: Western Blot gegen das RasGAP Protein.

Das wildtypische Protein besitzt eine Größe von 108kDa und kann sowohl in Proteinextrakten aus adulten Köpfen (H wt) als auch aus Larven des dritten Stadiums (L wt) in großer Menge detektiert werden. In Proteinextrakten aus Larven des dritten Stadiums des Stammes *vap*¹ kann dagegen kein Signal detektiert werden. In *vap*² entsteht ein mutantes Protein von 100kDa durch den fehlerhaften Spleißvorgang, der durch die Deletion verursacht wird; außerdem ist nur eine geringe Menge des Proteins detektierbar. Die Insertion des Transposons in *vap*³ verursacht eine Reduktion der Expression des RasGAP Proteins.

In allen Spuren wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.

(Abbildung entnommen aus Botella *et al.*, 2003)

Insgesamt ist in der *vap*² Mutante ein abgeschwächter Phänotyp im Vergleich zu *vap*¹ zu sehen: die maximale Lebensspanne von *vap*¹ Fliegen beträgt circa 25 Tage, diejenige von *vap*² Fliegen 55 Tage, und die Neurodegeneration ist in *vap*¹ Fliegen bereits nach sieben Tagen zu sehen, in *vap*² tritt sie erst nach 15 Tagen in Erscheinung (Botella *et al.*, 2003). Es stellte sich heraus, dass das in *vap* Fliegen mutierte Gen für das *Drosophila melanogaster* Ras GTPase Aktivierende Protein (DmRasGAP) codiert (Botella *et al.*, 2003; Feldmann *et al.*, 1999).

1.2.2. Das RasGAP Protein

1.2.2.1. Katalytische Aktivität und Expressionsmuster von *Drosophila* RasGAP

Bei den Ras Proteinen handelt es sich um eine stark konservierte Familie von an einer Vielzahl zellulärer Signaltransduktionswege beteiligter kleiner G-Proteine. Dabei wirken sie als binäre Schalter, die in der aktiven, GTP gebundenen und einer inaktiven, GDP gebundenen Form vorliegen können (Abb. 4). Wie wichtig eine korrekte Regulation der Aktivität von Ras ist, zeigt sich in der Tatsache, dass aufgrund von Mutationen konstitutiv aktive Formen von Ras Ursache von ungefähr 20% aller menschlichen Tumoren sind (Übersichtsartikel Rajalingam *et al.*, 2007).

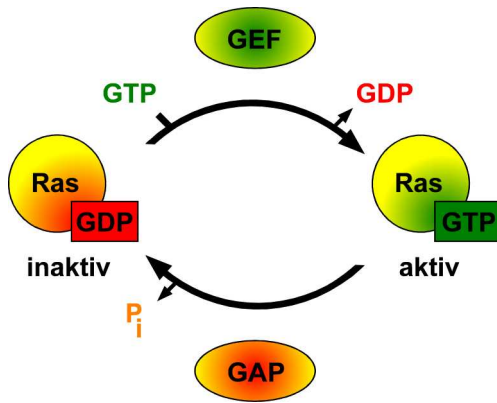


Abb. 4: Schematische Darstellung der Regulation der Ras Aktivität.

Ras Proteine gehören zu den monomeren GTPasen. Sie funktionieren als molekulare Schalter, die zwischen zwei Aktivitätszuständen wechseln können: einem aktiven, wenn GTP gebunden ist, und einem inaktiven bei Bindung von GDP. Zwei Klassen von Signalproteinen, GEFs und GAPs, regulieren die Ras Aktivität durch Beeinflussung des Übergangs zwischen den beiden Zuständen. GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) begünstigen den Austausch von GDP gegen GTP, so dass Ras aktiviert wird. GAPs (*GTPase activating proteins*) erhöhen die intrinsische Rate der Hydrolyse von gebundenem GTP, wodurch Ras inaktiviert wird. Zu den in *Drosophila* bekannten GAPs gehört das von der *vap* Mutation betroffene RasGAP.

(Schema bearbeitet nach Takai *et al.*, 2001)

Die Regulation erfolgt hauptsächlich durch zwei Arten von Molekülen: die sogenannten GEFs (*guanin nukleotid exchange factors*), die die Freisetzung von GDP und damit den Austausch gegen GTP katalysieren, und die GAPs, welche die intrinsische GTPase-Aktivität der Ras-Proteine erhöhen und sie dadurch in den inaktiven Zustand überführen (Übersichtsartikel Takai *et al.*, 2001).

Das erste auf molekularer Ebene charakterisierte GAP war p120 GAP (Übersichtsartikel Bernards, 2002). Das in der *vap* Mutante betroffene Gen codiert für das homologe Protein aus *Drosophila*. Es wird während der gesamten Entwicklung exprimiert, allerdings verstärkt in Embryonen (Feldmann *et al.*, 1999). Wie *in situ* Hybridisierungs-Experimente zeigten, wird *RasGAP* im adulten Gehirn der Fliegen im gesamten Cortex ausgeprägt, jedoch nicht in Gliazellen. Die Expression wildtypischer *RasGAP* cDNA mit Hilfe des *UAS/GAL4*-Systems (Brand & Perrimon, 1993) unter der Kontrolle von neuronenspezifischen Treibern rettete den neurodegenerativen Phänotyp der *vap* Mutanten, Expression in Gliazellen rettete nicht. Damit scheint die Funktion von RasGAP nur in Neuronen, nicht aber in Gliazellen benötigt zu werden (Botella *et al.*, 2003).

Die Funktion von RasGAP im adulten *Drosophila* Gehirn ist spezifisch: Mutationen in den beiden anderen bekannten *Drosophila* GAPs, *Gap1* und *NF1* (Neurofibromin 1), führen nicht zu Neurodegeneration, und der *vap* Phänotyp kann auch nicht durch neuronale Expression von *Gap1* gerettet werden (Botella *et al.*, 2003).

1.2.2.2. Struktur und Funktion von RasGAP

Das *Drosophila* RasGAP besitzt 47% Aminosäureidentität und sogar 68% Aminosäureähnlichkeit mit dem menschlichen p120 RasGAP. Der carboxyterminale Teil von RasGAP enthält die katalytische Domäne; diese ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert. Zentral befinden sich PH und C2/CalB Domänen, die vor allem Protein/Lipid Interaktionen vermitteln. Der aminoternale Teil enthält SH2 und SH3 Domänen, die für Protein/Protein Interaktionen zuständig sind (Feldmann *et al.*, 1999; Abb. 5).

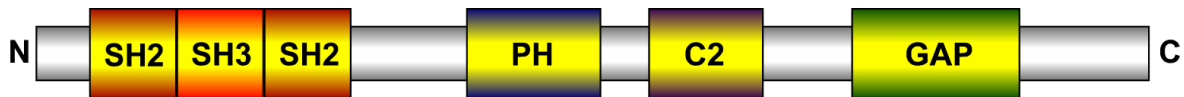


Abb. 5: Schematische Darstellung der Struktur von *Drosophila* RasGAP.

Das Protein besitzt im aminoterminalen Teil zwei SH2 Domänen und eine SH3 Domäne, die für Protein/Protein Interaktionen zuständig sind, und zentrale PH und C2/CaLB Domänen, die hauptsächlich Protein/Lipid Interaktionen vermitteln. Die GAP katalytische Domäne befindet sich im carboxyterminalen Teil.

N: Amino-Terminus, C: Carboxy-Terminus.

(Schema bearbeitet nach Botella *et al.*, 2003)

RasGAP kann in *Drosophila* als Inhibitor von Signalwegen wirken, die über verschiedene Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) durch Ras vermittelt werden: Überexpression von *UAS-RasGAP* kann Phänotypen im Flügel unterdrücken, die durch aktivierte Formen von RTKs der *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) Familie ausgelöst werden (Feldmann *et al.*, 1999, Woodcock & Hughes, 2004). RasGAP fungiert in der Taufliege auch als negativer Effektor des Torso Signalweges, der in der Embryonalentwicklung die terminalen Strukturen spezifiziert (Cleghon *et al.*, 1998).

Verschiedene Experimente zeigten, dass der neurodegenerative Phänotyp in *vap* Fliegen durch Beeinflussung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) Signalwegs modifiziert werden kann: Missexpression des EGFR unter Verwendung eines Hitzeschock-Treibers kann die Neurodegeneration verstärken, Reduzierung der EGFR-Menge durch Verwendung eines Nullallels kann sie dagegen vermindern. Die Analyse weiterer genetischer Interaktionen stützt diese Vermutung; auch ist in Western Blots eine Veränderung der Aktivierung des nachgeschalteten MAPK Signalweges zu sehen (Botella *et al.*, 2003; Kiermayer, 2003). Eine nahe liegende Erklärung wäre, dass durch die *vap* Mutation die GAP katalytische Aktivität von RasGAP vermindert und dadurch die Aktivität von Ras und damit nachgeschalteter Signalwege erhöht ist; dies könnte das Absterben der Neuronen herbeiführen. Verminderung der Menge an EGFR würde eine geringere Menge an Ras Aktivität verursachen und damit den Effekt, der durch die fehlende negative Regulation in *vap* Fliegen entsteht, kompensieren.

Dies muss jedoch nicht direkt über die GAP katalytische Funktion von RasGAP geschehen: bekanntermaßen besitzt RasGAP auch Effektorfunktion (Übersichtsartikel Tocque *et al.*, 1997). Da RasGAP selbst keine enzymatische Funktion hat, welche eine Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen erklären würde, muss man vermuten, dass diese Rolle von oder über Interaktionspartner von RasGAP erfüllt wird.

1.2.2.3. Interaktionspartner von RasGAP

Tatsächlich sind zahlreiche Interaktionspartner der verschiedenen Domänen von RasGAP aus Säugetieren bekannt. Diese sollen nun im Einzelnen erläutert werden:

GAP Domäne

RasGAP bindet, wie bereits erwähnt, an **Ras** und reguliert dessen Aktivität. Da für die Bindung allerdings auch die Effektor Domäne von Ras entscheidend ist, wird vermutet, dass die Rolle von RasGAP in durch Ras vermittelten Signalwegen vermutlich über die reine negativ regulatorische Funktion hinausgeht (Übersichtsartikel Lowy & Willumsen, 1993). Außerdem stimuliert RasGAP auch die GTPase Aktivität von **Rab5**; dieses kleine GTP bindende Protein spielt eine Rolle bei der Regulation der Endosomen Fusion (Liu & Li, 1998).

CaLB/C2 Domäne

Über die *Ca²⁺-dependent phospholipid-binding/conserved region 2* (CaLB/C2) Domänen binden Proteine an negativ geladene Phospholipide und zelluläre Membranen; die Bindung ist von Ca^{2+} abhängig. Da in der CaLB/C2 Domäne von RasGAP bestimmte Aspartat Reste fehlen, die normalerweise für die Koordinierung der Ca^{2+} Ionen zuständig sind, werden vermutlich weitere Proteine benötigt, um diese Funktion zu übernehmen; als solches wurde **Annexin VI** identifiziert. Diese Interaktion dient zur Regulation der subzellulären Lokalisation von RasGAP und hat Einfluss auf die Bildung von Signalmodulen und so auf die Feinabstimmung der Signalweiterleitung (Übersichtsartikel Grewal & Enrich, 2006).

PH Domäne

Pleckstrin Homology (PH) Domänen sind in vielen Molekülen vorhanden, die an der zellulären Signalweiterleitung, an der Reorganisation des Zytoskeletts, an *membrane trafficking* und an der Phospholipid-Modifizierung beteiligt sind und besitzen diverse Funktionen; sie binden nicht nur, wie lange Zeit vermutet, an Phospholipide, sondern vermitteln auch Protein/Protein Interaktionen (Übersichtsartikel Lemmon, 2004). RasGAP interagiert über die PH Domäne beispielsweise mit **RACK1**, einem Gerüstprotein, wodurch die Lokalisation von RasGAP beeinflusst wird (Koehler & Moran, 2001). Zudem findet möglicherweise auch eine **kompetitive intramolekulare Bindung** der PH an die GAP katalytische Domäne statt, welche eine Bindung an Ras verhindert (Drugan *et al.*, 2000).

SH3 Domäne

Src homology 3 (SH3) Domänen gehören zu den ersten identifizierten modularen Protein Interaktions Domänen. Diese circa 60 Aminosäuren großen Domänen kommen sehr häufig in Proteinen vor und binden an Prolin-reiche Regionen in anderen Proteinen; das konservierte Bindemotiv ist PXXP (P steht für die Aminosäure Prolin, X für eine beliebige Aminosäure). Die Affinität und Spezifität der SH3 Domänen für ihre Peptid-Liganden ist recht gering, wodurch eine große Flexibilität der möglichen Bindung zustande kommt, die beispielsweise einen raschen Umbau von Signalkomplexen in Antwort auf Veränderungen der Umgebung ermöglicht. Daneben gibt es auch Beispiele für spezifische, biologisch signifikante SH3/Liganden Interaktionen (Übersichtsartikel Mayer 2001). Versuche mehrerer Gruppen mit monoklonalem Antikörper gegen die SH3 Domäne von RasGAP zeigten, dass onkogene Formen von Ras zwei Signalmechanismen aktivieren: die MAPK Kaskade und einen Signalweg, an dem die SH3 Domäne von RasGAP beteiligt ist (Duchesne *et al.*, 1993; Pomerance *et al.*, 1996; Leblanc *et al.*, 1998 & 1999).

Für die SH3 Domäne von RasGAP sind mehrere Interaktionspartner bekannt. **G3BP** (*RasGAP SH3 binding protein*) bindet an RasGAP nur wenn Ras aktiv ist und besitzt eine Phosphorylierungs-abhängige Endoribonuklease-Aktivität; deshalb wird eine Beteiligung an der Regulation des RNA *turnover* in Antwort auf durch RasGAP vermittelte Signale vermutet (Parker *et al.*, 1996; Gallouzi *et al.*, 1998). Wie in einem Yeast Two Hybrid Screen herausgefunden wurde, bindet RasGAP außerdem an die Kinase Domäne der Serin/Threonin Kinase **Aurora**, wodurch deren Aktivität inhibiert wird. Es kommt auch zur Bildung eines ternären Komplexes RasGAP/Aurora/Survivin (Gigoux *et al.*, 2002). Aurora Kinasen sind beteiligt an der Regulation mitotischer Zellteilungsvorgänge (Übersichtsartikel Katayama *et al.*, 2003), Survivin unterdrückt Apoptose und reguliert die Zellteilung (Ambrosini *et al.*, 1997); möglicherweise ist der ternäre Komplex so an der Regulation der Balance zwischen Zellteilung und Apoptose beteiligt. Weiters bindet RasGAP über seine SH3 Domäne auch an **Huntingtin**; Defekte in diesem Genlocus verursachen die neurodegenerative Erkrankung Chorea Huntington. Die Funktion des Proteins ist bislang unbekannt, vermutlich handelt es sich um ein Adapter Protein, das möglicherweise über seine Interaktion mit RasGAP und auch Grb2 beteiligt ist an der EGFR-vermittelten Signalweiterleitung und der Regulation von Ras-abhängigen Signalwegen (Liu *et al.*, 1997).

SH2 Domänen

Src homology 2 (SH2) Domänen stellen das häufigste Proteinmodul dar, über das Interaktionen mit Phosphotyrosinen (pY) stattfinden. Die ungefähr 100 Aminosäuren großen Domänen, deren Rolle spezifisch für durch Protein Tyrosin Kinasen (PTKs) vermittelte Signalwege ist, sind evolutionär und strukturell stark konserviert. Jede SH2 Domäne erkennt mehrere flankierende Aminosäurereste in der Umgebung von pY, aber

die Bindung ist dennoch nicht absolut spezifisch, so dass eine gewisse Flexibilität vorhanden ist. Die Spezifität wird zusätzlich beeinflusst durch weitere im Protein vorhandene Module oder durch lokale Konzentrationen. SH2 Domänen stellen damit den Prototyp von Protein/Protein Interaktions-Modulen dar, die die reversible Relokalisierung von Proteinen und die Bildung von Multiprotein-Komplexen während der Signalweiterleitung vermitteln (Übersichtsartikel Machida & Mayer, 2005).

Die meisten der bisher bekannten Interaktionspartner von RasGAP binden über seine SH2 Domäne. Eine Gruppe sind Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) wie der **EGFR** (*epidermal growth factor receptor*; Margolis *et al.*, 1990), der **PDGFR** (*platelet derived growth factor receptor*; Kazlauskas *et al.*, 1990) und der **FGFR** (*fibroblast growth factor receptor*; Cailliau *et al.*, 2001). Es findet auch eine vorübergehende Interaktion mit dem **Insulin Rezeptor** (IR) statt (Pronk *et al.*, 1992). Nach der Bindung wird RasGAP phosphoryliert und rekrutiert dann weitere Interaktionspartner zur Membran.

Die SH2 Domäne von RasGAP bindet an verschiedene zytosolische Proteine; am besten bekannt sind p190 (Ellis *et al.*, 1990) und die Dok Proteine p62^{dok} (Ellis *et al.*, 1990) und p56^{dok} (DiCristofano *et al.*, 1998). Die Interaktion mit **p190RhoGAP** spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Remodellierung des Zytoskeletts und ermöglicht eine Kopplung der Ras und Rho Signaltransduktion (Dupont & Blancq, 1999); darüber hinaus führt die Bindung der SH2 Domänen an p190 zu einer Konformationsänderung von RasGAP, wodurch die Zugänglichkeit der SH3 Domäne stark erhöht und damit weitere Proteininteraktionen von RasGAP gefördert werden (Hu & Settleman, 1997). Die **Dok** (*downstream of tyrosine kinases*) Proteine sind eine Familie von Adaptorproteinen, die nach Aktivierung vieler RTKs oder von zytoplasmatischen Kinasen an Tyrosinresten phosphoryliert werden, die dann als Bindestellen für SH2 Domänen anderer Proteine dienen. Die über die SH2 Domänen von RasGAP vermittelten Interaktionen, auch mit zahlreichen weiteren hier nicht näher diskutierten Proteinen, dienen insgesamt vermutlich hauptsächlich zur Feinregulation der Signalweiterleitung in über PTKs vermittelten Signalwegen.

1.2.2.4. Funktionen des N-terminalen Teils von RasGAP

Der N-terminale Teil von RasGAP spielt darüber hinaus in verschiedenen Zusammenhängen eine wichtige Rolle. Beispielsweise muss er vorhanden sein, um die volle katalytische Aktivität von RasGAP zu gewährleisten (Bryant *et al.*, 1996). Eine Interaktion mit Filamin C, die einen Einfluss auf die mRNA- und Proteinsynthese in der Zelle besitzt, wird über diesen Teil des Proteins vermittelt (Lypowy *et al.*, 2005), ebenso wie die Interaktion mit der Akt Kinase (Yue *et al.*, 2004), die eine wichtige Rolle in der Regulation der Autophagie spielt. Darüber hinaus besitzt der N-terminale Teil von RasGAP eine Bedeutung für die Regulation der Apoptose (Übersichtsartikel Yang *et al.*, 2004). Diese beiden zuletzt genannten Funktionen sollen im Folgenden erläutert werden.

1.3. RasGAP, Apoptose und Autophagie

1.3.1. RasGAP und Apoptose

1.3.1.1. Programmierter Zelltod durch Apoptose

Um Zellen zu beseitigen, die nicht länger benötigt werden oder die kaputt oder infiziert sind, benutzen Organismen genetisch kontrollierte Zelltod-Prozesse. Die am besten beschriebene Form des programmierten Zelltods ist die Apoptose. Die sogenannten Caspasen (*cysteiny-aspartate specific proteases*: eine Familie von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum, die Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten) spielen in diesem Prozess die entscheidende Rolle: sie beeinflussen durch die Spaltung zellulärer Proteine die Signalweiterleitung auf dem Weg zum Zelltod. Durch innere oder äußere Signale werden diese Enzyme in Signalkaskaden aktiviert, die zum schnellen Abbau von zellulären Strukturen und Organellen führen; wenn dieser Prozess im Schrumpfen der Zelle mit Kondensation des Chromatins und Fragmentierung des Zellkerns endet, spricht man von Zelltod Typ I oder von Apoptose (Übersichtsartikel Vermeulen *et al.*, 2005; Hay & Guo, 2006; Maiuri *et al.*, 2007).

1.3.1.2. RasGAP als Sensor für Caspase-Aktivität

Wen *et al.* (1998) stellten in Untersuchungen an Jurkat Zellen fest, dass RasGAP während der Apoptose von Caspasen gespalten wird. Yang & Widmann (2001) fanden heraus, dass RasGAP dabei als eine Art Sensor für die Caspase-Aktivität dient: bei geringer Aktivität dieser Proteasen wird RasGAP in ein Fragment C und ein Fragment N gespalten, welches die Zellen vor Apoptose schützt. Steigt die Aktivität der Caspasen weiter, wird das Fragment N wiederum in zwei Fragmente, N1 und N2 gespalten (Abb. 6).

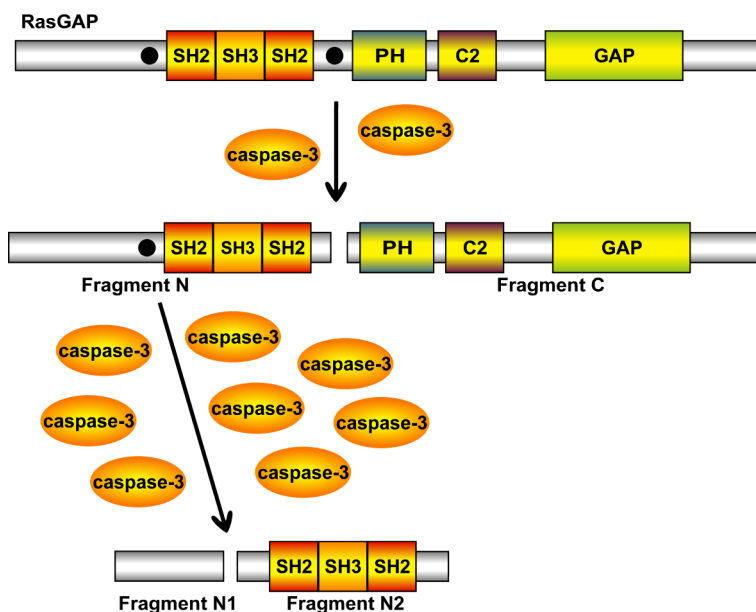


Abb. 6: Schematische Darstellung der Spaltung von RasGAP durch Caspasen.

RasGAP besitzt zwei *caspase cleavage sites* (schwarze Punkte). Bei niedriger Caspase Aktivität wird RasGAP in Fragment N und Fragment C gespalten. Bei höherer Caspase Aktivität wird Fragment N weiter in die Fragmente N1 und N2 gespalten. Die Spaltung an der zweiten *cleavage site* kann nur stattfinden, wenn zuvor die erste Spaltung erfolgt ist.

(Schema bearbeitet nach Yang *et al.*, 2004)

Wie Yang *et al.* (2005) herausfanden, besteht die Funktion dieser zweiten Spaltung darin, die antiapoptotische Funktion von Fragment N zu inaktivieren; dadurch werden die Caspasen nicht mehr weiter in ihrer Fähigkeit gestört, den Zelltod herbeizuführen.

Apoptose ist jedoch nicht der einzige Weg, um nicht mehr benötigte beziehungsweise schadhafte Zellen zu entfernen. Seit einiger Zeit wird ein als autophagischer Zelltod bezeichneter Mechanismus diskutiert. Bevor dies jedoch näher erläutert wird, sollen die Grundlagen der Autophagie Erwähnung finden.

1.3.2. RasGAP und Autophagie

1.3.2.1. Ablauf und molekulare Mechanismen der Autophagie

Zellen besitzen in der Hauptsache zwei Wege für den Abbaustoffwechsel: das Proteasomen-System und Autophagie. Durch beide Wege können Proteine abgebaut werden, Autophagie ist aber der wichtigste Mechanismus einer Zelle, um Proteine und der einzige, um ganze Organelle abzubauen. Grundsätzlich unterscheidet man drei Formen der Autophagie: Chaperon-vermittelte Autophagie, Microautophagie und Macroautophagie. Auf die ersten beiden soll hier nicht näher eingegangen werden; letztere stellt die wichtigste Form dar und wird deshalb meist kurz allgemein und auch im Weiteren einfach als Autophagie bezeichnet (Übersichtsartikel Codogno & Meijer, 2005). Autophagie ist ein evolutionär konservierter Prozess eukaryontischer Zellen. Am Beginn steht nach Induktion der Autophagie die Bildung einer Isolierungs-Membran aus der sogenannten präautophagosomalen Struktur unbekanntem Ursprungs. Verlängerung dieser Membran führt zur Bildung einer Doppelmembran-umschlossenen Struktur, des Autophagosoms. Nach Fusion der äußeren Membran mit einem Lysosom werden das enthaltene zytoplasmatische Material und die innere Membran des Autophagosoms durch die lysosomalen Hydrolasen abgebaut; die während dieses Prozesses entstandene Struktur wird als Autolysosom bezeichnet (Abb. 7).

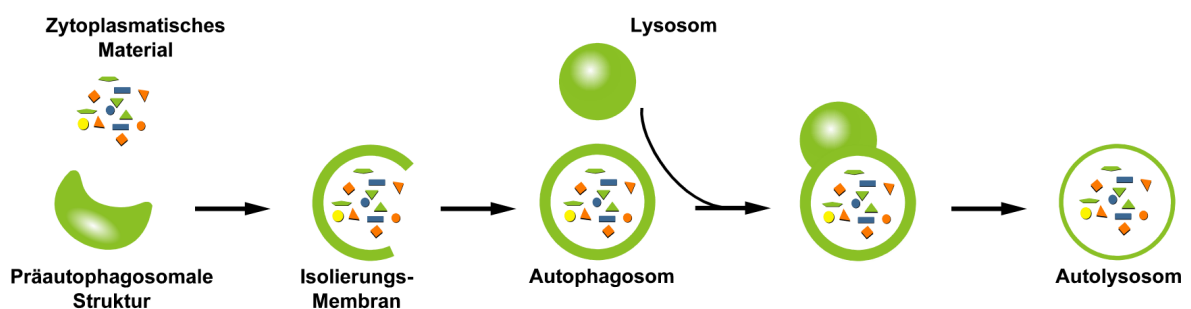


Abb. 7: Ablauf der Autophagie.

Zytoplasmatisches Material wird von einer Isolierungs-Membran umschlossen, die sich aus einer präautophagosomalen Struktur unbekanntem Ursprungs bildet. Durch Verlängerung bildet sich eine von einer Doppelmembran umschlossene Struktur, das Autophagosom. Dieses fusioniert mit einem Lysosom. Im entstehenden Autolysosom wird das umschlossene Material abgebaut.

(Abbildung bearbeitet nach Levine & Yuan, 2005)

Für die verschiedenen Schritte der Autophagie sind sogenannte Atgs (*autophagy-related genes/proteins*) essentiell; entdeckt wurden sie zumeist in der Hefe, sie besitzen jedoch größtenteils Orthologe in höheren Organismen. Sie können in vier funktionelle Gruppen eingeteilt werden: einen Serin/Threonin Kinase Komplex, der auf vorgeschaltete Signale wie die TOR Kinase (siehe Abschnitt 1.3.2.2.) reagiert (Atg1, Atg13, Atg17), einen Lipid Kinase Komplex, der die Keimbildung der Vesikel vermittelt (Atg6, Atg14, Vps34, Vps15), zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationswege, die an der Vergrößerung der Vesikel beteiligt sind (Atg8- und Atg12-Systeme), und einen Recycling-Weg, der für die Dissoziation von Atg Proteinen von reifen Autophagosomen benötigt wird (Atg2, Atg9, Atg18) (Übersichtsartikel Levine & Yuan, 2005). Neuere Untersuchungen in *Drosophila melanogaster* lassen zudem eine Rolle des Orthologen von Hefe-Vps18 (*vacuolar protein sorting*), Deep orange (Dor), bei der Fusion von Autophagosom und Lysosom vermuten (Lindmo *et al.*, 2006). Für die Regulation der Funktion von Dor scheint das Carnation (Car) Protein, das Orthologe zu Vps33 aus der Hefe, eine Rolle zu spielen (Sriram *et al.*, 2003). Mutationen in den beiden *Drosophila* Genen, *dor*¹ und *car*¹, sind häufig verwendete Augenfarben-Marker in der Taufliege.

Autophagie findet auf einem basalen Niveau beständig in Zellen statt, um alte und defekte Zellbestandteile zu beseitigen und die durch den Abbau gewonnenen molekularen Bausteine (Aminosäuren und Fette) wieder für den Zellstoffwechsel zur Verfügung zu stellen. Daneben wird Autophagie aber auch unter bestimmten Umständen vermehrt induziert: während der Entwicklung wird dieser Mechanismus beispielsweise in der Fruchtfliege verwendet, um larvale Strukturen abzubauen (Übersichtsartikel Baehrecke, 2003). Dieser Prozess steht unter hormonaler Kontrolle und soll hier nicht weiter erläutert werden. Autophagie wird auch unter nährstoffarmen Bedingungen induziert, um das Überleben der Zelle zu sichern. Die Kontrolle dieses Prozesses soll im Folgenden erläutert werden.

1.3.2.2. Regulation der Autophagie

Autophagie wird über Wachstumsfaktoren und Nährstoffe reguliert; die Signalweiterleitung erfolgt über einen Signalweg, der die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die Akt Kinase, TOR (*target of rapamycin*) und die Atgs beinhaltet (Abb. 8).

Bindung von Insulin oder IGFs (*insulin-like growth factors*) an die entsprechenden Rezeptoren führen zur Rekrutierung und Phosphorylierung des IRS (*insulin receptor substrate*) und daraufhin Verlagerung der PI3K an die Membran. An IRS gebundene PI3K wandelt PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat) in der Zellmembran in PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat) um; PIP₃ rekrutiert PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) und Akt zur Membran. Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Akt durch PDK1. Akt phosphoryliert und inaktiviert dadurch TSC2

(*tuberous sclerosis protein 2*). Zusammen mit TSC1 bildet TSC2 ein Heterodimer, welches TOR negativ reguliert, und zwar über Inaktivierung der kleinen GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), die den TOR-Komplex 1 (TORC1) aktiv reguliert. TORC1 unterdrückt Autophagie über einen Mechanismus, an dem ATG1 beteiligt ist, eine Kinase, die einen frühen Aktivierungsschritt im Autophagie-Prozess vermittelt (Übersichtsartikel Wulschleger *et al.*, 2006; siehe auch Abschnitt 1.3.2.1.).

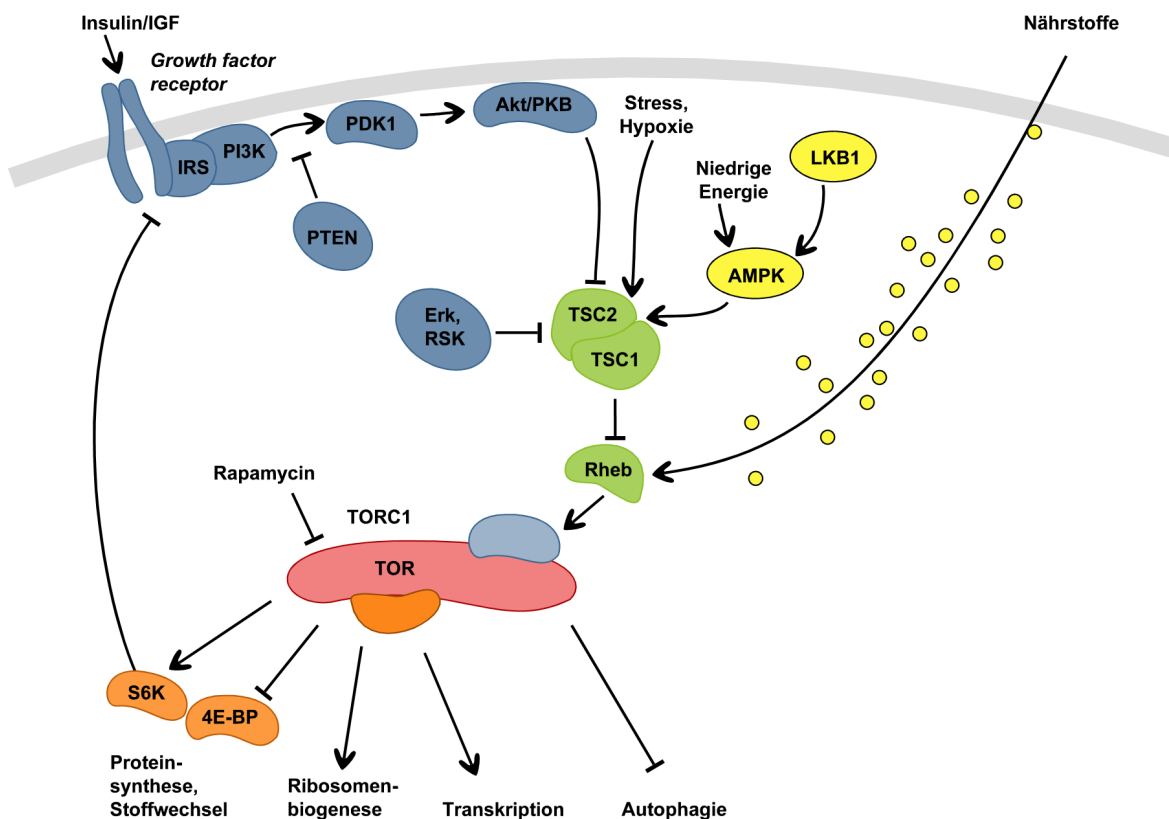


Abb. 8: Molekulare Mechanismen der Regulation der Autophagie.

Autophagie wird in den Zellen über eine Signalkaskade, welche PI3K, Akt und TOR als wesentliche Faktoren beinhaltet, reguliert (Einzelheiten siehe Text). Verschiedene weitere Faktoren können an unterschiedlichen Stellen des Signalweges hemmend oder aktivierend Einfluss auf diesen Prozeß nehmen. PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) beispielsweise inhibiert den Akt-Weg, indem es die 3' Phosphatgruppe von PIP3 entfernt. Erk (*extracellular signal regulated kinase*) und RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*) können den TSC1/TSC2 Komplex durch Phosphorylierung inaktivieren. Auch Stress, Hypoxie, mangelhafte Energieversorgung und Nährstoffe nehmen an verschiedenen Stellen Einfluss auf den TORC1 Komplex und damit unterhalb gelegene zelluläre Prozesse. Neben der Autophagie reguliert der TORC1 Komplex über weitere Faktoren (siehe Text) Transkription, Ribosomen-Biogenese, Proteinsynthese und damit den Stoffwechsel.

(Abbildung bearbeitet nach Wulschleger *et al.*, 2006)

Neben Insulin beeinflussen weitere Faktoren wie Stress oder Hypoxie, eine mangelhafte Energieversorgung oder Nährstoffe diesen Signalweg oberhalb von TORC1 (siehe Abb. 8). Über weitere Substrate von TORC1 werden zusätzliche Faktoren beeinflusst, die den Ernährungszustand der Zelle reflektieren: neben der Transkription und der Ribosomen-Biogenese wird auch die Translation durch TORC1 beeinflusst. Die Regulation der Translation und damit der Proteinsynthese erfolgt über 4E-BP (*elongation factor 4E (eIF4E) binding protein*) und die S6-Kinase 1 (S6K1), wobei über letztere wiederum eine negative Regulation des Signalwegs stattfindet (Übersichtsartikel Wullschleger *et al.*, 2006). Dass TOR in diesem Prozess eine zentrale Rolle zukommt, zeigen auch die Ergebnisse von Scott *et al.* (2004): in *Drosophila* Larven mit einer Mutation in *dTOR* kommt es zu konstitutiver Autophagie im Fettkörper, und konstitutiv aktives dTOR unterdrückt durch Hunger induzierte Autophagie.

In letzter Zeit wird eine weitere mögliche Rolle der Autophagie diskutiert, nämlich eine Beteiligung an neurodegenerativen Vorgängen; dies soll in den nächsten Abschnitten erläutert werden.

1.3.2.3. Autophagie und Neurodegeneration

In verschiedenen aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *Atg* Genen sowohl in *Drosophila melanogaster* (Juhasz *et al.*, 2007; Simonsen *et al.*, 2007) als auch in Mäusen (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006) zu Neurodegeneration führen können. Zurückgeführt wird dieser Effekt auf die Anhäufung unlöslicher Proteine: normalerweise durch Autophagie entfernte Proteine mit anomaler Struktur werden nicht beseitigt und verursachen Schäden, die schließlich zum Tod der Zelle führen.

Bei der Behandlung neurodegenerativer Krankheiten, die mit einer intrazellulären Anhäufung toxischer Proteine einhergehen, könnte die Beeinflussung der Autophagie einen möglichen Ansatz darstellen: die Erhöhung der intrinsischen Autophagie-Rate durch Rapamycin-ähnliche Medikamente wird derzeit als mögliche Therapie diskutiert (Übersichtsartikel Rubinsztein, 2006). Rapamycin wurde in den 1970er Jahren in Bodenproben von der Osterinsel (Rapa Nui, daher der Name des Antibiotikums) als Stoffwechselprodukt von *Streptomyces hygroscopicus* mit hoher Wirksamkeit gegen Pilze entdeckt. Später wurden immunsuppressive Eigenschaften bemerkt, die bei näherer Untersuchung auf seine hemmende Wirkung auf TOR (daher der Name *target of rapamycin*) zurückgeführt werden konnten (Übersichtsartikel Wullschleger *et al.*, 2006). Diese hemmende Wirkung auf TOR und damit Erhöhung der Autophagie will man sich also nun bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Chorea Huntington und der Parkinson-Erkrankung zunutze machen.

Eine positive Wirkung einer erhöhten Autophagie-Rate konnten Simonsen *et al.* (2007) in *Drosophila* nachweisen: Überexpression von Atg8a in den Gehirnen älterer Fliegen konnte die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und die Anhäufung ubiquitinerter und oxidierter Proteine verringern und die Lebenserwartung deutlich steigern. Obwohl diese Ergebnisse für eine positive Rolle der Autophagie für das Überleben von Neuronen sprechen, wird seit einiger Zeit die Existenz von autophagischem Zelltod diskutiert.

1.3.2.4. Autophagischer Zelltod

Nach morphologischen Kriterien können drei Formen von Zelltod identifiziert werden: Nekrose, Apoptose und autophagischer Zelltod. Nekrose definiert sich dabei durch das Fehlen von Merkmalen der Apoptose oder der Autophagie. Apoptose zeichnet sich durch Chromatinkondensation und Kernfragmentation aus, während bei autophagischem Zelltod wie oben beschrieben Teile des Zytoplasmas in Doppelmembran-umschlossenen Vakuolen eingefangen und schließlich von Hydrolasen abgebaut werden (Galluzzi *et al.*, 2007).

Es ist jedoch nach wie vor umstritten, wann man davon sprechen kann, dass der Zelltod tatsächlich durch Autophagie stattfindet oder dass diese nur eine Begleiterscheinung darstellt: während der Apoptose kann Autophagie als protektiver Mechanismus aktiviert werden, der den Zelltod verhindert und auch die Apoptose unterdrückt, oder als Mechanismus, der zum Zelltod beiträgt. Ist die Apoptose gehemmt, kann autophagischer Zelltod vorkommen (Übersichtsartikel Codogno & Meijer, 2005). Möglicherweise wird autophagischer Zelltod nur ausgelöst, wenn Apoptose verhindert wird. Vielleicht stellt der autophagische Zelltod aber auch einen verzögerten Weg dar, der mit der Apoptose ausgelöst wird, aber sich nur manifestieren kann, wenn der schnellere Prozess der Apoptose behindert wird (Xue *et al.*, 1999; Übersichtsartikel Stefanis, 2005).

Beide Mechanismen können zum Teil von denselben Signalen ausgelöst werden, so dass beide gleichzeitig ablaufen; sie können sich auch gegenseitig auslösen. Unter manchen Umständen entscheidet die Zelle zwischen den beiden Antworten (Übersichtsartikel Maiuri *et al.*, 2007). Vermutlich besitzen Zellen ein breites Repertoire sich überschneidender Mechanismen, die den Zelltod herbeiführen können, und Apoptose und autophagischer Zelltod stellen die Extreme der abgestuften Skala physiologischer Arten von Zelltod dar. Auch in den *Drosophila vap* Mutanten wurde die Art des Zelltods analysiert (Botella *et al.*, 2003).

1.3.2.5. Mögliche Funktionen von RasGAP im Zusammenhang mit Autophagie

Wie ultrastrukturelle Untersuchungen und die Verwendung verschiedener molekularer Marker zeigten, wird die Neurodegeneration in *vap* Mutanten durch den Tod von Neuronen verursacht, Gliazellen sind vom Zelltod nicht betroffen. In mehreren unabhängigen Experimenten konnte festgestellt werden, dass es sich nicht um apoptotischen Zelltod handelt: nach TUNEL-Färbung konnten keine apoptotischen Kerne gefunden werden, und eine Reduktion der Dosis bestimmter apoptotischer Gene führte nicht zu einer Modifizierung des Phänotyps. Auch konnte panneuronale Expression des antiapoptotischen Proteins p35 den Phänotyp nicht retten, was auf einen Caspase-unabhängigen Zelltod-Mechanismus hinweist. Morphologische Analysen bestätigten die Abwesenheit typischer Merkmale apoptotischer Zellen (Botella *et al.*, 2003). Stattdessen traten Merkmale des autophagischen Zelltodes auf (Clarke, 1990): das Zytoplasma zeigte Zeichen von Autophagie, und die Zellkerne blieben bis in späte Stadien des Sterbeprozesses erhalten (Abb. 9). Diese Merkmale wurden auch in sterbenden menschlichen Tumorzellen nach Expression einer onkogenen Form von Ras gefunden (Chi *et al.*, 1999).

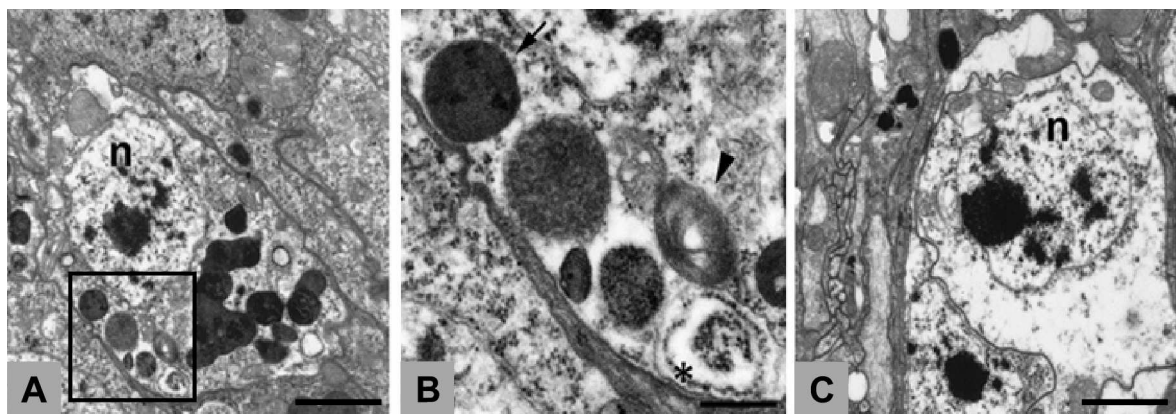


Abb. 9: Ultrastrukturelle Analyse der Neuronen in *vap* Fliegen.

Die Neuronen in einen Tag alten *vap*¹ Fliegen zeigen verschiedene Merkmale autophagischen Zelltods (A). In der Vergrößerung erkennt man im Einzelnen: eine Anhäufung von Autolysosomen (Pfeil), Vakuolen, die membranöses Material enthalten (Pfeilspitze) sowie leere Vakuolen oder Vakuolen, die noch Reste von Material enthalten (Sternchen) (B). Neuronen sieben Tage alter Fliegen zeigen verdautes Zytoplasma, während der Zellkern (n) intakt ist (C).

Maßstab: 2µM in (A) und (C), 0,5µM in (B).

(Abbildung entnommen aus Botella *et al.*, 2003)

Diese Einstufung des Zelltods in den Neuronen von *vap* Fliegen deutet auf einen möglichen Zusammenhang von RasGAP mit dem Mechanismus der Autophagie hin. Wie bereits erwähnt, war zudem in einem Yeast Two Hybrid Screen die Akt Kinase als Interaktionspartner des N-terminalen Teils von RasGAP identifiziert worden (Yue *et al.*, 2004). Die Bindung von RasGAP wird für die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt benötigt; wie unter Punkt 1.3.2.2. erläutert, ist Akt ein Element in der Signaltransduktionskette, durch die Autophagie reguliert wird. Dies macht eine Beteiligung von RasGAP an der Regulation der Autophagie denkbar.

Den aufgeführten Hinweisen zu möglichen Funktionen von *Drosophila* RasGAP im Zusammenhang mit dem *vap* Phänotyp sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation nachgegangen werden: zum einen sollte eine mögliche Rolle von RasGAP im Zusammenhang mit der Deregulation des Ras Weges über verschiedene Interaktionspartner untersucht werden, zum anderen sollten mögliche Einflüsse der *vap* Mutation auf die Zelltodmechanismen Apoptose und Autophagie identifiziert werden. Dazu wurden molekulare und genetische Interaktionen von RasGAP mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Systeme untersucht.

1.4. Systeme zur Untersuchung von molekularen und genetischen Interaktionen

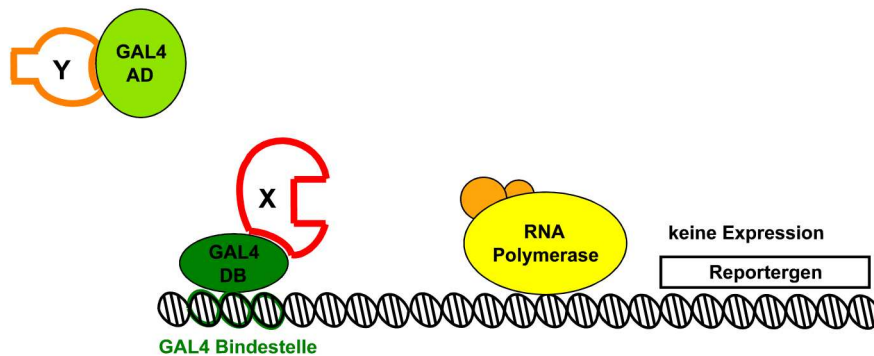
1.4.1. Yeast Two Hybrid Screen zur Untersuchung molekularer Protein/Protein Interaktionen

Da viele der Funktionen von RasGAP über Protein/Protein Interaktionen vermittelt werden, sollten Interaktionen des *Drosophila* Proteins in dieser Dissertation genauer analysiert werden. Eine häufig verwendete Methode, um bisher unbekannte Interaktionspartner eines Proteins zu identifizieren, ist der Yeast Two Hybrid Screen. Er wurde von Fields & Song (1989) erstmals beschrieben; es handelt sich dabei um ein System, mit Hilfe dessen in Hefen die Interaktion zweier Proteine X und Y durch Wiederherstellung eines aktiven Transkriptionsfaktors identifiziert werden kann. Dabei macht man sich zunutze, dass viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen Domänen bestehen, die nur gemeinsam einen funktionsfähigen Transkriptionsaktivator bilden können. Die Hefe eignet sich gut als Modellorganismus für dieses System: die Generationszeit ist kurz, die Kulturhaltung ist einfach und kostengünstig, und es existieren zahlreiche auxotrophe Mutationen, die als Selektionsmarker für Plasmidmanipulationen dienen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam das ProQuest™ Two Hybrid System von Invitrogen zum Einsatz. Der hier benutzte *GAL4* Transkriptionsfaktor aus *Saccharomyces cerevisiae* (im verwendeten Hefestamm ist das *GAL4* Gen deletiert) besteht aus einer DNA-Binde-Domäne (DB) und einer Aktivierungsdomäne (AD). Diese können physikalisch getrennt voneinander vorliegen, sind dann aber nicht aktiv. Werden sie in räumliche Nähe zueinander gebracht, wird der funktionelle Transkriptionsfaktor rekonstituiert. Dies kann durch Interaktion zweier Fusionsproteine geschehen: eines beinhaltet die DNA-Binde-Domäne (DB), fusioniert an ein Protein von Interesse (DB-X, auch „Köder“ genannt), das andere die Aktivierungs-Domäne, fusioniert an ein zweites Protein (AD-Y, „Beute“ oder „Zielprotein“ genannt). Durch Interaktion von (DB-)X und (AD-)Y wird der funktionelle Transkriptionsfaktor aus DB und AD wieder zusammengesetzt.

Um einen Screen nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern eines Proteins durchzuführen, wird dieses Protein (X) in einem entsprechenden Vektor hinter die DB kloniert und auf Interaktion mit Klonen aus einer cDNA Bibliothek, fusioniert an die AD, gescreent. Dies geschieht mit Hilfe von auf den Chromosomen integrierten Reportergenen, die von Promotoren getrieben werden, die die relevanten DB Bindestellen enthalten und die nur bei Interaktion des Proteins X mit einem Protein Y aus der Bibliothek abgelesen werden (Abb. 10).

A



B

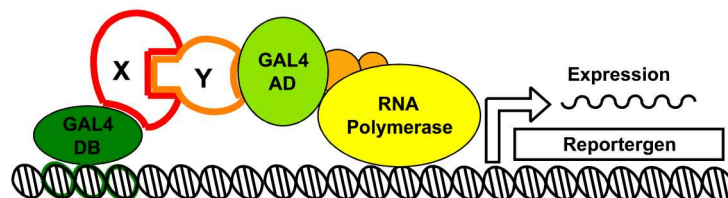


Abb. 10: Grundlage des Two Hybrid Systems.

Das GAL4 DB-X Fusionsprotein und das GAL4 AD-Y Fusionsprotein werden in Hefezellen exprimiert. Wenn X und Y nicht interagieren, kann das GAL4 AD-Y Fusionsprotein nicht an den Promoter translozieren und die Transkription wird nicht aktiviert **(A)**. Interagieren X und Y, wird das GAL4 AD-Y Fusionsprotein zum Promoter transloziert und die Transkription von Reportergenen aktiviert **(B)**.

(Schema bearbeitet nach ProQuest™ Two Hybrid Benutzerhandbuch)

Die Bibliothek wird dabei gewonnen aus dem mRNA Pool der im interessierenden Gewebe exprimierten Gene. Gegebenenfalls identifizierte potentielle Interaktionen müssen zunächst mit Hilfe weiterer Versuche wie Co-Immunopräzipitation verifiziert werden. Bei positivem Ergebnis dieser *in vitro* Versuche muss die biologische Relevanz anschließend *in vivo* nachgewiesen werden.

Dies kann beispielsweise durch Untersuchung genetischer Interaktionen geschehen. Neben den Auswirkungen direkter physikalischer Interaktionen können auch indirekte Interaktionen von Genprodukten auf diese Weise untersucht werden, indem man die Gendosis der entsprechenden Proteine manipuliert und die Auswirkungen analysiert.

1.4.2. *UAS/GAL4* System zur Untersuchung genetischer Interaktionen durch Beeinflussung der Gendosis

Seit vielen Jahren wird in *Drosophila melanogaster* zur Untersuchung der Funktion eines bestimmten Genprodukts die Missexpression des Gens mit Hilfe des *UAS/GAL4* Systems verwendet (Brand & Perrimon, 1993). Dazu wird die cDNA Sequenz des Gens von 5' nach 3' in den pUAST Vektor kloniert, dieser in Fliegen-Embryonen injiziert und unter Verwendung einer Transposase ins Fliegen-genom integriert. Durch mehrere Kreuzungsschritte werden stabile Fliegenlinien etabliert, welche das *UAS* Konstrukt tragen. Durch Kreuzung mit *GAL4* Linien kann die Expression des Konstrukts in den Nachkommen in verschiedenen Geweben ausgelöst werden. Die Folgen dieser Missexpression lassen möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion des Genprodukts zu. Zudem wird die Methode verwendet, um durch Expression entsprechender Konstrukte die Funktion eines mutierten Gens wiederherzustellen oder die Bedeutung einzelner Teile des Proteins im Rahmen einer funktionellen Analyse zu untersuchen. Auch die Auswirkungen der Beeinflussung der Gendosis eines vermutlichen (direkten oder indirekten) Interaktionspartners oder eines mutmaßlich mit der Funktion des mutierten Gens in Zusammenhang stehenden Proteins lassen sich so analysieren.

Eine relativ neue Methode, um die durch den Funktionsverlust eines Gens entstehenden Effekte zu untersuchen, ist die RNA Interferenz (RNAi) (Fire *et al.*, 1998). Dabei wird in den untersuchten Organismus eine doppelsträngige RNA eingebracht, die komplementär zum untersuchten Gen ist. Dies induziert den Abbau der komplementären mRNA Sequenz, so dass die Expression des Gens posttranskriptionell inhibiert wird. Für die Verwendung dieser Methode gibt es in *Drosophila* den Vektor pWIZ (Lee & Carthew, 2003), der auf pUAST basiert und die einfache Klonierung eines *UAS-RNAi* Konstrukts ermöglicht. Dazu muss auf beiden Seiten eines auf dem Vektor vorhandenen Introns eine kurze Sequenz (500-700bp) aus dem untersuchten Gen in jeweils entgegengesetzter Orientierung eingefügt werden. Injektion des Konstrukts, Etablierung stabiler Linien und Expression durch *GAL4* Treiber erfolgen analog zu einem pUAST Konstrukt. Bei der Transkription bilden die komplementären Sequenzen eine Haarnadelstruktur aus, wobei die Haarnadelbildung durch das Intron erleichtert wird. Die entstehende doppelsträngige RNA löst den Abbau der mRNA und damit die Unterdrückung der Expression des Gens aus.

Die beschriebenen Methoden wurden neben anderen im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet, um das der *vap* Neurodegenerationsmutante zugrunde liegende RasGAP aus *Drosophila melanogaster* bezüglich seiner molekularen und genetischen Interaktionen entsprechend der folgenden Zielsetzung genauer zu charakterisieren.

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Die Ergebnisse einer in vorangegangenen Arbeiten durchgeführten und im Rahmen dieser Arbeit bestätigten und erweiterten **funktionellen Analyse** deuten auf eine besondere Bedeutung des N-terminalen, für Protein/Protein Interaktionen benötigten Teils von RasGAP hin. Deshalb sollten in einem **Yeast Two Hybrid Screen** neue Interaktionspartner des Proteins beziehungsweise seiner SH3 Domäne aus einer *Drosophila melanogaster adult head cDNA* Bibliothek identifiziert werden.

Da der beobachtete Einfluss der Interaktions Domänen jedoch auch auf die Auswirkungen indirekter Interaktionen zurückzuführen sein könnte, sollten auch solche analysiert werden. Zunächst sollte ein möglicher Einfluss der vorhandenen **Gendosis von Crk**, eines eventuellen Konkurrenten von RasGAP um Bindestellen am EGFR, untersucht werden. Dazu wurden *UAS-Crk* und *UAS-Crk-RNAi* Fliegenlinien hergestellt, auf ihre Funktionalität überprüft und die Auswirkungen ihrer Expression im wildtypischen und im *vap* mutanten Hintergrund beobachtet.

Weiters sollte eine mögliche Rolle des **N-terminalen Teils von RasGAP als genereller Überlebensfaktor** untersucht werden. Dazu wurde ein Modellsystem entwickelt, mit dem Apoptose induziert und eine eventuelle Rettung durch Expression bestimmter Faktoren beobachtet werden kann.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten **genetische Interaktionen mit Elementen des PI3K/Akt/TOR Signalweges und der S6K** mittels Untersuchung ihres Einflusses auf den Neurodegenerations-Phänotyp in *vap* Mutanten charakterisiert werden. Dazu wurde ihre Gendosis durch Expression verschiedener Konstrukte im mutanten Hintergrund verändert und die Auswirkung durch Quantifizierung der Neurodegeneration in Paraffinschnitten untersucht.

Schließlich sollten **genetische Interaktionen mit der *car*¹ Mutation** analysiert werden, die möglicherweise eine Bedeutung für den in *vap* Mutanten beobachteten autophagischen Zelltod besitzt. Dazu wurde die Ausprägung verschiedener Phänotypen in Fliegenlinien mit oder ohne die *car*¹ Mutation im *vap*¹ mutanten Hintergrund verglichen.

Die zur Durchführung der Versuche verwendeten Materialien und Methoden werden im nächsten Teil dieser Arbeit aufgeführt. Im Anschluss werden die erzielten Ergebnisse beschrieben und schließlich im letzten Teil der Arbeit diskutiert.

MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Enzyme, Standards, Kits, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1.1. Enzyme, Standards und Kits

Bezeichnung	Hersteller	Beschreibung
Big Dye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City/USA	Kit für die DNA-Sequenzierreaktion
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	Fermentas International Inc., Ontario/Kanada oder New England Biolabs, Ipswich/USA	Enzym für die 5'-Dephosphorylierung von DNA
DNA ladder (100bp oder 1kb)	New England Biolabs, Ipswich/USA	Größenstandard für Agarosegel-Elektrophorese von DNA
pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega Corporation, Madison/USA	Kit für die Klonierung von PCR-Fragmenten
Proteinase K	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland	Enzym für den Protein-Abbau in Einzelfliegen-DNA-Präparationen
QIAfilter [®] Plasmid Midi Kit/ QIAfilter [®] Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden/Deutschland	Kits für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (verschiedene Maßstäbe)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden/Deutschland	Kit für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen
QuantiTect [®] Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden/Deutschland	Kit für die Reverse Transkription von RNA (enthält auch DNase)
Restriktionsenzyme	Fermentas International Inc., Ontario/Kanada oder New England Biolabs, Ipswich/USA	Enzyme für das Schneiden doppelsträngiger DNA innerhalb spezifischer Basensequenzen
RNase	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland	Enzym für die Entfernung von RNA aus DNA-Präparationen
RNeasy [®] Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden/Deutschland	Kit für die Isolierung von RNA aus Geweben
Taq-Polymerase	Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie, Universität Regensburg/Deutschland	Enzym für die Amplifizierung von DNA mittels PCR
T4-DNA-Ligase	Fermentas International Inc., Ontario/Kanada oder New England Biolabs, Ipswich/USA	Enzym für die Zusammenfügung doppelsträngiger DNA-Stücke

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Enzyme, Standards und Kits.

Alle Enzyme, Standards und Kits wurden gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.1.1.2. Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Applied Biosystems, Foster City/USA; Arkema, Colombes Cedex/Frankreich; BD Biosciences, San Jose/USA; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf/Deutschland; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington/USA; Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA; Mallinckrodt Baker B.V., Deventer/Niederlande; Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland; peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/Deutschland; qbiogen, Morgan Irvine/USA; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland; Sigma-Aldrich, St. Louis/USA; USB Corporation, Cleveland/USA. Oligonukleotide wurden von der Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA oder von Sigma-Aldrich, St. Louis/USA bezogen.

2.1.1.3. Verbrauchsmaterialien

Es wurden von folgenden Firmen hergestellte Verbrauchsmaterialien verwendet: Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/Deutschland; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen/Deutschland; Equibio Ltd., Ashford/UK; GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel/Deutschland; Duran Group GmbH, Mainz/Deutschland; Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland; GLW[®] Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg/Deutschland; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen/Deutschland; Kimberly-Clark, Dallas/USA; Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen/Deutschland; Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig/Deutschland; Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland; Nalge Nunc International, Rochester/USA; Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago/USA; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/Deutschland; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht/Deutschland; Schleicher & Schuell GmbH, Dassel/Deutschland; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen/Schweiz; VWR International GmbH, Darmstadt/Deutschland; Whatman plc, Maidstone/UK.

2.1.1.4. Geräte

Es wurden Geräte folgender Hersteller verwendet: A. Dumont & Fils, Montignez/Schweiz; Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf/Deutschland; Alpha Innotech Corporation, San Leandro/USA; Amersham plc, Little Chalfont/UK; B. Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland; Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen/Deutschland; Biorad Laboratories, Hercules/USA; Biospec Products Inc., Bartlesville/USA; Enodis plc, London/UK; Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland; GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel/Deutschland; Gilson Inc., Middleton/USA; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach/Deutschland; Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim/Deutschland; Heraeus Holding GmbH, Hanau/Deutschland; Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen/Deutschland; KGW Isotherm, Karlsruhe/Deutschland; Kika Labortechnik, Staufen/Deutschland; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch/Deutschland; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar/Deutschland; Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg/Deutschland; Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach/Deutschland; Mettler Toledo GmbH, Greifensee/Schweiz; Millipore, Billerica/USA; MWG Biotech AG, Ebersberg/Deutschland; Sartorius AG, Göttingen/Deutschland; Thermo Fisher Scientific Inc./Centrifugation (Sorvall) oder /Heating Instruments (Varioklav), Waltham/USA; Stratagene, La Jolla/USA; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena/Deutschland.

2.1.2. Puffer, Lösungen und Medien

2.1.2.1. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhalt/Herstellung	Verwendung
Acetat-Lösung	5M KAc pH4,8 einstellen mit Eisessig	Miniprep Bakterien (Neutralisierung)
Alkali-SDS (Bakterien)	0,2M NaOH 1% SDS (w/v)	Miniprep Bakterien (alkalische Lyse)
Alkali-SDS (Hefen)	0,2M NaOH 3% SDS (w/v)	Y2H (Miniprep Hefen)
Carnoy	60% EtOH (v/v) 30% Chloroform (v/v) 10% Eisessig (v/v)	Paraffinschnitte (Fixierung)
GTE	0,05M Glucose 0,025M Tris/HCl pH8,0 0,01M EDTA pH8,0	Miniprep Bakterien (Resuspension des Zellpellets)
Injektionspuffer, 10x	0,05M KCl 0,001M NaPO ₄ pH6,8	Keimbahntransformation (Verdünnung der DNA)
Ladepuffer, 6x	50% Glycerol (v/v) 0,001M EDTA pH8,0 0,25% Bromphenolblau (w/v) 0,25% Xylencyanol (w/v)	Agarosegel-Elektrophorese (Ladepuffer für DNA-Proben)
LSB, 10x	0,2M Tris/HCl pH8,75 0,1M KCl 0,1M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,02M MgSO ₄ 1mg/ml BSA	PCR (Reaktionspuffer)
PEG/LiAc	1x TE 40% PEG ₃₃₅₀ (w/v) 0,1M LiAc	Y2H (Transformation von Hefen)
PPSö pH7,4	0,2M Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O 0,2M KH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Semidünnschnitte (Präparation, Waschen)
Squishing Buffer	0,01M Tris/HCl pH8,2 0,001M EDTA pH8,0 0,025M NaCl 0,2mg/ml Proteinase K (frisch zugegeben)	Isolierung von Einzelfliegen-DNA (Homogenisierung der Fliegen und Protein-Abbau)
TAE, 50x	2M Tris/HCl pH7,5 1M Eisessig 0,05M EDTA pH8,0	Agarosegel-Elektrophorese (Herstellung und Lauf des Gels)
TE, 10x	0,1M Tris/HCl pH7,5 0,01M EDTA pH8,0	Y2H (Transformation von Hefen)
TE/LiAc	1x TE 0,1M LiAc	Y2H (Transformation von Hefen)
Toluidinblau-Färbelösung, 5x	1% Toluidinblau (w/v) 1% Di-Natrium-Tetraborat (w/v)	Semidünnschnitte (Toluidinblau-Färbung)
Träger-DNA	2mg/ml in H ₂ O _{Miliq}	Y2H (Transformation von Hefen)
X-Gal	100mg/ml in DMF	Y2H (X-Gal-Assay)
Z-Puffer	0,06M Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O 0,04M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,001M KCl 0,001M MgSO ₄ x 7H ₂ O	Y2H (X-Gal-Assay)

Z-Puffer/X-Gal-Lösung	10ml Z-Puffer 100µl X-Gal 60µl β-Mercaptoethanol	Y2H (X-Gal-Assay)
-----------------------	--	-------------------

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Alle Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{MiliQ} hergestellt. Mehrfachpuffer wurden zum Gebrauch jeweils auf 1x verdünnt.

2.1.2.2. Medien

Bezeichnung	Inhalt/Herstellung	Verwendung
<i>Drosophila</i> Medium	8,0% Maismehl (w/v) 8,0% Malzextrakt (w/v) 2,2% Rübensirup (v/v) 1,8% Hefe (w/v) 1,0% Sojamehl (w/v) 0,8% Agar (w/v) 0,3% Nipagin in EtOH (w/v)	Haltung von Fliegenstämmen, Kreuzungen, Alterungsversuche
Eiablage-/ Saftagar-Platten	25% Apfelsaft (v/v) 2,5% Sucrose (w/v) 1,75% Agar (w/v) 0,15% Nipagin in EtOH (w/v)	Eiablage und Embryonalentwicklung während der Keimbahntransformation
LB-Medium	10g Bacto Tryptone 5g Bacto Yeast Extract 5g NaCl in 1l destilliertem Wasser lösen, pH7,0 mit 1N NaOH einstellen, autoklavieren; (eventuell nach dem Autoklavieren Zugabe von steriler Antibiotika-Lösung, siehe Tab. 5)	Medium zum Wachstum von Bakterien
SC-Medien	6,7g Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 1,4g Yeast synthetic dropout medium supplement w/o His, Leu, Trp, Ura in 950ml destilliertem Wasser lösen, pH5,6 mit 1N NaOH einstellen, autoklavieren; nach Abkühlen des autoklavierten Mediums auf circa 50°C Zugabe von: 50ml Glucose (40%; sterilfiltriert) und je nach untersuchter Auxotrophie zusätzlich folgender sterilfiltrierter Lösungen: 10ml Uracil (2g/l) 10ml Leucin (10g/l) 10ml Tryptophan (4g/l) 10ml Histidin (10g/l) 10-100ml 3-AT (1M)	Selektionsmedien zum kontrollierten Wachstum von Hefen mit bestimmten Selektionsmarkern
YPDA-Medium	20g Bacto Peptone 20g Glucose 10g Bacto Yeast Extract 0,1g Adenin-Hemisulfat in 1l destilliertem Wasser lösen, pH6,0 mit 1N HCl einstellen, autoklavieren	reichhaltiges Medium zum standardmäßigen Wachstum von Hefen

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Medien.

Alle Medien wurden mit einfach destilliertem Wasser hergestellt. Zur Herstellung von Platten der aufgeführten Bakterien- und Hefe-Medien wurden vor dem Autoklavieren je Liter 20g Agar zugegeben.

2.1.3. Software

2.1.3.1. Allgemeine Software

Die vorliegende Arbeit wurde in Microsoft® Word 2000 (Microsoft Corporation, Redmond/USA) geschrieben, Graphen wurden in Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond/USA) erstellt. Zur Darstellung von Kreuzungsschemata und Vektorkarten wurde das Programm Microsoft® Office Visio® 2003 (Microsoft Corporation, Redmond/USA) benutzt, zur Bildbearbeitung Adobe® Photoshop® 6.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA). Schematische Darstellungen von Signaltransduktionswegen und ähnliche Abbildungen wurden unter Verwendung des Harvard Designer (Software Publishing Corporation, Amherst/USA) generiert oder mit Hilfe von Adobe Reader 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA) aus Pdf-Dokumenten entnommen. Internetrecherche wurde unter Verwendung von Mozilla Firefox (Mozilla Corporation, Mountain View/USA) betrieben.

2.1.3.2. Spezielle Programme

Oligonukleotide wurden unter Verwendung von Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto/USA) entworfen. Sequenzdaten wurden mit Hilfe von Lasergene® V5 (DNAStar, Madison/USA) und BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda/USA) analysiert. Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden unter Zuhilfenahme der Intas Camera Control V2.05 (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen/Deutschland) aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung des Programms analySIS 2.1 (SoftImaging Software GmbH, Münster/Deutschland). Zur statistischen Auswertung der Daten aus dem Phototaxis-Versuch wurde das Programm Graphpad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla/USA) verwendet; es wurde Normalverteilung der Daten angenommen und ein *two-tailed paired t-Test* durchgeführt.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Isolierung von DNA oder RNA aus *D. melanogaster*

2.2.1.1. Isolierung von Einzelfliegen-DNA aus *D. melanogaster*

Zur **Isolierung der genomischen DNA aus einer einzelnen Fliege** nach dem Protokoll von Gloor & Engels (1992) wurde diese betäubt und in ein 500µl-Eppi überführt; dort wurde sie mit Hilfe einer Pipettenspitze, die 50µl Squishing Buffer enthielt, homogenisiert und dann in dem Puffer für ungefähr 30min. bei 37°C inkubiert. Die im Puffer enthaltene Proteinase K wurde anschließend durch Erhitzen auf 95°C für 2min. inaktiviert. Durch Zentrifugation bei 13.000rcf und RT für 1min. wurde die Präparation von den Fliegenresten gereinigt; die im Überstand enthaltene DNA hatte eine Konzentration von circa 0,1µg/µl und konnte als Vorlage in eine PCR-Reaktion (siehe Abschnitt 2.2.2.2.) eingesetzt werden.

2.2.1.2. Isolierung der Gesamt-RNA aus *D. melanogaster*

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus 150 Köpfen beziehungsweise 20-30 Körpern oder ganzen Fliegen erfolgte unter Verwendung des **RNeasy® Mini Kit**; dazu wurde das schockgefrorene Gewebe mit Hilfe eines BioVortexer™ mit Mikrohandrührer in 600µl RLT-Puffer/β-Mercaptoethanol (siehe Protokoll zum Kit) homogenisiert. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde in 30µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C aufbewahrt; die Konzentration betrug ungefähr 0,5µg/µl.

2.2.1.3. Bestimmung von Konzentration und Reinheit von RNA

Zur **photometrischen Bestimmung** der Konzentration und der Reinheit der RNA-Extraktion wurde ein Teil des Eluats in Wasser 1:20 verdünnt und die Absorption in einer Quarzküvette bei 260nm (A_{260nm}) und 280nm (A_{280nm}) Wellenlänge gemessen. Bei 260nm absorbieren Nukleinsäuren, bei 280nm Proteine. Das Verhältnis A_{260nm}/A_{280nm} spiegelt die Verunreinigung der Extraktion mit Proteinen wider und sollte bei einem Wert zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Aus der A_{260nm} kann die Konzentration der RNA berechnet werden: eine optische Dichte von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40µg/ml (Ausubel *et al.*, Appendix 3D, 2006).

2.2.2. Reverse Transkription, PCR und Genexpressionsanalyse

2.2.2.1. DNase-Verdau und Reverse Transkription von RNA

Die Reverse Transkription der in einer RNA-Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.1.2.) enthaltenen mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des **QuantiTect® Reverse Transcription Kit**. Der erste Schritt des Protokolls, eine Inkubation mit gDNA wipeout buffer, diente der Entfernung eventuell mitisolierter genomischer DNA. In einem 20µl-Ansatz wurde jeweils 1µg RNA eingesetzt, die Reaktion wurde in einem dünnwandigen 500µl-Eppi im T3 Thermocycler durchgeführt.

2.2.2.2. PCR

Zur Amplifizierung von DNA mittels PCR (Saiki *et al.*, 1988) wurden folgende **Ansätze** in dünnwandige 500µl-Eppis pipettiert:

16,5 µl	H ₂ O _{MilliQ}
2,5 µl	10x LSB
2 µl	DNA (50ng/µl)
1 µl	dNTPs (10mM)
1 µl	sense Primer (10µM)
1 µl	antisense Primer (10µM)
1 µl	Taq-Polymerase

Das folgende **Programm** wurde in einem T3 Thermocycler durchlaufen:

95°C	5min.	(vollständige Denaturierung des DNA-Doppelstrangs)
95°C	1min.	(Denaturierung des DNA-Doppelstrangs)
46-64°C*	1min.	bis zu 33x (Anlagerung der Primer an die DNA-Vorlage)
72°C	1min.	(Elongation der DNA-Stücke)
72°C	10min.	(Vervollständigung der amplifizierten Stücke)

*je nach *Annealing*-Temperatur des Primer-Paars, siehe Tab. 4 und 6.

Diese Methode kann einfach zur **Vermehrung** von spezifischen DNA-Stücken, beispielsweise für eine Klonierung (siehe Abschnitt 2.2.3.4), eingesetzt werden. Als Vorlage kann dabei eine aus einer genomischen Extraktion gewonnene DNA dienen (siehe Abschnitt 2.2.1.1.) oder ein bestellter cDNA-Klon (siehe Abschnitt 2.2.3.4).

2.2.2.3. Semi-quantitative RT-PCR zur Genexpressionsanalyse

Die Polymerase-Ketten-Reaktion kann auch zur **Genexpressionsanalyse** verwendet werden; hierbei wird als Vorlage cDNA eingesetzt, die in einer RNA-Präparation mit anschließender Reverser Transkription gewonnen wurde (siehe Abschnitte 2.2.1.2. und 2.2.2.1.). Die Menge der cDNA für ein Gen entspricht der ursprünglich vorhandenen mRNA-Menge. Je mehr cDNA-Vorlage in einem PCR-Ansatz vorhanden ist, desto früher

wird eine Produktmenge erreicht, die als Bande auf einem Agarosegel sichtbar ist. Anhand von Auftreten beziehungsweise Intensität der Banden nach Amplifikation der cDNA-Vorlage mit genspezifischen Primern kann somit ungefähr auf die Expressionsstärke des jeweils untersuchten Gens rückgeschlossen werden.

Zur Durchführung einer stark vereinfachten Form einer solchen **semi-quantitativen PCR** (Gilliland *et al.*, 1990) wurden Triplikate der oben genannten Ansätze getrennt pipettiert und der PCR-Reaktion unterzogen (siehe Abschnitt 2.2.2.2.); diese wurde jedoch nach 15, 22 oder 33 Zyklen durch Entnahme des Eppis und Abkühlung auf Eis abgebrochen. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.3.3.) und die Menge mit derjenigen aus der Amplifikation einer Kontroll-cDNA mit denselben genspezifischen Primern (Tab. 4) verglichen. Parallel wurde dieselbe Reaktion unter Verwendung von Primern für ein sogenanntes Haushaltsgen mitgeführt, das stets dieselbe Expressionsstärke besitzt; sie diente als interne Kontrolle für die tatsächlich eingesetzte gesamte cDNA-Menge.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur	Verwendung
rp49_A	CCAAGGACTTCATCCGCCACC	55°C	Haushaltsgen; interne Kontrolle für vorhandene cDNA-Menge
rp49_B	GCGGGTGCCTTGTTCGATCC	55°C	
Crk-RNAi_BgIII_s	<i>CGAAGATCTCTGCGTGTAGAAGGGTGG</i>	55°C	Überprüfung der Expressionsstärke von <i>Crk</i> nach Überexpression eines <i>UAS-Crk</i> Konstrukts mit <i>actin-GAL4</i>
Crk-RNAi_XhoI_as	<i>CGACTCGAGATTCAACGTGCGTGAAGG</i>	55°C	

Tab. 4: Auflistung der für die Genexpressionsanalyse verwendeten Primer. *kursiv*: angefügte Schnittstellen; *grau*: eingefügte Basen (siehe Abschnitt 2.2.3.4.).

Durch Vergleich von Auftreten und Intensität der Banden konnte eine erhöhte oder erniedrigte Expressionsstärke des Gens in den untersuchten Fliegen im Vergleich zu Kontrolltieren abgeschätzt werden.

2.2.3. Klonierung und Sequenzierung

2.2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (*E. coli* XL1-blue, Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F'[pro AB⁺, lacI^q lacZΔM15 Tn10 (tet^r)*) erfolgte mittels **alkalischer Lyse** gemäß dem Protokoll von Birnboim & Doly (1979) aus einer Über-Nacht-Kultur einer Einzelkolonie, die in 2-3ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Tab. 5) unter Schütteln bei 230rpm in einem Reagenzglas für ungefähr 16h bei 37°C gewachsen war. Von dieser Kultur wurde 1ml in einem Eppi mit 15.000rcf bei RT für 20sek. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zell-Pellet in 100µl GTE resuspendiert und für 5min. bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200µl frischer Alkali-SDS-Lösung und Inkubation für 5min. auf Eis wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden

zur Neutralisierung 150µl Acetat-Lösung zugefügt und die Mischung nach Inkubation für 5min. auf Eis mit 15.000rcf bei RT für 2min. zentrifugiert; renaturierte Plasmid-DNA blieb dabei im Überstand, während denaturierte chromosomale DNA und Proteine präzipitiert wurden.

Bezeichnung	Selektionsmedium	Antibiotikakonzentration	Verwendung	Herkunft/Referenz
pBlueskriptSK(-)	LB _{Amp}	Ampicillin, 50mg/l	Vektor für <i>Crk</i> cDNA-Klon	Stratagene
pDBLeu	LB _{Kan}	Kanamycin, 25mg/l	Y2H: Herstellung des Köder-Plasmids (durchgeführt von M. Mark, 2005)	Invitrogen Corporation
pEXP-AD502	LB _{Amp}	Ampicillin, 50mg/l	Y2H: Herstellung der Bibliothek (Invitrogen Corporation)	Invitrogen Corporation
pGEM-T-Easy	LB _{Amp}	Ampicillin, 50mg/l	Klonierung von PCR-Fragmenten	Promega Corporation
pPC86	LB _{Amp}	Ampicillin, 50mg/l	Y2H: Kontrolltransformation von Hefen	Invitrogen Corporation
pUAST	LB _{Amp}	Ampicillin, 50mg/l	Keimbahntransformation: Herstellung von <i>UAS</i> Konstrukten	Brand & Perrimon, 1993
pWIZ	LB _{Amp}	Ampicillin, 50mg/l	Keimbahntransformation: Herstellung von <i>UAS-RNAi</i> Konstrukten	Lee & Carthew, 2003

Tab. 5: Auflistung der zur Transformation von Bakterien verwendeten Vektoren.

Aus dem in ein neues Eppi überführten Überstand konnte die Plasmid-DNA mittels Zugabe von 900µl 99% EtOH, Inkubation für mindestens 5min. auf Eis und anschließende Zentrifugation für 5min. ausgefällt werden. Nach Waschen mit 900µl 70% EtOH konnte das getrocknete DNA-Pellet in 50µl sterilem H₂O_{MiliIQ} gelöst werden; die Konzentration betrug in etwa 0,5µg/µl.

Um größere Mengen Plasmid-DNA mit höherer Reinheit zu gewinnen, wurden Midi-Präparationen mit Hilfe des **QIAfilter® Plasmid Midi Kits** durchgeführt; zunächst wurden dafür Einzelkolonien in 2-3ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und für 8h bei 37°C geschüttelt. Mit 100µl dieser Vorkultur wurden 75ml-Kulturen angeimpft und nach Wachstum ün geerntet. Die Präparation erfolgte gemäß Protokoll; die DNA wurde in 100µl sterilem H₂O_{MiliIQ} eluiert, die Konzentration betrug ungefähr 2µg/µl.

2.2.3.2. Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Enzymatische Verdaus von DNA (Ausubel *et al.*, Unit 3.1, 1995) wurden zu Testzwecken in einem Volumen von 20µl, für präparative Zwecke in 80µl-Ansätzen gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers unter Zugabe von RNase (ad 25ng/µl) angesetzt und für 2h bei 37°C inkubiert. Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Hitzeinaktivierung des Enzyms oder Auftragung auf ein Agarosegel und Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.3.3.).

Um Religationen zu verhindern, wurden mit nur einem Enzym verdaute Vektoren vor der Ligation „gezippt“, das heißt, mittels Inkubation mit einer **alkalischen Phosphatase** wurden Phosphate am 5'-Ende entfernt (Ausubel *et al.*, Unit 3.10, 1987). Die Reaktion erfolgte in einem 30µl-Ansatz für 2x 15min. gemäß den Angaben des Herstellers und wurde durch Auftragung des Ansatzes auf ein Agarosegel, Gelelektrophorese und anschließende Extraktion der DNA abgestoppt (siehe Abschnitt 2.2.3.3.).

2.2.3.3. Agarosegel-Elektrophorese und Gelextraktion

DNA-Proben wurden auf 1%igen (w/v) **Agarosegelen** aufgetrennt, die mit 1x TAE hergestellt wurden (McDonnell *et al.*, 1977). Nach Auflösung der Agarose im Puffer mittels Aufkochen in der Mikrowelle wurde zur späteren Sichtbarmachung der DNA Ethidiumbromid ad 1mg/l zugegeben und das Gel gegossen. Das Aushärten dauerte in etwa 30min., anschließend wurde das Gel mit 1xTAE als Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen; in eine Tasche wurde ein DNA-Größenstandard geladen. Nach **Elektrophorese** bei 90-120V für 45-90min. (zur optimalen Separation der Banden bei 20V üN) wurde die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

Aus präparativen Gelen wurden die entsprechenden DNA-Banden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des **QIAquick® Gel Extraction Kit** gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und in 50µl sterilem H₂O_{MiliQ} eluiert.

2.2.3.4. Herstellung von Insert-DNA und Ligation

Zur Herstellung rekombinanter Plasmid-DNA wurde geschnittener (und eventuell gezippter) Vektor mit kompatibler Insert-DNA gemäß den Herstellerangaben in einem 500µl-Eppi ligiert (Ausubel *et al.*, Unit 3.16, 1987). Die **Insert-DNA** wurde entweder direkt durch Verdau aus einem bestellten cDNA-Klon (*Crk*-cDNA in pBluescriptSK(-), Klonnummer LD08427, Berkeley Drosophila Genome Project) oder mittels PCR (siehe Abschnitt 2.2.2.2.) durch Amplifikation des gewünschten DNA-Stücks aus der bestellten cDNA oder aus selbst isolierter Einzelfliegen-DNA (siehe Abschnitt 2.2.1.1.) gewonnen. Dabei wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 6), die eventuell Restriktionsschnittstellen anfügten. Zur Vermeidung von Rasterverschiebungen beziehungsweise zur Verbesserung der Zugänglichkeit von Restriktionsenzymen wurden, falls nötig, zusätzliche Basen in die Primer-Sequenzen eingefügt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur	Verwendung
Crk-RNAi_sense	CGATCTAGACTGCGTGTAGAAGGGTGG	60°C	Klonierung des <i>UAS-Crk-RNAi</i> -Konstruktes über XbaI / NheI
Crk-RNAi_antisense	AGCTCTAGAATTC AACGTGCGTGAAGG	60°C	
Crk-RNAi_BglII_s	CGAAGATCTCTGCGTGTAGAAGGGTGG	60°C	Klonierung des <i>UAS-Crk-RNAi</i> -Konstruktes über BglII und XhoI
Crk-RNAi_XhoI_as	CGACTCGAGATTCAACGTGCGTGAAGG	60°C	
RasGAP_cDNA (s)	ACGCGTCGACATGCGCGACCTAATACATTTGGGAAAC	56°C	Klonierung des Konstrukts RasGAP_cDNA in pDBLeu (durchgeführt von M. Mark, 2005)
RasGAP_cDNA2 (as)	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGCTGATCATCTCGCGATACTTCAG	56°C	
SH3_Sall (s)	ACGCGTCGACATCCTGCCTTACAC	52°C	Klonierung des Konstrukts RasGAP_SH3 in pDBLeu (durchgeführt von M. Mark, 2005)
SH3_NotI (as)	ATAAGAATGCGGCCGCATCGATAGATACATC	52°C	

Tab. 6: Auflistung der zur Amplifikation von DNA-Stücken für anschließende Klonierung verwendeten PCR-Primer. *kursiv*: angefügte Schnittstellen; *grau*: eingefügte Basen.

Die aus einem Agarosegel isolierten Stücke wurden unter Verwendung des **pGEM[®]-T Easy Vector System** in diesen Vektor subkloniert (siehe Protokoll zum Kit) und durch Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.2.3.2.) und Gelextraktion (siehe Abschnitt 2.2.3.3.) isoliert.

Der 10µl-**Ligationsansatz** enthielt jeweils circa 50ng Vektor-DNA und die etwa dreifache Menge an Insert-Molekülen (berechnet anhand der Größenverhältnisse von Vektor und Insert) und wurde üN bei 4°C inkubiert.

2.2.3.5. Transformation von *E. coli*

Die Einbringung der DNA in Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock-Transformation oder Elektroporation. Bei der **Hitzeschock-Transformation** in Anlehnung an das Protokoll von Mandel & Higa (1970) wurden 1-5µl Plasmid-DNA zu 200µl Hitzeschock-kompetenten Zellen pipettiert, die zuvor vorsichtig auf Eis angetaut worden waren. Nach Inkubation auf Eis für 15-20min. erfolgte der Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 1min., anschließend wurde der Ansatz für 15min. auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800µl LB-Medium ohne Antibiotikum konnten die transformierten Zellen für 45min. bei 37°C unter Schütteln hochwachsen, dann wurden sie auf entsprechende Selektionsplatten (siehe Tab. 5) mit Hilfe eines Drygalski-Spatels oder von Glasperlen (2,85-3,30mm Durchmesser) ausplattiert. Die Platten wurden üN bei 37°C inkubiert.

Vor der **Elektroporation** (Shigekawa & Dower, 1988) musste die DNA zur Entfernung von Salzen durch Phenolisierung und Fällung gereinigt werden. 1-5µl dieser DNA wurden zu 40µl angetauten elektrokompenten Zellen pipettiert. Diese Mischung wurde in sterile Elektroporations-Küvetten überführt und im Elektroporator 1000 einem Spannungspuls von 2500V ausgesetzt. Durch Zugabe von 900µl LB-Medium wurden die transformierten Zellen aus der Küvette gespült und in ein Eppi überführt, wo sie für 45min. bei 37°C unter Schütteln hochwachsen konnten; Plattierung und Wachstum erfolgten wie nach Hitzeschock-Transformation.

2.2.3.6. Glycerolstocks von Bakterien-Kulturen

Bei Bedarf wurden von Bakterien **Glycerolstocks** (Ausubel *et al.*, Unit 1.3, 2002) angefertigt. Dazu wurden 850µl üN-Kultur in einem Schraubdeckel-Eppi mit 150µl 87% Glycerin durch Vortexen gemischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C .

2.2.3.7. DNA-Sequenzierung

Gegebenenfalls wurde zur Bestimmung der Basenfolge des isolierten Plasmids der **Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit** verwendet. Die PCR-Reaktion wurde auf Eis unter Verwendung passender Primer (Tab. 7) laut Protokoll zum Kit angesetzt und in einem T3 Thermocycler durchgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur	Verwendung
SV40	CTTAGAGCTTTAAATCTCTGTAGG	60°C	Sequenzierung von Konstrukten im pUAST- oder pWIZ-Vektor
AS2	CAACTACTGAAATCTGCCAAG	60°C	Sequenzierung von Konstrukten im pUAST- oder pWIZ-Vektor
pDBLeu_sequencing	GAATAAGTGCGACATCATCATC	60°C	Sequenzierung von Konstrukten im pDBLeu-Vektor
pPC86_sequencing	TATAACGCGTTTGAATCACT	55°C	Sequenzierung von Konstrukten im pPC86/pEXP-AD502-Vektor

Tab. 7: Auflistung der für Sequenzierungen verwendeten Primer.

Anschließend wurde die DNA mit EtOH gefällt und gewaschen und in 20µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ oder Hi-DiTM-Formamid gelöst. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte an einem Kapillarsequenzierer am Lehrstuhl Heinze der Universität Regensburg oder bei der Geneart AG, Regensburg. Zur Auswertung der Sequenzdaten wurden die Programme Lasergene[®]/Edit Seq und BLAST verwendet.

2.2.4. Yeast Two Hybrid Screen

2.2.4.1. Amplifizierung der Bibliothek

Um ausreichende DNA-Mengen der von Dr. Megan Goodwin zur Verfügung gestellten Bibliotheken (siehe Abschnitt 3.2.2.1.) für die durchzuführenden Screens zu erhalten, mussten Aliquots amplifiziert werden. Dazu wurden 20-80ng DNA mittels Elektroporation (siehe Abschnitt 2.2.3.5.) in *E. coli* Zellen eingebracht und die transformierten Zellen mit einer Dichte von circa 4×10^4 colony forming units (cfu) pro Platte (Durchmesser 15cm) auf insgesamt ungefähr 100 LB_{amp} Platten ausplattiert. Die nach Wachstum für 22h bei 30°C – die niedrige Temperatur unterstützt die Stabilisierung instabiler Klone – entstandenen konfluent gewachsenen Kolonien (insgesamt circa 5×10^6 cfu) wurden mit jeweils 5ml LB_{amp} von den Platten in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und die

Kultur für 30min. bei 30°C und 230rpm bis zu einer Dichte von ungefähr 10^{10} Zellen pro ml geschüttelt. Ein Drittel der Kultur wurde als Reserve nach Mischen mit Glycerol ad 25% schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Der Rest wurde in sterilen GS3-Bechern durch Zentrifugation für 15min. bei 4°C und 6.000rpm geerntet und die DNA aus den Zellen mit Hilfe des **QIAfilter® Plasmid Maxi Kit** gemäß Herstellerangaben isoliert und in 200µl TE-Puffer gelöst; die Konzentration betrug 0,5-5µg/µl.

2.2.4.2. Transformation von *S. cerevisiae*

Um mittels der Hefe-Zwei-Hybrid Methode Proteininteraktionen untersuchen zu können, mussten zunächst die im Vorfeld klonierten Vektoren (pDBLeu-RasGAP oder pDBLEU-SH3, siehe Abschnitt 2.2.3.), die für die entsprechenden Hybrid-Proteine codieren, in die Hefen eingebracht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hierzu die **Lithium-Acetat-Methode** verwendet (Schiestl & Gietz, 1989). Zuerst wurde in Hefen des Stammes MaV203 (Genotyp: *MAT α* , *leu2-3, 112*, *trp1-901*, *his3 Δ 200*, *ade2-101*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *SPAL10::Ura3*, *GAL1::lacZ*, *His3_{UASGAL1}::His3@LYS2*, *can1^R*, *cyh2^R*) das Köder-Plasmid mittels Transformation im kleinen Maßstab eingebracht, anschließend wurden in diese Zellen Konstrukte aus der durchsuchten Bibliothek (*Drosophila melanogaster* adulte Kopf cDNA Bibliothek, hergestellt von der Invitrogen Corporation, amplifiziert von Dr. Megan Goodwin und abermals selbst amplifiziert) mit Hilfe einer Transformation im großen Ansatz eingebracht. Diese sequentielle Transformation sollte die Transformationseffizienz gegenüber der gleichzeitigen Transformation mit zwei Plasmiden erhöhen. Natürlich musste bei allen Schritten auf eine sterile Vorgehensweise geachtet werden; während der Versuchsdurchführung wurde mehrmals mittels Mikroskopie das Vorliegen einer Kontamination der Hefe-Kulturen mit schneller wachsenden Bakterien ausgeschlossen.

Der erste Schritt war die Herstellung **kompetenter Hefe-Zellen**. Dazu wurde jeweils eine einzelne Hefe-Kolonie von einer frisch ausgestrichenen Platte in 5-10ml Medium angeimpft und bei 30°C für circa 20h unter Schütteln bei 230rpm inkubiert. Die optische Dichte bei 600nm Wellenlänge (OD_{600nm}) der Über-Nacht-Kultur wurde photometrisch festgestellt und die Hefen in 50ml YPDA-Medium auf eine OD_{600nm} von 0,5 bis 1 verdünnt. Die Zellen wurden abermals bei 30°C so lange (ungefähr 5h) geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 1,5 bis 3 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5min. bei RT und 1.000rcf geerntet und in 15ml H_2O_{MilliQ} gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1-1,5ml 1x TE/LiAc gelöst.

Zu diesen kompetenten Zellen wurden je nach Maßstab der **Transformation** unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA und weiterer Lösungen gegeben (siehe nächste Seite).

	kleiner Maßstab:	großer Maßstab:
Träger-DNA (2mg/ml)	100 µl	1 ml
Plasmid-DNA	0,1 bis 1 µg	10 bis 50 µg
kompetente Zellen	100 µl	1 ml
PEG/LiAc-Lösung	600 µl	6 ml

Anfangs wurden Träger-DNA und Plasmid-DNA gemischt; die Träger-DNA war zuvor bei 95°C für 15min. denaturiert worden. Dann wurden die kompetenten Hefen zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die PEG/LiAc-Lösung zugefügt und die Transformations-Reaktion für 30min. bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45min. im Wasserbad und darauf eine plötzliche Abkühlung für 1-2min. auf Eis. Die transformierten Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3.000rcf in der Tischzentrifuge bei RT für 3min. geerntet und in 500µl (kleiner Maßstab) oder 2,5ml (großer Maßstab) TE resuspendiert. Je 100-200µl dieser Suspension beziehungsweise verschiedener Verdünnungen wurden unter Verwendung von Glasperlen auf unterschiedliche Platten - je nach Selektionsmarker der transformierten Vektoren (Tab. 8) - ausplattiert.

Bezeichnung	Selektionsmedium	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pDBLeu	SC-Leu	Plasmid zur Herstellung des Köder-Konstruktes; enthält Gen für die DNA-Binde-Domäne	Invitrogen Corporation
pEXP-AD502	SC-Trp	Plasmid zur Herstellung der Bibliothek; enthält Gen für die Transkriptions-Aktivierungs-Domäne	Invitrogen Corporation
pPC86	SC-Trp	Kontrollplasmid zur Bestimmung der 3AT-Konzentration, die nötig ist, um basale Expression des <i>HIS3</i> -Gens zu unterdrücken	Invitrogen Corporation

Tab. 8: Auflistung der zur Transformation von Hefen verwendeten Vektoren.

Die Platten wurden zum Wachstum der Hefen für zwei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.4.3. Interaktionstests

Die für die **Interaktionstests** verwendeten Hefen enthielten das Köder-Plasmid und ein zufällig transformiertes Plasmid aus der Bibliothek. Wenn die in den beiden Konstrukten codierten Proteine interagierten, sollte die Anschaltung verschiedener Reportergene diese Wechselwirkung anzeigen (Fields & Song, 1989). Durch die Interaktion sollte bei dem hier verwendeten System das *HIS* Reportergen aktiviert werden. Deshalb wurden je 200µl der Zellen nach der Transformation mit dem Bibliotheks-Plasmid auf große Platten (Durchmesser 15cm) ohne Histidin ausgestrichen; diese Platten enthielten zusätzlich den Inhibitor 3AT in einer zuvor ausgetesteten Konzentration, die Hintergrundwachstum aufgrund einer basalen Expression des *HIS3*-Gens unterdrücken sollte. Die darauf gewachsenen, potentiell positiven Klone wurden durch abermaliges Ausstreichen auf Histidin-freie Platten gereinigt und anschließend auf Platten ohne Leucin und Tryptophan aufgebracht. Diese Klone wurden dann gemeinsam mit den Kontrollstämmen A-E und

MaV203(pDBLeu-Insert/pPC86) als Negativkontrolle auf sogenannte Master-Platten ausgestrichen, welche nach Inkubation bei 30°C für 24h auf verschiedene weitere Platten Replika-plattiert wurden. Bei den Kontrollstämmen handelt es sich um Hefen des Stammes MaV103 (Genotyp: vgl. MaV203 (siehe Abschnitt 2.2.4.2.), aber *mating type MATa*), die Konstrukte enthalten, deren Produkte verschiedene Interaktionsstärken zeigen (Tab. 9). Mit deren Phänotypen konnte derjenige der transformierten Hefen verglichen werden.

Bezeichnung	Plasmide	cDNA-Inserts	Interaktionsstärke
Kontrolle A	pPC97	kein Insert	keine
	pPC86	kein Insert	
Kontrolle B	pPC97-RB	<i>human</i> RB Acc#M28419 (amino acids 302-928)	schwach
	pPC86-E2F1	<i>human</i> E2F1 Acc#M96577 (amino acids 342-437)	
Kontrolle C	pPC97-CYH2 ^S -dDP	<i>Drosophila</i> DP Acc#X79708 (amino acids 1-377)	mäßig stark
	pPC86-dE2F	<i>Drosophila</i> E2F Acc#U10184 (amino acids 225-433)	
Kontrolle D	pPC97-Fos	<i>rat</i> cFos Acc#X06769 (amino acids 132-211)	stark
	pPC86-Jun	<i>mouse</i> cJun Acc#X12761 (amino acids 250-325)	
Kontrolle E	pCL1 (codiert GAL4 in gesamter Länge)	GAL4 Acc#K10486 (amino acids 1-881)	sehr stark
	pPC86	kein Insert	

Tab. 9: Auflistung der verwendeten Hefe-Kontrollstämmen.

Dazu wurden zuerst die Master-Platte, anschließend die Selektionsplatten in vorgegebener Reihenfolge auf ein Stück sterilen Samt gedrückt, so dass das Koloniemuster auf letztere übertragen wurde (siehe Abb. 11).

Die erste Platte enthielt YPDA-Medium, darauf befand sich eine Nylonmembran. Nach Inkubation für 24h bei 30°C wurden die darauf gewachsenen Kolonien einem **X-Gal-Assay** unterzogen. Dazu wurde die Nylonmembran zum Aufbrechen der Zellwände für 20sek. in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend mit der Kolonieseite nach oben auf zwei mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung durchtränkte Whatman-3MM-Papiere gelegt; durch Verschließen mit Parafilm wurde ein Verdunsten der Flüssigkeit verhindert. Während der Inkubation bei 37°C für maximal 24h wurde eine etwaige Blaufärbung der Kolonien registriert.

Als nächstes wurden die Kolonien von der Master-Platte auf **Selektionsplatten** gestempelt, in denen neben Leucin und Tryptophan auch Uracil fehlte; Kolonien konnten nur wachsen, wenn das entsprechende Reporter-gen aufgrund der Interaktion der Proteine aktiv war. Als letztes wurden die Kolonien zur Verifizierung der zuvor beobachteten Ergebnisse nochmals auf Platten ohne Histidin übertragen.

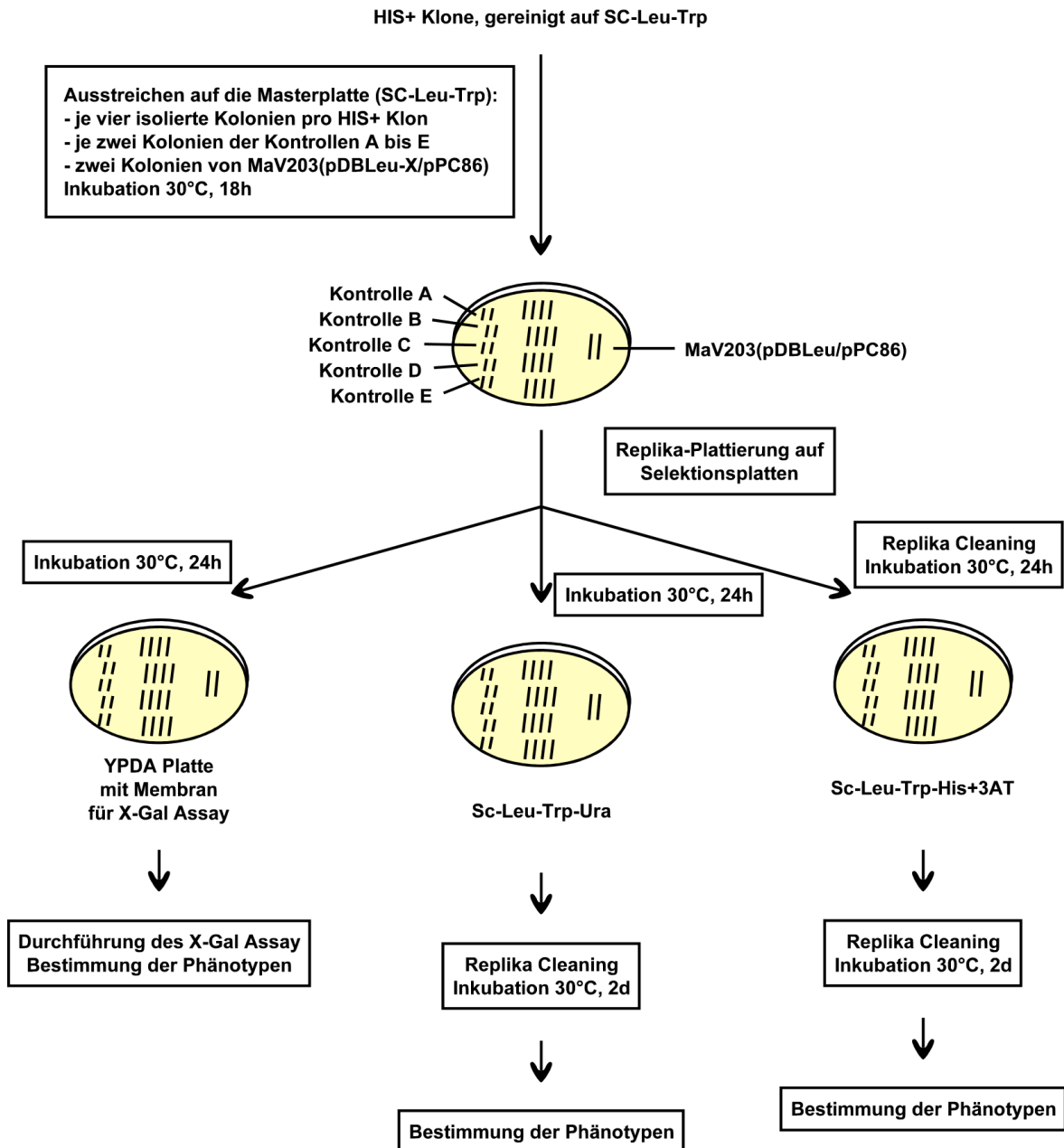


Abb. 11: Durchführung der Interaktionstests.

Potentiell positive Klone wurden auf eine Master-Platte ausgestrichen. Nach dem Überstempeln auf die Selektionsplatten und gegebenenfalls Replika Cleaning konnte nach der angegebenen Inkubationszeit beziehungsweise Durchführung des X-Gal-Assay der Phänotyp bestimmt werden.

(Schema bearbeitet nach ProQuest™ Two-Hybrid-Benutzerhandbuch)

Um echtes Wachstum auf den Selektionsplatten von Resten übertragenen Zellmaterials unterscheiden zu können, mussten die Platten zu bestimmten Zeitpunkten mittels **Replica Cleaning** von Zellresten befreit werden. Dazu wurden sie auf frisch autoklavierte Samt-Stücke gedrückt und dieser Vorgang so oft mit jeweils frischem Stoff wiederholt, bis keine Zellen mehr auf den Selektionsplatten sichtbar waren.

2.2.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* und Retransformation

Hefe-Kolonien, die in den verschiedenen Tests positive Ergebnisse lieferten, wurden einer **Retransformation** unterzogen. Aus ihnen wurde mittels Hefe-Miniprep unter Verwendung der entsprechenden Selektionsmarker das Bibliotheks-Plasmid isoliert.

Zur **Gewinnung von Plasmid-DNA aus Hefen** nach einem abgewandelten Protokoll von Polaina und Adam (1991) wurden Einzelkolonien in 5ml Selektionsmedium angeimpft und unter Schütteln bei 230rpm und 30°C für 20h inkubiert. 1ml der Kultur wurde in ein Eppi überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 15.000rcf und RT für 30sek. geerntet. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100µl Alkali-SDS-Lösung und anschließende Inkubation für 15min. bei RT lysiert. Dann wurden 500µl TE und 60µl 3M NaAc zugefügt und der Ansatz durch Inversion gemischt. Nach Zugabe von 600µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 wurde 2min. lang gevortext und dann für 2min. bei 15.000rcf und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppi überführt und abermals phenolextrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 600µl Isopropanol, Fällung bei -20°C für mindestens 30min. und Zentrifugation bei 15.000rcf und RT für 5min. präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und schließlich in 10µl sterilem H₂O_{MiliQ} gelöst.

Die DNA konnte in Bakterien transformiert und dort vermehrt, aus diesen isoliert und eventuell mittels Restriktionsverdau, PCR und/oder Sequenzierung **getestet** und anschließend gemeinsam mit dem Köder-Plasmid in Hefen retransformiert werden. Die so veränderten Hefen sollten bei einer echten Interaktion dieselben Phänotypen zeigen wie in den zuvor durchgeführten Tests.

2.2.4.5. Glycerolstocks von Hefe-Kulturen

Um **Glycerolstocks** von Hefestämmen (Ausubel *et al.*, Unit 13.1, 1993) herzustellen, wurden Einzelkolonien von einer Platte in 50µl sterilem H₂O_{MiliQ} suspendiert und auf einer Platte mit dem entsprechenden Medium ausplattiert. Nach Inkubation bei 30°C für 48h wurde der Hefe-Rasen von der Platte abgekratzt und in 500µl sterilem H₂O_{MiliQ} in einem Schraubdeckel-Eppi suspendiert. Nach Zugabe von 150µl 87% Glycerol wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3. Organismische Methoden

2.3.1. Keimbahntransformation von *D. melanogaster*

2.3.1.1. Injektion

Zur Injektion basierend auf der Methode von Rubin und Spradling (1982) wurden von den zuvor mittels Klonierung (siehe Abschnitt 2.2.3.) hergestellten Konstrukten Mini- oder Midipräparationen hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.3.1.). Nach Zentrifugation bei 16.000rcf für 30min. wurde die **Plasmid-DNA** mit Wasser und Injektionspuffer auf eine Konzentration von 0,1-0,3µg/µl verdünnt und durch Zugabe von Lebensmittelfarbe zur Kontrolle der injizierten DNA gefärbt.

Injiziert wurde in circa 30-60min. alte **Embryonen** (syncytiales Stadium), die aus einer Kreuzung von ungefähr 50 Jungfrauen des Stammes w^{1118} und circa 30 Männchen des Transposase-Stammes $yw; \Delta 2-3, ki$ hervorgegangen waren; sie besaßen also den Genotyp $w^{1118}/yw; ; \Delta 2-3, ki/+$ oder $w^{1118}/y; ; \Delta 2-3, ki/+$. Das richtige Alter der Embryonen wurde durch halbstündliches Umsetzen der Elterntiere auf frische Eiablageplatten gewährleistet. Um die Embryonalentwicklung zu verlangsamen, wurden die Eier bei 18°C weiterbehandelt. Die Embryonen wurden per Hand durch Rollen auf Klebeband mechanisch dechorionisiert, für kurze Zeit auf mit Klebstoff beschichteten Deckgläschen über Kieselgel angetrocknet und anschließend mit Voltalef®-Öl überschichtet, um eine weitere Austrocknung zu verhindern.

Die **Injektion** der DNA in das Polplasma erfolgte mit Hilfe von zuvor abgebrochenen Injektionskapillaren und eines Mikromanipulators, der erforderliche Druck von ungefähr 1bar wurde mittels einer Stickstoffflasche mit Druckminderer erzeugt. Die weitere Entwicklung der Tiere erfolgte bei 18°C zunächst auf feuchten Saftagarplatten, ab dem ersten Larvenstadium in normalem Fliegenaufzuchtmedium.

2.3.1.2. Etablierung stabiler Linien

Die nach der Mikroinjektion geschlüpften, weißäugigen Fliegen wurden gegen w^{1118} Fliegen **rückgekreuzt**. Bei erfolgreicher Integration der Plasmid-DNA in das Genom der zukünftigen Keimzellen sollten die Nachkommen dieser Fliegen aufgrund des im P-Element enthaltenen Selektionsmarkers mini-*white* farbige Augen aufweisen.

Solche Fliegen mit gelber, oranger oder roter Augenfarbe, die zudem das Transposase-enthaltende Chromosom nicht mehr besaßen (zu erkennen am Verlust des *kinked*-Markers), wurden zur Stabilisierung und Balancierung des integrierten P-Elements mit Fliegen des Doppelbalancer-Stammes $CyO/ScO; TM3/D3$ **gekreuzt**. Die daraus resultierenden Nachkommen mit farbigen Augen und der Balancerkombination CyO und

TM3 wurden erneut mit dem Doppelbalancer-Stamm gekreuzt. Bei Integration auf dem zweiten oder dritten Chromosom sollten alle Nachkommen, die die Balancerkombination *CyO/Sco; TM3/D3* aufwiesen, weiße Augen besitzen. Alle anderen Stämme wurden der Einfachheit halber verworfen. Waren die Nachkommen mit den Balancerkombinationen *CyO/Sco; TM3* oder *D3* und *CyO* oder *Sco; TM3/D3* rotäugig, wurde angenommen, dass sich sowohl auf dem zweiten als auch auf dem dritten Chromosom ein P-Element befand; diese Stämme wurden ebenfalls verworfen.

Wenn alle Nachkommen mit der Marker- beziehungsweise Balancerkombination *CyO/Sco; TM3* oder *D3* weißäugig waren, konnte davon ausgegangen werden, dass das P-Element auf dem zweiten Chromosom integriert war. Waren hingegen alle Nachkommen mit der Kombination *CyO* oder *Sco; TM3/D3* weißäugig, konnte von einer Integration auf dem dritten Chromosom ausgegangen werden. Von diesen Linien wurden wiederum unter Verwendung des Doppelbalancer-Stammes **stabile Stämme** etabliert.

2.3.2. Fliegenhaltung und -kreuzungen

2.3.2.1. Fliegenhaltung

Folgende **Fliegenstämme** wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet (Tab. 10):

Stamm	Beschreibung/ Verwendung	Herkunft	Literatur
CS	Wildtyp- und Kontrollstamm	Stammsammlung	Lindsley & Zimm, 1992
<i>w¹¹¹⁸</i>	Kontroll- und Ausgangsstamm	Stammsammlung	Lindsley & Zimm, 1992
<i>vap¹</i>	Mutation im <i>RasGAP</i> Gen (<i>vap¹f¹car¹</i>)	J.A. Botella	Botella <i>et al.</i> , 2003
<i>vap²</i>	Mutation im <i>RasGAP</i> Gen	J.A. Botella	Botella <i>et al.</i> , 2003
<i>UAS-RasGAP/+; SM6:TM6B</i>	Überexpression der <i>RasGAP</i> cDNA	D.A. Hughes	Feldmann <i>et al.</i> , 1999
<i>vap²; UAS-RasGAP/CyO</i>	Überexpression der <i>RasGAP</i> cDNA im mutanten Hintergrund	D.A. Hughes	Feldmann <i>et al.</i> , 1999
<i>vap²; UAS-17.30/TM3</i>	Überexpression der Adapter-Region von <i>RasGAP</i> im mutanten Hintergrund	D.A. Hughes	Feldmann <i>et al.</i> , 1999
<i>vap²; UAS-22.2/TM3</i>	Überexpression der <i>RasGAP</i> cDNA mit Mutationen in beiden SH2 Domänen im mutanten Hintergrund	D.A. Hughes	Feldmann <i>et al.</i> , 1999
<i>vap²; UAS-N15.1/CyO</i>	...mit Mutation in der N-terminalen SH2 Domäne...	D.A. Hughes	Woodcock & Hughes, 2004
<i>vap²; UAS-C75.6/TM3</i>	...mit Mutation in der C-terminalen SH2 Domäne...	D.A. Hughes	Woodcock & Hughes, 2004
<i>vap²; UAS-B111.4/CyO</i>	...mit Mutation in der SH3 Domäne...	D.A. Hughes	Woodcock & Hughes, 2004
<i>UAS-GAP*/TM3</i>	Überexpression der <i>RasGAP</i> cDNA mit Mutation in der GAP Domäne	D.A. Hughes	Woodcock & Hughes, 2004
<i>actin-GAL4/TM6B</i>	Treiberstamm zur ubiquitären Überexpression von <i>UAS</i> Konstrukten	Stammsammlung	-
<i>Da-GAL4 (III)</i>	<i>vgl. actin-Gal4</i>	Stammsammlung	-

<i>elav-GAL4/TM3</i>	Treiberstamm zur Überexpression von <i>UAS</i> Konstrukten in Neuronen	Stammsammlung	-
<i>appl-GAL4 (III)</i>	<i>vgl. elav-Gal4</i>	Stammsammlung	-
<i>MS1096-GAL4 (I)</i>	Treiberstamm zur Überexpression von <i>UAS</i> Konstrukten in Flügeln	Bloomington #8860	Capdevila & Guerrero, 1994
<i>GMR-GAL4 (II)</i>	...im Auge	Stammsammlung	Freeman, 1996
<i>vap²; actin-GAL4/TM3</i>	Treiberstamm zur ubiquitären Überexpression von <i>UAS</i> Konstrukten im mutanten Hintergrund	selbst gekreuzt	-
<i>vap²; +;appl-GAL4/SM6::TM6</i>	Treiberstamm zur Überexpression von <i>UAS</i> Konstrukten in Neuronen im mutanten Hintergrund	selbst gekreuzt	-
<i>vap¹/FM7c; actin-GAL4/TM3</i>	Treiberstamm zur ubiquitären Überexpression von <i>UAS</i> Konstrukten im mutanten Hintergrund	selbst gekreuzt	-
<i>vap¹/FM7c; appl-GAL4/TM3</i>	Treiberstamm zur Überexpression von <i>UAS</i> Konstrukten in Neuronen im mutanten Hintergrund	selbst gekreuzt	-
<i>yw; Δ2-3, ki</i>	Transposase-Stamm für Keimbahntransformation	Stammsammlung	-
<i>CyO/Sco; TM3/D3</i>	Doppelbalancer-Stamm; verwendet bei Etablierung stabiler Linien nach Keimbahntransformation	Stammsammlung	-
<i>UAS-Crk (II) oder (III)</i>	Überexpression der <i>Crk</i> cDNA	diese Arbeit	diese Arbeit
<i>UAS-Crk-RNAi (II) oder (III)</i>	Überexpression eines <i>Crk RNAi</i> Konstruktes	diese Arbeit	diese Arbeit
<i>UAS-rpr (II)</i>	Überexpression der <i>reaper</i> cDNA	Bloomington #5824	Aplin & Kaufman, 1997
<i>UAS-DIAP1 (III)</i>	Überexpression der <i>DIAP1</i> cDNA	Bloomington #6657	Labor von Bruce Hay
<i>UAS-Dp110 (II)</i>	Überexpression der <i>Dp110</i> cDNA	Michael Lehmann	Leevers <i>et al.</i> , 1996
<i>UAS-Dp110-RNAi (III)</i>	Überexpression eines <i>Dp110 RNAi</i> Konstruktes	VDR #38985	Dietzl <i>et al.</i> , 2007
<i>UAS-Dakt^{myr} (III)</i>	Überexpression einer konstitutiv membranlokalisierten Form von Akt	Michael Lehmann	Cavaliere <i>et al.</i> , 2005
<i>UAS-Dakt1/CyO</i>	Überexpression der <i>Akt</i> cDNA	?	Staveley <i>et al.</i> , 1998
<i>UAS-Dakt1-RNAi (III)</i>	Überexpression eines <i>Akt RNAi</i> Konstruktes	VDR #2902	Dietzl <i>et al.</i> , 2007
<i>UAS-TOR (III)</i>	Überexpression der <i>TOR</i> cDNA	Bloomington #7012	Hennig & Neufeld, 2002
<i>UAS-TOR^{TEDE} (II)</i>	Überexpression einer dominant negativen Form von TOR	Bloomington #7013	Hennig & Neufeld, 2002
<i>UAS-S6K.STDETE (II)</i>	Überexpression einer konstitutiv aktiven Form der S6K	Bloomington #6914	Stewart & Barcelo, 2002
<i>UAS-S6K.KQ (II)</i>	... dominant negativen Form der S6K	Bloomington #6911	Stewart & Barcelo, 2002
<i>FM6/arm</i>	Balancerstamm für das 1. Chr.	Stammsammlung	-
<i>car¹</i>	Mutation im <i>carnation</i> Gen	Bloomington #19	Mainx, 1938

Tab. 10: Auflistung der verwendeten Fliegenstämme.

Alle Fliegenstämme wurden bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% in Gläsern mit *Drosophila* Medium gehalten. Zusätzlich enthielten die Gläschen für Kreuzungen oder für die Aufrechterhaltung der Stämme Streuhefe; Gläschen, die für die Alterung von Fliegen verwendet wurden, enthielten etwas weniger Brei und keine Streuhefe. In den Zuchträumen herrschte ein künstlicher Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12h LD.

2.3.2.2. Kreuzungen

Kreuzungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Für eine Kreuzung wurden jeweils drei bis fünf Jungfrauen und ein bis drei Männchen in ein Glas zusammengesetzt. Die Parentalgeneration wurde vor dem Schlüpfen der F1-Generation aus dem Glas entfernt. Die Betäubung der Fliegen erfolgte mit CO₂.

2.3.3. Versuche zu Lebenserwartung und Verhalten

2.3.3.1. Alterungsversuche

Fliegenmännchen wurden zu je 25 in **Alterungsgläschen** gehalten und jeden zweiten bis dritten Tag in frische Gläser überführt und dabei die toten Tiere gezählt.

2.3.3.2. Phototaxis

Verhaltensversuche wurden grundsätzlich zur Vermeidung tagesrhythmischer Effekte zur selben Tageszeit durchgeführt. Das **phototaktische Verhalten** der Fliegen wurde nach der von Benzer (1967) beschriebenen Methode in dem dazugehörigen Apparat getestet. Dieser besteht aus zehn Glasröhren, die paarweise gegenüberliegend angeordnet sind; sie sind gegeneinander verschiebbar. Im verwendeten Versuchsaufbau befand sich jeweils ein Röhrchen eines Paares im Dunkeln, das andere im Licht. Der Abstand zur Lichtquelle betrug circa 15cm. Zu Beginn des Versuchs wurden ungefähr 50 Fliegen an das Ende des ersten dieser Röhrchen gebracht, das sich im Dunkeln befand. Sie hatten nun eine Minute Zeit, sich in Richtung der Lichtquelle zu begeben; die Entfernung zwischen den Enden der beiden Röhrchen und damit die Laufstrecke betrug 70cm, der Durchmesser der Röhrchen 1,5cm. Nach einer Minute wurden die Röhrchen um eine Position verschoben und diejenigen Tiere, die sich in der beleuchteten Hälfte befanden, wurden in das neue nun gegenüberliegende abgedunkelte Röhrchen geschüttelt. Insgesamt wurde den Fliegen fünfmal die Gelegenheit gegeben, auf den Lichtreiz zu reagieren. Nach Abschluss der fünf Zyklen wurde ausgezählt, wie viele Fliegen sich in den Röhrchen 1-6 befanden. Für jeden Genotyp wurden die Daten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ausgewertet, wobei teilweise dieselben Fliegen bis zu dreimal hintereinander am selben Tag getestet wurden und der Mittelwert dieser Läufe in die Auswertung einging.

2.4. Histologische Methoden

2.4.1. Paraffinschnitte und Quantifizierung der Neurodegeneration

2.4.1.1. Paraffinschnitte

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten adulter Fliegengehirne wurden jeweils zehn bis zwanzig Männchen verschiedener Genotypen nach der Methode von Heisenberg (Heisenberg, 1980) mit den Köpfen nach oben und den Rüsseln in gleicher Ausrichtung auf einem **Kragen** aufgereiht. Zwischen die zu unterscheidenden Fliegenlinien wurde auf jeden Kragen eine *sine oculis*-Fliege in asymmetrischer Anordnung eingefügt, um später eine Zuordnung der verschiedenen Genotypen zu ermöglichen.

Die **Fixierung** und **Einbettung in Paraffin** wurde gemäß folgendem Protokoll durchgeführt:

Fixierung	in Carnoy (frisch hergestellt)	bei RT	für 3,5-4h
Entwässerung	in 99% EtOH	bei RT	für 2x 30min.
	in 100% EtOH	bei RT	für 1x 60min.
	in Methylbenzoat	bei RT	ün
	in Methylbenzoat/Paraffin 1:1	bei ca. 60°C	für 1h
Einbetten	in Paraffin	bei ca. 60°C	für 6x ca. 30min.
Eingießen	in Paraffin im Plastikförmchen		
Aushärten lassen			

Anschließend wurden die Paraffinblöcke auf Metallblöcke aufgeklebt, präzise getrimmt und mit einem Reichert Jung Mikrotom 7µm-**Schnitte** angefertigt. Die Schnitte wurden kurz auf einem mit Glycerolalbumin beschichteten und von Wasser bedeckten Objektträger bei 40°C gestreckt, dann wurde das Wasser weitgehend abgesaugt. Die Schnitte durften über Nacht staubfrei bei Raumtemperatur auf den Objektträgern antrocknen.

Am nächsten Tag wurde das Paraffin durch eintauchen in Xylol bei ca. 60°C für mindestens 2x 15min. entfernt. Die Schnitte wurden noch nass mit DPX **eingedeckelt** und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.4.1.2. Mikroskopie und Quantifizierung der Neurodegeneration

Beim Schneiden wurden die autofluoreszierenden Augenpigmente jeweils über das ganze Gehirn der Fliege verteilt, was die **mikroskopische Analyse des Gehirnphänotyps** ohne zusätzliche Färbung ermöglichte. Die Mikroskopie erfolgte an einem Zeiss Axiophot Mikroskop. Mit Hilfe der Intas Camera Control Software V2.05 wurden **Fotografien** der Gehirnphänotypen erstellt.

Zur genaueren **Charakterisierung des Grades der Neurodegeneration** wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil des Gewebes in Lobula und Medulla ermittelt, der von der Vakuolisierung betroffen war. Dabei wurden pro Kopf jeweils beide Hemisphären in drei aufeinanderfolgenden Schnitten auf Höhe des Oesophagus mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe der *analySIS 2.1* Software ausgewertet. Pro Kopf wurde der Mittelwert aus diesen drei Schnitten aus beiden Gehirnhälften gebildet; pro Genotyp wurden jeweils mindestens vier, für die Kontrollen (*vap/Y; +/-appl-GAL4*) über 15 Köpfe ausgewertet.

2.4.2. Semidünnschnitte und Toluidinblau-Färbungen

2.4.2.1. Semidünnschnitte

Semidünnschnitte von Gehirnen adulter Männchen wurden freundlicherweise von Ursula Roth angefertigt. Dazu wurden diese zunächst durch Entfernen von Rüssel und Luftsäcken in PPSö pH7,4 auf Eis **präpariert**. Danach wurden folgende Schritte durchgeführt:

Fixierung	in 5% Glutaraldehyd	bei 4°C	ün
Waschen	in PPSö pH7,4	3x	
Kontrastieren	in 1% Osmiumtetroxid	bei 4°C	für 2h auf Schüttler
Waschen	in PPSö pH7,4	3x	
Entwässerung über steigende Alkoholreihe	30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 99%, 2x 100% EtOH		für je 10min.
Waschen	in Propylenoxid	2x	für je 10min.
	in Durcupan (Propylenoxid:Epon 1:1)	bei RT	ün
	in Epon	bei RT	1h
Einbetten	in Epon (frisch)	bei 37°C	ün
Aushärten in Förmchen			

Mit einem Leica Reichert 2040 Autocut Mikrotom wurden anschließend 2µm dicke **Schnitte** angefertigt.

2.4.2.2. Toluidinblau-Färbungen und Mikroskopie

Die Objektträger mit den Semidünnschnitten wurden bei 60°C auf einer Wärmeplatte getrocknet, für 1-2min. bei 60°C mit filtrierter **Toluidinblau-Färbelösung** überschichtet und dann 2x mit H₂O_{MiliQ} gewaschen. **Eingedeckelt** wurde mit DPX. Die **Mikroskopie** erfolgte an einem Zeiss Axiophot Mikroskop.

2.4.3. Ultradünnschnitte und Elektronenmikroskopie

2.4.3.1. Ultradünnschnitte

Ultradünnschnitte von Gehirnen adulter Männchen wurden freundlicherweise ebenfalls von Ursula Roth angefertigt. **Präparation** und **Fixierung** erfolgten wie für die Semidünnschnitte angegeben (siehe Abschnitt 2.4.2.1.). Von den Präparaten wurden mit einem Leica Reichert 2040 Autocut Mikrotom 50-100nm dicke **Schnitte** angefertigt.

2.4.3.2. Kontrastierung und Mikroskopie

Die Schnitte wurden auf Grids aufgezogen und in 2% Uranylacetat in destilliertem Wasser und Bleicitrat nach Reynolds (1963) **kontrastiert**. Die **Untersuchung der Präparate** wurde an einem Zeiss EM 10 C/VR Transmissionselektronenmikroskop bei 80kV durchgeführt.

ERGEBNISSE

und Puppen ist dies gut zu erkennen, so dass in der oben aufgeführten Kreuzung diejenigen Nachkommen, welche ein Balancer-Chromosom tragen, schon in frühen Entwicklungsstadien sehr leicht von solchen, die beide Konstrukte tragen, unterschieden werden können. Solche Larven des dritten Stadiums, die sowohl *actin-GAL4* als auch *UAS-RasGAP* tragen, waren im erwarteten Verhältnis zu finden und wurden in eigene Gläschen überführt und ihre Entwicklung weiter beobachtet.

Die Larven verpuppten sich, jedoch waren späte Puppenstadien, in denen beispielsweise eine Verdunkelung der Flügel durch die Puppenhülle sichtbar wäre (Stadium P12 nach Bainbridge & Bownes, 1981), nicht zu beobachten. Wie erwartet, schlüpfen keine adulten Tiere. Daraus lässt sich schließen, dass die Tiere, welche *RasGAP* ubiquitär exprimieren, in einem frühen Puppenstadium sterben.

3.1.1.2. Einfluss der verschiedenen Domänen von RasGAP auf die Letalität

Um herauszufinden, ob nur die ubiquitäre Überexpression des voll funktionstüchtigen Proteins zum Tod der Tiere führt oder ob dafür bestimmte Domänen von RasGAP verantwortlich sind, wurden verschiedene *UAS* Konstrukte mit dem *actin-GAL4* Treiber kombiniert (Abb. 13):

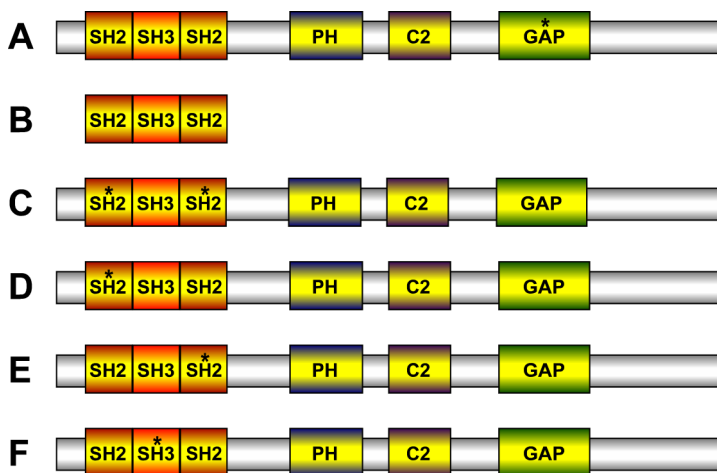


Abb. 13: Schematische Darstellung der Proteine, die bei Expression verschiedener *UAS-RasGAP* cDNA Konstrukte entstehen.

Das als *UAS-RasGAP** bezeichnete Konstrukt besitzt eine Punktmutation in der GAP katalytischen Domäne, welche den Funktionsverlust dieser Domäne verursacht (A). Das Konstrukt *UAS-17.30* führt zur Expression eines kurzen Stückes von RasGAP, in dem nur die beiden SH2 und die SH3 Domäne vorhanden sind (B). Im Konstrukt *UAS-22.2* enthalten die beiden SH2 Domänen jeweils eine Punktmutation, so dass im Protein diese Domänen geschädigt sind (C). Bei Expression des als *UAS-N15.1* bezeichneten Konstruktes besitzt das entstehende Protein eine mutierte N-terminale SH2 Domäne (D). In *UAS-C75.6* ist die näher beim C-Terminus gelegene SH2 Domäne mutiert (E), in *UAS-B111.4* die SH3 Domäne (F).

(Schema bearbeitet nach J. Botella)

Durch eine Punktmutation kommt es bei Expression des Konstruktes *UAS-RasGAP** (Abb. 13A) zu einem Aminosäure-Austausch von Arginin zu Lysin an Position 695 im Protein, welcher vermutlich einen Funktionsverlust der GAP katalytischen Domäne verursacht (Kiermayer, 2003). Bei Expression von *UAS-17.30* entsteht nur ein kleiner Teil des RasGAP Proteins (AS 83-343), der lediglich die beiden SH2 und die SH3 Domäne beinhaltet (Abb. 13B). Im Konstrukt *UAS-22.2* (Abb. 13C) werden stark konservierte Arginin-Reste an Position 110 und 278 durch Leucin ersetzt, in den Konstrukten *UAS-N15.1* (Abb. 13D) beziehungsweise *UAS-C75.6* (Abb. 13E) liegt nur jeweils eine dieser beiden Mutationen (R110L beziehungsweise R278L) vor, so dass nur jeweils eine der

SH2 Domänen in ihrer Funktion gestört ist (Feldmann *et al.*, 1999; Woodcock & Hughes, 2004). Im Konstrukt *UAS-B111.4* (Abb. 13F) wird ein hoch konserviertes Tryptophan an Position 219 durch Alanin ersetzt; dadurch sollte eine mutierte SH3 Domäne entstehen. Die Konstrukte wurden jeweils im Labor von David A. Hughes kloniert und transgene Fliegenlinien etabliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ubiquitäre Überexpression von *UAS-B111.4* zum Tod der Tiere führt. Ubiquitäre Expression der Konstrukte *UAS-RasGAP**, *UAS-17.30* und *UAS-22.2* durch Kreuzung der entsprechenden Linien mit dem *actin-GAL4* Treiber hingegen führte sowohl im wildtypischen als auch im *vap²* Hintergrund nicht zur Letalität (Giesecke, 2002 und mündliche Mitteilung J. Botella). Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl die GAP als auch die SH2 Domänen funktionell vorhanden sein müssen, um bei ubiquitärer Überexpression eine Letalität zu verursachen. Welche Bedeutung den einzelnen Domänen in Bezug auf den Phototaxis- und den Neurodegenerations-Phänotyp in *vap* Mutanten zukommt, wird im Folgenden erläutert.

3.1.2. Einfluss der verschiedenen Domänen von RasGAP auf den Phototaxis-Phänotyp

Fünf Tage alte *vap* Fliegen zeigen ein gestörtes phototaktisches Verhalten: sie bewegen sich nicht wie wildtypische Fliegen auf einen Lichtreiz zu, sondern bleiben in einem Versuch, in denen ihnen die Möglichkeit gegeben wird, sich in fünf aufeinanderfolgenden Zyklen auf das Licht zu und damit jeweils ein Röhrchen weiter zu bewegen, zum Großteil im ersten Röhrchen sitzen (Kiermayer, 2003); dieses Ergebnis konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 14).

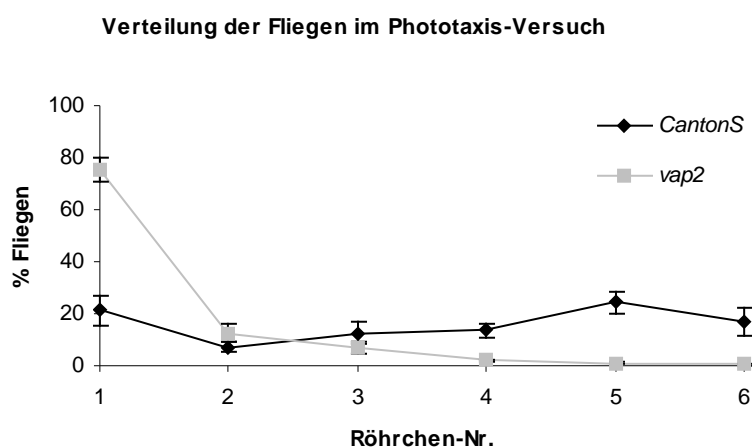


Abb. 14: Phototaxis-Phänotyp von fünf Tage alten *vap²* Fliegen.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der im Versuch eingesetzten Fliegen auf verschiedene Röhrchen. Fünf Tage alte wildtypische (*CantonS*) Fliegen bewegen sich zum Licht hin, so dass sich am Ende des Versuchs viele Tiere in den letzten Röhrchen befinden. Fliegen des Stammes *vap²* bleiben hingegen größtenteils im ersten Röhrchen. Genotypen: **CantonS:** *CS/Y*, **vap2:** *vap²/Y*.

Um festzustellen, welchen Einfluss die einzelnen Domänen des RasGAP Proteins auf die Entstehung des gestörten phototaktischen Verhaltens besitzen, wurden im hemizygoten *vap²* Hintergrund die verschiedenen *RasGAP* cDNA Konstrukte (siehe Abb. 13) mit Hilfe des neuronalen Treibers *elav-GAL4* exprimiert und in mindestens drei unabhängigen Versuchen das phototaktische Verhalten von jeweils ungefähr 50 Fliegen analysiert. Die Expression dieser *UAS* Konstrukte unter Kontrolle des *elav-GAL4* Treibers sollte im mutanten Hintergrund in den Neuronen die Funktion der jeweils codierten, nicht mutierten Domänen wieder herstellen. Aus dem resultierenden Effekt auf den Phänotyp kann auf die Bedeutung der vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Domänen geschlossen werden. Wie in Abbildung 14 zu sehen, ist der Verhaltensunterschied besonders deutlich am prozentualen Anteil der Fliegen zu erkennen, die im ersten Röhrrchen bleiben; deshalb wurde dieser verglichen (Abb. 15).

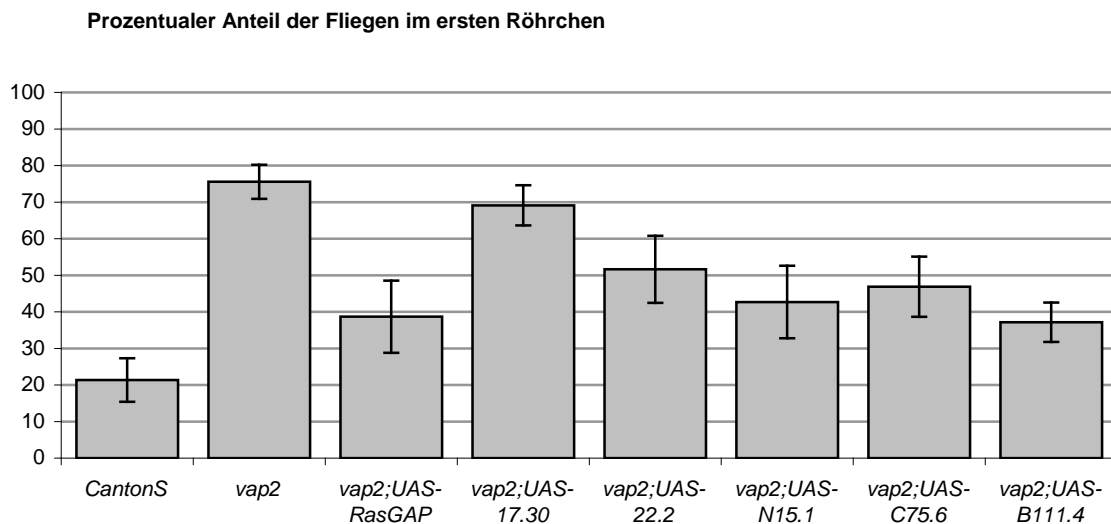


Abb. 15: Beeinflussung des Phototaxis-Phänotyps von *vap²* Fliegen durch neuronale Expression verschiedener *UAS* Konstrukte.

Während nur 20% einer Population von fünf Tage alten wildtypischen Fliegen (*CantonS*) am Ende eines Phototaxis-Versuchs im ersten Röhrrchen des Versuchsapparates vorhanden sind, bleiben von Fliegen des *vap²* Stammes circa 75% im ersten Röhrrchen sitzen. Neuronale Expression des Konstruktes *UAS-RasGAP* im *vap²* Hintergrund führt zu einer deutlichen Verbesserung dieses Phänotyps. Expression des Konstruktes *UAS-17.30*, wodurch nur die beiden SH2 und die SH3 Domäne von RasGAP ausgeprägt werden, führt dagegen nicht zur Abschwächung. Expression eines Konstruktes, in dem beide SH2 Domänen mutiert sind (*UAS-22.2*) führt nicht zu einer signifikanten Verbesserung des Phänotyps. Expression von Konstrukten, in denen jeweils eine der SH2 Domänen (*UAS-N15.1* oder *UAS-C75.6*) oder aber die SH3 Domäne (*UAS-B111.4*) mutiert ist, verursacht eine Verbesserung des Verhaltens.

Genotypen: ***CantonS***: *CS/Y*, ***vap2***: *vap²/Y*, ***vap2;UAS-RasGAP***: *vap²/Y*; *UAS-RasGAP/+*; *+elav-GAL4*, ***vap2;UAS-17.30***: *vap²/Y*; *UAS-17.30/elav-GAL4*, ***vap2; UAS-22.2***: *vap²/Y*; *UAS-22.2/elav-GAL4*, ***vap2; UAS-N15.1***: *vap²/Y*; *UAS-N15.1/+*; *+elav-GAL4*, ***vap2; UAS-C75.6***: *vap²/Y*; *UAS-C75.6/elav-GAL4*, ***vap2; UAS-B111.4***: *vap²/Y*; *UAS-B111.4/+*; *+elav-GAL4*.

Wie bereits auch von Kiermayer (2003) gezeigt, verbessert Expression der wildtypischen *RasGAP* cDNA unter Kontrolle des neuronalen Treibers *elav-GAL4* das in fünf Tage alten *vap²* Fliegen gestörte phototaktische Verhalten deutlich. Somit ist bewiesen, dass die *vap* Mutation Ursache dieses Phänotyps ist. Von Kiermayer (2003) war auch festgestellt worden, dass *vap²* Fliegen, in denen mit Hilfe des *UAS-17.30* Konstruktes und des *elav-GAL4* Treibers die beiden SH2 Domänen und die SH3 Domäne exprimiert werden, immer

noch ein gestörtes phototaktisches Verhalten aufweisen; diese Domänen genügen folglich allein nicht, um den Phänotyp zu retten. Kiermayer (2003) hatte festgestellt, dass Expression eines *UAS-RasGAP* cDNA Konstruktes, in dem lediglich die GAP katalytische Domäne mutiert ist, die restlichen Domänen aber ungeschädigt vorliegen, den Phänotyp nicht retten kann. Jedoch konnte auch Expression eines anderen GAP Proteins, *GAP1*, den Phänotyp nicht retten; eine GAP katalytische Aktivität allein scheint also auch nicht auszureichen.

Während bei Kiermayer (2003) die Expression des Konstruktes *UAS-22.2* zu einer Verschlechterung des Verhaltens geführt hatte, kam es bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen zu keiner signifikanten Veränderung; das Ergebnis ist hier also nicht eindeutig. Durch Expression von Konstrukten, in denen jeweils nur eine der beiden SH2 Domänen (*UAS-N15.1* und *UAS-C75.6*) mutiert ist, konnte das phototaktische Verhalten verbessert werden (Abb. 15), was eher für eine nicht entscheidende Rolle der einzelnen SH2 Domänen spricht. Expression des Konstruktes *UAS-B111.4* führte zu einer Anzahl von Fliegen im ersten Röhrchen ähnlich der bei Expression von *UAS-RasGAP*. Zur Überprüfung der Richtigkeit der aus der reinen Betrachtung der Graphen getroffenen Aussagen wurden die Daten für diesen Versuch einem *two-tailed paired t-Test* unterzogen, dessen Ergebnisse die gewonnenen Erkenntnisse stützen; die P-Werte können der Tabelle A1 im Anhang entnommen werden. Gemeinsam mit den Ergebnissen von Kiermayer (2003) kann festgestellt werden, dass für ein normales phototaktisches Verhalten von *Drosophila melanogaster* das Vorhandensein einer GAP katalytischen Domäne oder des N-terminalen Teils allein nicht ausreicht. In einem weiteren Versuch sollte auch hinsichtlich des Neurodegenerations-Phänotyps die Bedeutung der einzelnen Domänen untersucht werden; die Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt erläutert.

3.1.3. Einfluss der verschiedenen Domänen von RasGAP auf den Neurodegenerations-Phänotyp

Es wurden wiederum Kreuzungen zur Expression der verschiedenen *UAS* Konstrukte unter der Kontrolle des *elav-GAL4* Treibers im *vap²* Hintergrund durchgeführt und die gewünschten Nachkommen 20 Tage gealtert. Außerdem wurden Männchen der Stämme *CantonS* und *vap²* abgesammelt und ebenfalls gealtert. Von den Köpfen dieser Fliegen wurden Paraffinschnitte angefertigt und die Vakuolisierung in Lobula und Medulla mit Hilfe der AnalySIS Software quantifiziert. Zur Berechnung wurde jeweils aus den Werten beider Hemisphären eines Kopfes in drei aufeinanderfolgenden Schnitten der Mittelwert gebildet; pro Genotyp wurden jeweils fünf Köpfe ausgewertet.

Wie von Kiermayer (2003) bereits gezeigt, kann die in *vap*² Fliegen auftretende Neurodegeneration durch neuronale Expression der *RasGAP* cDNA vollständig gerettet werden; dadurch ist bewiesen, dass die Mutation in *RasGAP* tatsächlich für den Phänotyp verantwortlich ist. Überraschenderweise rettet allerdings auch die Expression eines Konstruktes, in dem die GAP Domäne mutiert ist (*UAS-RasGAP**); Expression des *UAS-17.30* Konstruktes, von dem lediglich die SH2/SH3/SH2 Domänen gebildet werden, kann ebenfalls den wildtypischen Zustand wiederherstellen (Abb. 16).

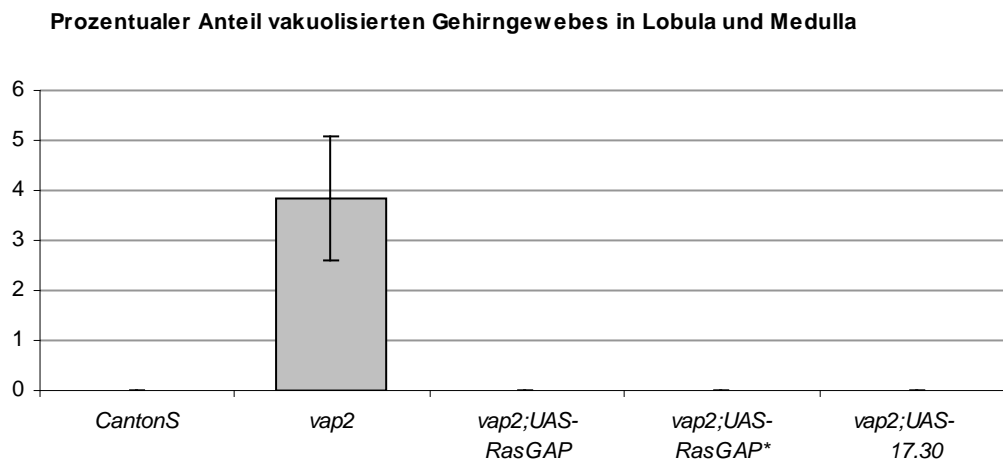


Abb. 16: Rettung des Neurodegenerations-Phänotyps von *vap*² Fliegen durch neuronale Expression verschiedener *UAS* Konstrukte.

Neuronale Expression des Konstruktes *UAS-RasGAP* stellt in 20 Tage alten *vap*² Fliegen den wildtypischen Zustand des Gehirns wieder her. Wird ein Konstrukt exprimiert, in dem die GAP Domäne mutiert, der Rest des Proteins jedoch vorhanden ist (*UAS-RasGAP**), ist ebenfalls keine Neurodegeneration mehr zu beobachten. Auch die Expression des Konstruktes *UAS-17.30*, wodurch nur die beiden SH2 und die SH3 Domäne von *RasGAP* ausgeprägt werden, führt zur vollständigen Rettung des Neurodegenerations-Phänotyps. Die katalytische Domäne ist folglich für die Aufrechterhaltung der Neuronen nicht entscheidend; hier kommt dem N-terminalen Teil des Proteins eine entscheidende Rolle zu.

Genotypen: **CantonS:** *CS/Y*, ***vap2*:** *vap*²/*Y*, ***vap2;UAS-RasGAP*:** *vap*²/*Y*; *UAS-RasGAP*/+; +/*elav-GAL4*, ***vap2; UAS-RasGAP**:** *vap*²/*Y*; *UAS-RasGAP**/*elav-GAL4*, ***vap2; UAS-17.30*:** *vap*²/*Y*; *UAS-17.30*/*elav-GAL4*.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die katalytische Aktivität von *Drosophila* *RasGAP* nicht für die Integrität der Neuronen nötig ist. Hier kommt dem N-terminalen Teil des Proteins eine entscheidende Rolle zu.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass ein Konstrukt, das eine Mutation in der SH3 Domäne besitzt (*UAS-B111.4*), ebenfalls vollständig retten konnte. Konstrukte, von denen das gesamte Protein exprimiert wird, die jedoch in beiden (*UAS-22.2*) oder in jeweils einer der SH2 Domänen eine Mutation tragen (*UAS-N15.1* oder *UAS-C75.6*), die zum Funktionsverlust führt, konnten hingegen den wildtypischen Zustand nicht vollständig wiederherstellen (Abb. 17). Damit wurde gezeigt, dass die Funktion der SH2 Domänen von *Drosophila* *RasGAP* entscheidend für die Integrität der Neuronen ist.

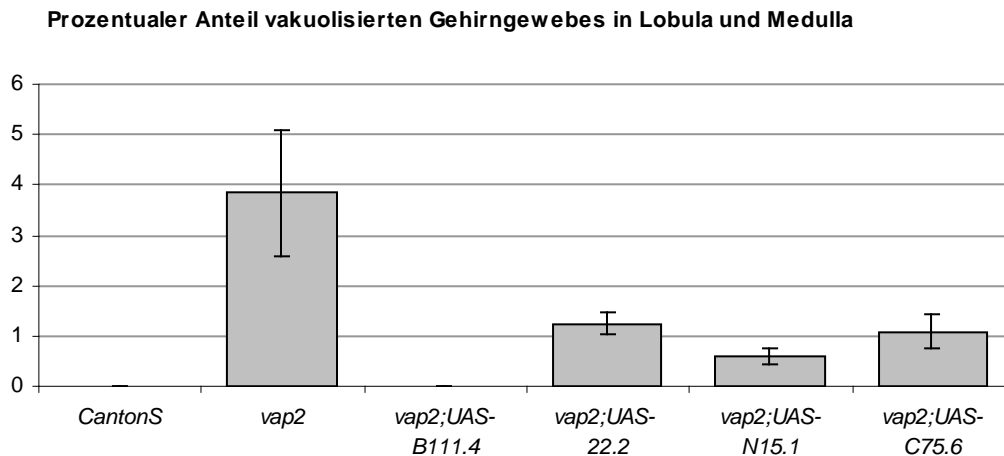


Abb. 17: Beeinflussung des Neurodegenerations-Phänotyps von *vap*² Fliegen durch neuronale Expression verschiedener UAS Konstrukte.

Neuronale Expression eines Konstrukts, von dem das gesamte Protein gebildet wird, wobei jedoch die SH3 Domäne mutiert ist (*UAS-B111.4*), kann den Phänotyp von 20 Tage alten *vap*² Fliegen vollständig retten. Die Expression von Konstrukten, die das gesamte Protein codieren, wobei jedoch Mutationen in beiden (*UAS-22.2*) oder in jeweils einer der SH2 Domänen vorliegen (*UAS-N15.1* oder *UAS-C75.6*), welche zu deren Funktionsverlust führen, können den wildtypischen Zustand nicht vollständig wiederherstellen. Daraus lässt sich schließen, dass die SH2 Domänen essentiell für die Integrität der Neuronen sind.

Genotypen: **CantonS:** *CS/Y*, ***vap2*:** *vap*²/*Y*, ***vap2;UAS-B111.4*:** *vap*²/*Y*; *UAS-B111.4/+*; *+elav-GAL4*, ***vap2;UAS-22.2*:** *vap*²/*Y*; *UAS-22.2/elav-GAL4*, ***vap2;UAS-N15.1*:** *vap*²/*Y*; *UAS-N15.1/+*; *+elav-GAL4*, ***vap2;UAS-C75.6*:** *vap*²/*Y*; *UAS-C75.6/elav-GAL4*.

Die funktionelle Analyse ergab, dass nicht, wie erwartet, die katalytische Domäne von RasGAP in den Fliegen die entscheidende Rolle für die Integrität der Neuronen spielt, sondern auch oder vor allem den anderen Domänen, speziell im N-terminalen Bereich des Proteins, große Bedeutung für die korrekte Funktion zukommt. Diese Domänen sind für die Vermittlung von Interaktionen zuständig, durch die die Funktion von RasGAP offensichtlich in hohem Maße beeinflusst wird. Deshalb sollten diese Interaktionen im Rahmen der vorliegenden Dissertation weiter analysiert werden. Ein häufig genutztes System, um Protein/Protein Interaktionen nicht auf biochemischer Ebene, sondern *in vivo* zu identifizieren, ist der sogenannte Yeast Two Hybrid Screen, der im nun folgenden Teil der Arbeit verwendet wurde, um neue Interaktionspartner von *Drosophila* RasGAP zu identifizieren.

3.2. Untersuchung molekularer Interaktionen von *Drosophila* RasGAP mittels Yeast Two Hybrid Screen

3.2.1. Das ProQuest™ Two Hybrid System

Um Protein/Protein Interaktionen zu definieren, gibt es verschiedene Methoden wie Co-Immunopräzipitation oder Affinitätschromatographie. Diese können eingesetzt werden, wenn bereits relativ viel bekannt ist über die mutmaßlichen Interaktionspartner beziehungsweise wenn eine bereits bekannte Wechselwirkung genauer definiert werden soll. Auch mit Hilfe eines Yeast Two Hybrid Screens lassen sich vermutete Interaktionen zwischen zwei bekannten Proteinen untersuchen. Die Methode ist jedoch auch geeignet, um unbekannte Interaktionspartner eines untersuchten Proteins zu identifizieren.

Die Methode wurde von Fields & Song (1989) entwickelt und seither immer weiter verbessert; es gibt verschiedene kommerziell vertriebene Systeme. Eines davon, das ProQuest™ Two Hybrid System von Invitrogen, wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. In diesem System wird der GAL4 Transkriptionsfaktor aus *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, um auf den Chromosomen integrierte Reportergene zu aktivieren. Im verwendeten Hefestamm MaV203 ist das *GAL4* Gen deletiert, so dass die Reportergene nur exprimiert werden, wenn durch Interaktion zweier Proteine X und Y die daran fusionierten DB und AD Domänen von GAL4 in räumliche Nähe gebracht und dadurch der funktionstüchtige Transkriptionsfaktor wiederhergestellt wird (siehe Abb. 10). Im ProQuest™ Two Hybrid System gibt es drei Reportergene, die stabil in einfacher Kopie im Genom des Hefestamms MaV203 integriert sind: *HIS3*, *URA3* und *lacZ*. Sie werden jeweils von unabhängigen Promotoren induziert, was die Zahl Falsch-Positiver verringert. Zudem sind die verwendeten Vektoren *low copy number* Vektoren, wodurch ebenfalls die Zahl Falsch-Positiver, die durch Überexpression der Fusionsproteine entstehen können, reduziert wird; zudem wird eine Toxizität einer zu hohen Menge der codierten Proteine und damit die Zahl Falsch-Negativer herabgesetzt. In dem verwendeten System sind darüber hinaus verschiedene Kontrollstämme enthalten, die eine ständige Kontrolle der Handhabung und zudem eine Einordnung der Interaktionsstärken ermöglichen.

Die interaktionsabhängige Induktion von *HIS3* oder *URA3* kann anhand des Wachstums der ansonsten dafür auxotrophen Hefezellen auf Platten ohne Histidin (durch Bildung des *HIS3*-Genprodukts Imidazol-Glycerolphosphat-Dehydratase) beziehungsweise Uracil (durch Bildung des *URA3*-Genprodukts Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase) beobachtet werden; die Induktion von *lacZ* resultiert in einer Blaufärbung der Kolonien in einem X-gal Assay, da die von diesem Gen codierte β -Galaktosidase X-gal spalten und dadurch von einer farblosen in eine farbige Substanz umsetzen kann.

Das System kann dazu verwendet werden, zu testen, ob zwei bekannte Proteine miteinander interagieren, oder um in einer cDNA Bibliothek codierte, bisher unbekannte Interaktionspartner eines Proteins zu identifizieren. Dafür müssen die im folgenden Schema beschriebenen Schritte durchgeführt werden (Abb. 18):

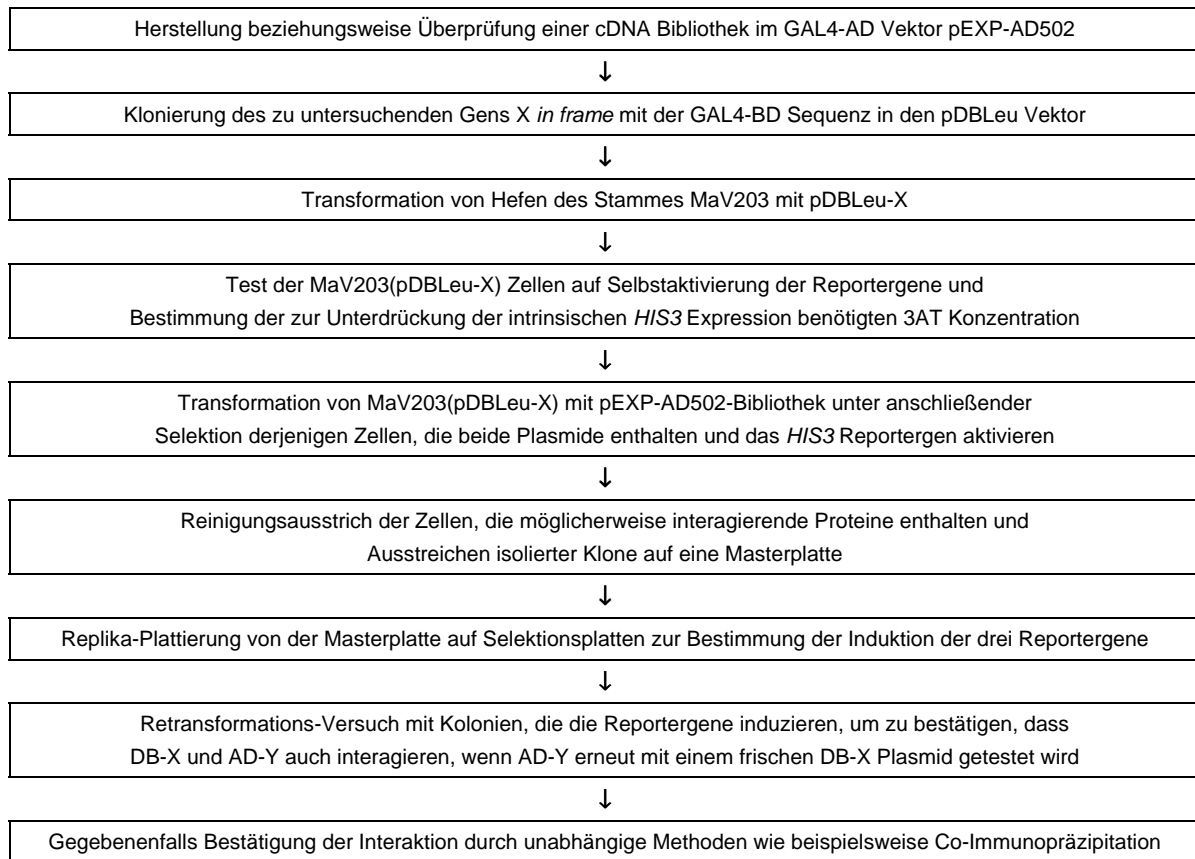


Abb. 18: Durchführung eines Yeast Two Hybrid Screens zur Identifizierung bisher unbekannter Interaktionspartner eines Proteins X mit dem ProQuest™ Two Hybrid System von Invitrogen.

Ausgangspunkt sind ein pDBLeu Konstrukt, in dem das untersuchte Protein X an die GAL4-DB fusioniert ist, und eine cDNA Bibliothek im GAL4-AD Vektor pEXP-AD502. Zunächst wird der pDBLeu-X Vektor in den Hefestamm MaV203 transformiert. Der transformierte Stamm wird darauf getestet, ob das pDBLeu Konstrukt bereits eigenständig die Transkription der Reportergene aktiviert; in diesem Fall könnte der Screen so nicht durchgeführt werden. Das Reportergen *HIS3* zeigt außerdem im verwendeten Stamm eine intrinsische Expression, welche durch den Inhibitor 3AT (3-Amino-1,2,4-Triazol) unterdrückt werden kann; die dafür notwendige Konzentration muss in einem vorab durchgeführten Versuch bestimmt werden.

Nach erfolgreicher Durchführung dieser Vorversuche kann die Transformation der Bibliothek in MaV203 Zellen erfolgen, die bereits den pDBLeu-X Vektor enthalten. Die entstandenen Klone werden auf Vorhandensein beider Plasmide (Selektionsmarker *LEU2* für den pDBLeu Vektor und *TRP1* für den pEXP-AD502 Vektor) und Induktion des Reportergens *HIS3* durch Interaktion von X mit einem bisher unbekanntem Protein Y (codiert in der Bibliothek) selektiert. Die auf HIS-Platten gewachsenen Zellen, die vermutlich die cDNA für ein interagierendes Protein enthalten, werden nach einem Reinigungsausstrich zur Vereinzelung auf eine sogenannte Masterplatte ausgestrichen. Von dort werden sie mittels Replika-Plattierung auf Selektionsplatten aufgebracht, um die Induktion der drei Reportergene zu untersuchen.

Positive Klone werden mittels Retransformation nochmals getestet; bei abermals positivem Ergebnis müsste die Interaktion mit Hilfe unabhängiger Methoden bestätigt werden.

(Schema bearbeitet nach ProQuest™ Two Hybrid Benutzerhandbuch)

Im Weiteren werden diese Schritte mit Bezug auf die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse genauer beschrieben.

3.2.2. Vorbereitungen

3.2.2.1. Charakterisierung der verwendeten Bibliothek

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Interaktionen von RasGAP beziehungsweise seiner SH3 Domäne (da Interaktionen einzelner Domänen eventuell leichter zu detektieren sind als die von großen Proteinen) mit Proteinen aus einer adulten *Drosophila melanogaster* Kopf Bibliothek untersucht werden. Diese wurde von Invitrogen als *Custom ProQuest cDNA library* aus aus Köpfen adulter Fliegen gewonnener mRNA für Dr. Megan Goodwin von der University of Glasgow hergestellt. Dazu wurde die durch reverse Transkription gewonnene cDNA nach Anfügen geeigneter Schnittstellen in den pEXP-AD502 Vektor ligiert, wobei nur Stücke über 500bp verwendet wurden. Diese Bibliothek wurde in Bakterien transformiert, dabei entstanden 3×10^6 cfu (*colony forming units*), das heißt, drei Millionen unabhängige Klone. Um genügend DNA für mehrere Screens zu erhalten, wurde diese ursprüngliche Bibliothek von Dr. Megan Goodwin mehrmals amplifiziert, zweimal nach einem Protokoll für eine *semi solid amplification* (SS1 und SS2), einmal nach einem Protokoll für eine *liquid amplification* (*liquid*). Aliquots dieser Amplifikate wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit abermals amplifiziert und für die Versuche verwendet.

3.2.2.2. Herstellung der Köder-Plasmide

Die Klonierung der Köder-Vektoren erfolgte durch Michaela Mark (Mark, 2005). Kurz zusammengefasst, wurde die cDNA Sequenz des *RasGAP* Gens (Basenpaare 292 bis 3156 der unter der Zugangs-Nummer AJ012609 gespeicherten Sequenz) beziehungsweise seiner SH3 Domäne (Basenpaare 856 bis 1030) nach Amplifizierung mittels PCR und Subklonierung in pGEM-T-Easy über Sall und NotI von 5' nach 3' *in frame*, also ohne Verschiebung des Leserasters, anschließend an die GAL4-DB in den pDBLeu Vektor inseriert. Für die SH3 Domäne wurde zusätzlich am 5' Ende ein Startcodon eingefügt, um die Transkription des Teilstücks zu garantieren. Die erfolgreiche Klonierung wurde für beide Konstrukte durch Sequenzierung bestätigt.

3.2.2.3. Validierung des verwendeten Systems

Ebenfalls von Mark (2005) wurde eine Validierung des verwendeten Systems durchgeführt. Zunächst wurde gezeigt, dass die Konstrukte alleine nicht die Reportergene aktivieren, in welchem Fall das System so nicht verwendet werden könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression der Konstrukte auch nicht toxisch für die Hefezellen ist, was ebenfalls eine Durchführung des Screens verhindert hätte. Schließlich wurde die cDNA für einen bekannten Interaktionspartner der SH3 Domäne von *Drosophila* RasGAP, die Aurora Kinase, in den Vektor pPC86 (auf ihm basiert der Bibliotheks-Vektor pEXP-AD502)

kloniert und die Interaktionstests sowohl für das gesamte Protein als auch für die SH3 Domäne durchgeführt. Die von Gigoux *et al.* (2003) festgestellte Interaktion konnte mit dem hier verwendeten System bestätigt werden. Somit sollte das System geeignet sein, um in einem Screen mögliche Interaktionspartner von *Drosophila* RasGAP mit Proteinen aus der adulten Kopf Bibliothek zu detektieren.

3.2.2.4. Bestimmung der 3AT Konzentration

Vor Beginn des Screens musste die richtige 3AT Konzentration bestimmt werden, um die basale Expression des *HIS3* Gens zu unterdrücken. Da bei der verwendeten Technik Variationen in der Handhabung durch den einzelnen Experimentator auftreten können, musste dieser bereits von Michaela Mark durchgeführte Vorversuch wiederholt werden.

Dazu wurde in den Stamm MaV203 zusätzlich zu pDBLeu-RasGAP beziehungsweise pDBLeu-SH3 mittels Transformation im kleinen Maßstab das Plasmid pPC86 (ohne Insert) eingebracht, auf dem das Bibliotheks-Plamid pEXP-AD502 basiert. Die Zellen wurden auf geeignete Selektionsplatten (SC-Leu-Trp) aufgebracht und bei 30°C inkubiert. Mit den gewachsenen Kolonien wurden sogenannte Masterplatten angeimpft. Zusätzlich wurden die im ProQuest™ System vorhandenen Kontrollstämme aufgetragen, die Plasmide enthalten, auf welchen Proteine mit verschiedenen Interaktionsstärken codiert sind (siehe Tab. 9); durch Überprüfung der Phänotypen kann die richtige Handhabung kontrolliert werden. Nach Inkubation bei 30°C für 18h wurde auf Selektionsplatten Replika-plattiert, die verschiedene Konzentrationen des Inhibitors 3AT enthielten, wobei auf die Platte mit der höchsten Konzentration zuerst gestempelt wurde. Die Platten wurden im Anschluß sofort Replica-gereinigt, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden sie für 24h bei 30°C inkubiert und abermals gereinigt, dann nochmals für 48h inkubiert, bevor das Wachstum ausgewertet wurde.

Die Kontrollstämme zeigten das erwartete Wachstum, das heißt, die Stämme E und D, welche sehr starke beziehungsweise starke Interaktionen zeigen, wuchsen auf allen Konzentrationen, Stamm C (mäßig starke Interaktion) wuchs nicht mehr auf 100mM 3AT, Stamm B (schwache Interaktion) nicht auf 75mM und 100mM 3AT, und Stamm A (keine Interaktion) wuchs auf keiner der Platten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis beweist, dass die verwendete Technik reproduzierbar angewendet werden konnte.

Die Stämme MaV203(pDBLeu-RasGAP/pPC86) und MaV203(pDBLeu-SH3/pPC86) zeigten ein schwaches Wachstum auf den Platten mit 10mM 3AT, auf denjenigen mit einer Konzentration ab 25mM wuchsen keine Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Konzentration des Inhibitors reicht folglich aus, um die intrinsische Expression von *HIS3* zu unterdrücken. Deshalb wurden für die Screens Platten mit einer Konzentration von 25mM 3AT verwendet.

3.2.3. Yeast Two Hybrid Screens mit *Drosophila* RasGAP und mit der SH3 Domäne aus *Drosophila* RasGAP

3.2.3.1. Transformation

Zur Durchführung eines Screens mit der gesamten RasGAP cDNA beziehungsweise mit der SH3 Domäne wurde das Konstrukt pDBLeu-RasGAP beziehungsweise pDBLeu-SH3 zunächst mittels Transformation im kleinen Maßstab in MaV203 Zellen eingebracht. Die erfolgreiche Transformation wurde zum einen durch das Wachstum der Plasmid enthaltenden Zellen in Selektionsmedium ohne Leucin gezeigt, zum anderen wurde das Vorhandensein des richtigen Plasmids durch PCR und Restriktionsverdau nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

In diese Zellen wurden anschließend die cDNA Bibliotheks-Plasmide in einer Transformation im großen Maßstab eingebracht. Die entstandenen Klone wurden auf große SC-Leu-Trp-His+25mM 3AT Platten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Es sollten hier nur solche Zellen hochwachsen, die beide Plasmide enthalten, und deren Produkte miteinander interagieren. Zur Berechnung der Transformationseffizienz wurden kleine Aliquots des Transformationsansatzes auf SC-Leu-Trp Platten aufgetragen; durch Auszählung der gewachsenen Kolonien und Hochrechnung auf die insgesamt plattierte Menge kann bestimmt werden, wie viele Klone beide Plasmide enthalten sollten. Dadurch kann berechnet werden, wie viele Klone gescreent wurden. Der Screen wurde für beide Konstrukte (pDBLeu-RasGAP und pDBLeu-SH3) mit jeweils zwei der drei Amplifikate der Bibliothek (SS2, SS2 und liquid) durchgeführt, aufgrund geringer Transformationseffizienzen teilweise mehrmals. In Tabelle 11 ist die jeweils insgesamt erreichte Anzahl gescreenter Klone angegeben.

3.2.3.2. Masterplatte

Die Kolonien, die auf dem Selektionsmedium nach bis zu dreizehn Tagen gewachsen waren (His⁺ Klone), wurden wiederum auf SC-Leu-Trp-His+25mM 3AT ausgestrichen. Dadurch wurde nochmals auf interagierende Proteine selektiert; diese Klone wurden weiter getestet. Sie wurden auf eine Masterplatte aufgetragen, gemeinsam mit einer Negativkontrolle (MaV203 mit pDBLeu-RasGAP oder pDBLeu-SH3 und dem leeren Vektor pPC86) und den Kontrollstämmen A-E zur Kontrolle der richtigen Handhabung. Ein Beispiel einer solchen Masterplatte ist in Abb. 19A abgebildet.

3.2.3.3. Interaktionstests

Die Kolonien wurden von der Masterplatte nach Wachstum bei 30°C für 18h in der angegebenen Reihenfolge auf folgende Platten gestempelt: zuerst YPDA Medium mit Nylonmembran, danach SC-Leu-Trp-Ura, zuletzt SC-Leu-Trp-His.

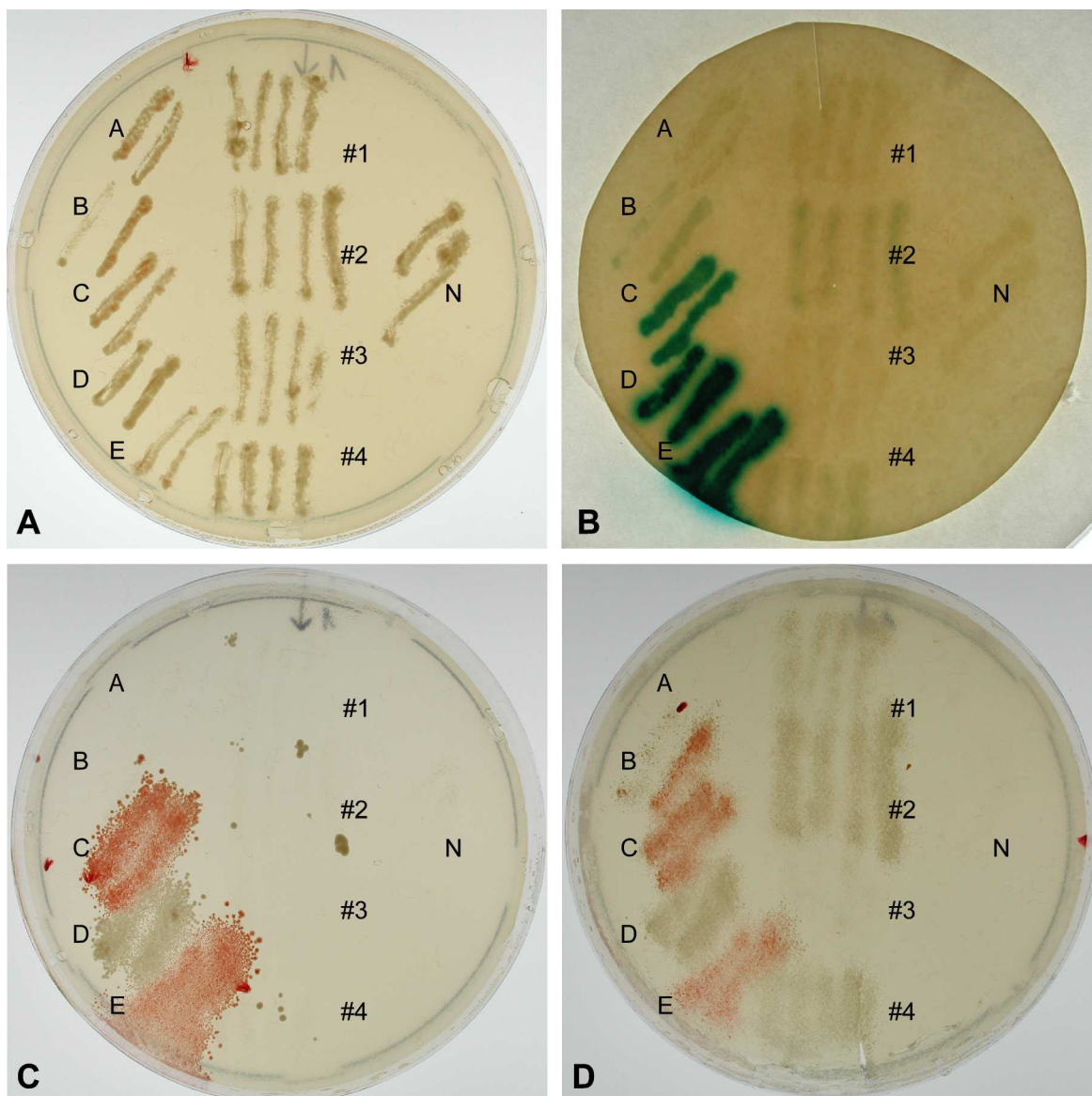


Abb. 19: Masterplatte und Ergebnisse von Interaktionstests.

Dargestellt sind als Beispiel die Ergebnisse eines Interaktionstests aus dem Screen für die SH3 Domäne mit dem *liquid* Amplifikat. Jeweils zwei Einzelkolonien der Kontrollstämme A bis E wurden im linken Teil der Masterplatte ausgestrichen, im rechten Teil der Platte zwei Kolonien der Negativkontrolle (N; MaV203(pDBLeu-SH3/pPC86)). In der Mitte wurden untereinander jeweils vier Kolonien von vier verschiedenen (#1-4), nach dem Screen und nach abermaligem Ausstreichen auf Platten ohne Histidin gewachsenen Klonen aufgetragen. Das Bild (A) zeigt die Platten nach Inkubation bei 30°C für 18h. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kolonien auf die Platten für die Interaktionstests gestempelt. In (B) dargestellt ist das Ergebnis des X-gal Assays, in (C) das Wachstum auf einer Ura⁻ Platte und in (D) das Wachstum auf einer His⁻ Platte (Details zu den Inkubationszeiten und eventuellen Replika-Reinigungs-Schritten siehe Text). Die Rotfärbung einzelner Kolonien (Kontrollstamm B, C und E) kommt durch die *ade2⁻* Mutation zustande.

Kontrollstamm A zeigt wie erwartet keine Interaktion und damit keine Blaufärbung im X-gal Assay und kein Wachstum auf den Selektionsplatten; dasselbe gilt für die Negativkontrolle N. Kontrollstamm B zeigt eine schwache Interaktion und entsprechend eine schwache Blaufärbung im X-gal Assay sowie Wachstum auf der Platte ohne Histidin. Auf der Platte ohne Uracil wächst dieser Kontrollstamm wie erwartet nicht. Die Kontrollstämme C bis E, welche für mäßig bis sehr starke Interaktion stehen, zeigen eine dunkle Blaufärbung und gutes Wachstum auf den Selektionsplatten.

Der getestete Klon #1 zeigt keine Blaufärbung im X-gal Test sowie kein Wachstum ohne Uracil und nur ein schwaches Wachstum ohne Histidin, welches aber auch durch unzureichende Replika-Reinigung zustande kommen kann; dieser Klon wird als negativ in Bezug auf eine Interaktion gewertet. Klon #3 ist in allen drei Tests negativ. Die Klone #2 und #4 zeigen eine schwache Blaufärbung im X-gal Assay sowie Wachstum auf der His⁻ Platte, allerdings kein Wachstum auf der Ura⁻ Platte und sind damit in den Phänotypen vergleichbar dem Kontrollstamm B, der eine schwache Interaktion repräsentiert. Sie können als potentiell positive Kandidaten gewertet werden; dieses Ergebnis muss anschließend zunächst in einem Retransformations-Versuch verifiziert werden.

Nach Inkubation für 24h bei 30°C wurden die auf der Nylonmembran gewachsenen Kolonien einem X-gal Assay unterzogen; Blaufärbung erfolgte nur, wenn das Reporter-gen *lacZ* aktiv war (*lacZ*⁺ Klone) (Beispiel siehe Abb. 19B). Die Selektionsplatten wurden ebenfalls bei 30°C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten (siehe Abb. 11) mittels Replica-Reinigung von Zellresten befreit, um echtes Wachstum von Resten übertragenen Zellmaterials unterscheiden zu können. Kolonien konnten nur wachsen, wenn das entsprechende Reporter-gen (*URA3* beziehungsweise *HIS3*) aufgrund der Interaktion der Proteine aktiv war (Beispiel siehe Abb. 19C und 19D).

3.2.3.4. Ergebnisse der Yeast Two Hybrid Screens

In Tabelle 11 sind die erzielten Ergebnisse zusammengefasst; da der X-gal Assay am eindeutigsten auszuwerten war, wurden die Ergebnisse aus den beiden Selektionsplatten nicht gesondert aufgeführt:

Bibliotheks-Amplifikat	Anzahl gescreente Klone		His ⁺ Klone		davon getestete Klone		davon <i>lacZ</i> ⁺ Klone		positive Klone (Retransformation)	
	RasGAP	SH3	RasGAP	SH3	RasGAP	SH3	RasGAP	SH3	RasGAP	SH3
SS1	3 x10 ⁵	-	155	-	87	-	0	-	-	-
SS2	-	6 x10 ⁴	-	9	-	9	-	5	-	0
liquid	1 x10 ⁵	5 x10 ⁵	60	131	47	25	0	3	-	0

Tab. 11: Ergebnisse der durchgeführten Two Hybrid Screens.

Für die *RasGAP* cDNA wurden insgesamt 300.000 Klone aus dem SS1 und 100.000 Klone aus dem *liquid* Amplifikat gescreent. Nach Ausplattieren der mit beiden Vektoren transformierten Zellen wuchsen davon 155 beziehungsweise 60 auf den Platten ohne Histidin; diese Hefen, die Plasmide für möglicherweise interagierende Proteine enthielten, wurden abermals auf Platten ohne Histidin ausgestrichen. Hier wuchsen nur noch 87 beziehungsweise 47 der Klone. Diese wurden auf Masterplatten überimpft und den oben angegebenen Interaktionstests unterzogen. Keiner der Klone zeigte im X-gal Assay oder auf den beiden Selektionsplatten ein positives Ergebnis.

Für die cDNA der SH3 Domäne wurden 60.000 Klone aus dem SS2 Amplifikat untersucht, aus dem *liquid* Amplifikat sogar eine halbe Million Klone. Davon wuchsen neun beziehungsweise 131 auf Platten ohne Histidin, neun beziehungsweise 25 davon wurden weiter getestet. Fünf beziehungsweise drei der Klone zeigten im X-gal Assay eine Blaufärbung. Zur Überprüfung wurden die Plasmide aus den Hefezellen mittels Hefe-Miniprep isoliert, in *E. coli* amplifiziert und wieder in Hefezellen transformiert. Mit den retransformierten Zellen wurde wieder eine Masterplatte angeimpft und die Interaktionstests durchgeführt. Hier waren die Ergebnisse allerdings nicht positiv.

Wie sich bei Sequenzierung der aus den lacZ⁺ Klonen isolierten Bibliotheks-Plasmide herausstellte, codierten die enthaltenen Inserts zum Teil für bekannte Falsch-Positive wie mitochondriale rRNAs oder mitochondriale Proteine, oder es konnte keine signifikante Ähnlichkeit zu einem Gen aus *Drosophila melanogaster* gefunden werden. Lediglich in einem Fall ließ die Sequenzierung darauf schließen, dass tatsächlich ein funktionelles Protein entstehen könnte. Dabei handelte es sich jedoch um ein Strukturprotein der Kutikula, welches in keinem offensichtlichen Zusammenhang mit der Funktion von RasGAP steht. Da darüber hinaus der Retransformations-Versuch ein negatives Ergebnis geliefert hatte, wurde dieser Klon ebenfalls als Falsch-Positiv gewertet.

Damit ist festzustellen, dass im hier durchgeführten Yeast Two Hybrid Screen kein Interaktionspartner von *Drosophila* RasGAP oder seiner SH3 Domäne identifiziert werden konnte. Dafür können zahlreiche Gründe angeführt werden, die in der Diskussion (Abschnitt 4.2) ausführlich behandelt werden. Einer davon ist, dass beispielsweise Interaktionen der SH2 Domänen, über die die meisten der bisher identifizierten Interaktion von RasGAP stattfinden, mit diesem System grundsätzlich nicht detektiert werden können, da die SH2 Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste binden und solche posttranskriptionalen Modifikationen in Hefezellen nicht stattfinden. Um die Bedeutung dieser Domänen, die für die Funktion von RasGAP in Bezug auf den Neurodegenerations-Phänotyp besonders wichtig zu sein scheinen, genauer zu charakterisieren, wurden deshalb verschiedene weitere Versuche unternommen, die in den folgenden Teilen dieser Arbeit erläutert werden.

3.3. Analyse genetischer Interaktionen von *RasGAP* mit *Crk*

3.3.1. Herstellung von *UAS-Crk* und *UAS-Crk-RNAi* Fliegenlinien

3.3.1.1. Beeinflussung des Gleichgewichts der Expression von *RasGAP* und *Crk*

Crk (von *chicken tumour virus no. 10 regulator of kinase*) ist ein SH2/SH3 Adaptor Protein, das, wie *in vitro* gezeigt wurde, wie *RasGAP* ebenfalls über eine SH2 Domäne an den EGFR bindet und mit *RasGAP* dabei in einer quantitativen Konkurrenz steht (Birge *et al.*, 1992); außerdem ist die Konsensus-Bindungs-Sequenz im Rezeptor für *Crk* (pYXXP; Songyang *et al.*, 1993) sehr ähnlich derjenigen für *RasGAP* (pYXXPXD). *Crk* besitzt zwar selbst keine katalytische Aktivität, bindet jedoch unter anderem an den *C3G exchange factor*, der *Rap1* und damit nachgeschaltete Signalwege aktiviert (Übersichtsartikel Feller, 2001). Denkbar wäre, dass im wildtypischen Zustand eine Konkurrenz zwischen *RasGAP* und *Crk* um die Bindestelle am EGFR stattfindet, die im Normalzustand zur richtigen Balance zwischen Hemmung und Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führt. Fehlt jedoch aufgrund der *vap* Mutation die Bindung von *RasGAP*, überwiegt die Bindung von *Crk* und es kommt zur übermäßigen Aktivierung, die tödlich für die Zellen ist.

Diese Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Beeinflussung der Expressionsstärke von *Crk* untersucht werden. Deshalb sollten Fliegenlinien hergestellt werden, die ein *UAS* oder ein *UAS-RNAi* Konstrukt für das *Drosophila melanogaster Crk* Gen tragen, um die Folgen der Überexpression beziehungsweise des Funktionsverlusts des Gens in verschiedenen Geweben im wildtypischen oder im *vap* mutanten Hintergrund zu analysieren.

3.3.1.2. Klonierung der Konstrukte

Für das *UAS-Crk* Konstrukt wurde die cDNA für das *Drosophila melanogaster Crk* Gen aus dem cDNA Klon LD08427 im pBlueskriptSK(-) Vektor mittels Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* ausgeschnitten und über dieselben Schnittstellen in 5'→3' Orientierung in die *multiple cloning site* des pUAST Vektors ligiert. Die richtige Basenfolge wurde durch anschließende Sequenzierung verifiziert (siehe Abb. A1 im Anhang).

Für das *UAS-Crk-RNAi* Konstrukt wurde mittels PCR mit den Primern *Crk_RNAi_sense* und *Crk_RNAi_antisense* ein 462bp langes Stück aus dem cDNA Klon amplifiziert und in den pGEM-T-Easy Vektor subkloniert. Daraus wurde das Stück mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *SpeI* ausgeschnitten, wobei die *XbaI* Schnittstelle aus dem Primer *Crk_RNAi_antisense* und die *SpeI* Schnittstelle aus pGEM-T-Easy verwendet wurde. Nach Gelextraktion wurde das DNA Stück auf der 3' Seite des *white* Introns in mit *NheI* geschnittenen und gezippten pWIZ Vektor ligiert. Dies ist möglich, da die entstehenden DNA Überhänge dieser Enzyme miteinander ligationskompatibel sind. Die Insertion des DNA Inserts erfolgte in zufälliger Orientierung und wurde mittels

Sequenzierung überprüft; da das Insert in 3'→5' Richtung orientiert war, musste das Insert auf der anderen Seite des *white* Introns aus dem pWIZ Vektor in der entgegengesetzten Orientierung, also von 5'→3' inseriert werden.

Dazu wurde das Stück wiederum aus dem cDNA Klon amplifiziert, diesmal jedoch unter Verwendung der Primer Crk_RNAi_BglII_s und Crk_RNAi_XhoI_as. Das DNA Stück wurde in pGEM-T-Easy kloniert, über die BglII und XhoI Schnittstellen der Primer daraus ausgeschnitten und in gerichteter Orientierung von 5'→3' auf der 5' Seite des Introns in mit den beiden Enzymen geschnittenen pWIZ Vektor, in den das Insert wie oben angegeben auf der 3' Seite des Introns in 3'→5' Orientierung inseriert worden war, ligiert. Zur Überprüfung wurde mit dem Ligationsprodukt ein Testverdau durchgeführt, der die erwarteten Banden lieferte (Daten nicht gezeigt). Eine vollständige Sequenzierung gelang nicht, da sich während der für die Sequenzierreaktion notwendigen PCR durch die zweimalige Insertion derselben Sequenz in entgegengesetzter Orientierung Haarnadelstrukturen ausbilden. Eventuell während der Amplifizierung entstandene Punktmutationen wären darüber hinaus bei einem RNAi Konstrukt nicht sehr störend, da sie die Funktionalität des Konstrukts, nämlich die Bildung einer doppelsträngigen RNA, nicht stark beeinträchtigen würden. Es konnte jedoch zumindest auf beiden Seiten der Anfang des Inserts in der gewünschten Orientierung verifiziert werden, und der Abbruch der Sequenz, der vermutlich durch die Haarnadelbildung zustande kommt, gibt zudem auch schon einen Hinweis auf die Funktionalität des Konstruktes. Die erwartete Sequenz des Konstruktes ist im Anhang (Abb. A2) angegeben.

3.3.1.3. Keimbahntransformation und Etablierung stabiler Linien

Die Konstrukte wurden jeweils mittels Keimbahntransformation in Fliegenembryonen mit dem Genotyp $w^{1118}/yw; ; \Delta 2-3, ki/+$ oder $w^{1118}/y; ; \Delta 2-3, ki/+$ eingebracht. Die geschlüpften Fliegen wurden zur Überprüfung der erfolgreichen Integration ins Genom und Entfernung der Transposase-Aktivität (erkennbar am Marker *kinked*) mit w^{1118} Fliegen gekreuzt. Rotäugige Nachkommen ohne Transposase wurden danach zur Identifizierung des Integrations-Chromosoms und zur Etablierung stabiler Linien mit Fliegen eines Doppelbalancer-Stamms gekreuzt.

Ingesamt konnten vier Stämme etabliert werden, die das *UAS-Crk* Konstrukt auf dem zweiten Chromosom tragen (*UAS-Crk*_{4.2.1}, *UAS-Crk*_{4.2.2}, *UAS-Crk*_{10.2.1} und *UAS-Crk*_{10.3.2}) und zwei Linien, bei denen das Konstrukt auf dem dritten Chromosom integriert ist (*UAS-Crk*_{1.5.3} und *UAS-Crk*_{1.7.1}). Außer dem Stamm *UAS-Crk*_{1.5.3}, bei dem das Chromosom mit dem *UAS* Konstrukt über *TM3* balanciert ist, sind alle Stämme homozygot lebensfähig.

Für das *UAS-Crk-RNAi* Konstrukt wurden drei homozygote Linien etabliert, von denen zwei das Konstrukt auf dem zweiten Chromosom tragen (*UAS-Crk-RNAi*_{2.1.2} und *UAS-Crk-RNAi*_{3.8.2}), und eine Linie, bei der es auf dem dritten Chromosom integriert ist (*UAS-Crk-RNAi*_{1.1.1}).

3.3.2. Überprüfung der Funktionalität der Konstrukte

3.3.2.1. Nachweis der Überexpression von *Crk* mittels semi-quantitativer RT-PCR

Zunächst wurde die Auswirkung der ubiquitären Expression des *UAS-Crk* Konstruktes in wildtypischen Fliegen untersucht. Dazu wurde die Linie *UAS-Crk*_{1.5.3}/*TM3* mit Fliegen des Treiberstammes *actin-GAL4/TM6B* gekreuzt. Die Nachkommen mit dem Genotyp *UAS-Crk*_{1.5.3}/*actin-GAL4* kamen im erwarteten Verhältnis vor, zeigten jedoch keine offensichtlichen Phänotypen. Die Funktionalität des Konstruktes wurde daraufhin mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht; dazu wurde die RNA aus 25 Männchen des angegebenen Genotyps unter Verwendung des RNeasy® Mini Kits isoliert, parallel dazu zur Kontrolle aus 25 Männchen des Genotyps *UAS-Crk*_{1.5.3}/+, die aus einer Kreuzung von *UAS-Crk*_{1.5.3}/*TM3* mit dem *w*¹¹¹⁸ Stamm hervorgegangen waren. Nach photometrischer Bestimmung von Reinheit und Konzentration wurde die RNA Extraktion mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kit von DNA Verunreinigungen befreit und in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Template in einer semi-quantitativen PCR mit Primern aus dem *Crk* Gen sowie in parallelen Ansätzen mit Primern aus dem *rp49* Haushaltsgen zur internen Kontrolle der eingesetzten Template Mengen. Die Gelelektrophorese der Produkte ergab folgendes Bild (siehe Abb. 20): nach 15 Amplifikations-Zyklen war mit beiden Primern (*rp49* und *Crk*) und beiden cDNA Templates (Kontrolle K und Überexpression Üe) jeweils noch kein Produkt zu sehen. Für das Haushaltsgen waren die Banden nach 22 und 33 Zyklen in den beiden Ansätzen gleich stark, was zeigt, dass jeweils dieselben cDNA Mengen eingesetzt worden waren. Im Gegensatz dazu war nach Amplifikation für 22 Zyklen mit den *Crk* Primern die Produktmenge im Überexpressions-Ansatz höher, wodurch gezeigt werden konnte, dass die *Crk* cDNA Menge in den entsprechenden Fliegen höher war als in den Kontrollfliegen. Nach 33 Zyklen konnte dieser Unterschied aufgrund einer Sättigung der Reaktion nicht mehr festgestellt werden.

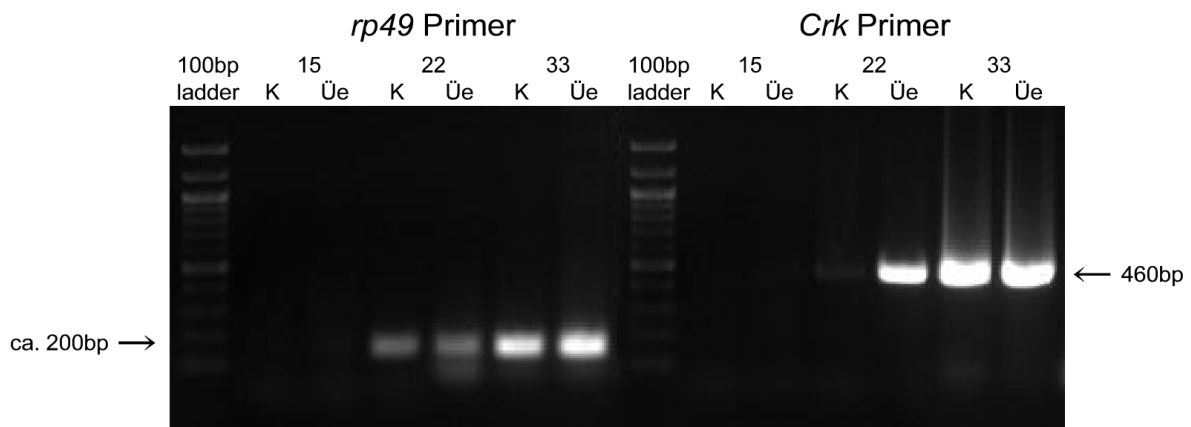


Abb. 20: Semi-quantitative RT-PCR zur Überprüfung der Überexpression des *Crk* Gens bei *actin-GAL4* getriebener Expression von *UAS-Crk*.

Zu sehen ist das Ergebnis einer RT-PCR mit Primern für ein Haushaltsgen (*rp49*) sowie *Crk* spezifischen Primern (*Crk*). Als Template diente cDNA aus Fliegen, welche das *UAS-Crk* Konstrukt ubiquitär überexprimieren (Üe) und zur Kontrolle aus solchen Fliegen, die zwar das Konstrukt, jedoch keinen Treiber enthalten, in denen das *Crk* Gen also auf wildtypischem Niveau exprimiert sein sollte (K). Die Amplifikation wurde jeweils nach 15, 22 und 33 Zyklen abgebrochen.

Nach 15 Zyklen ist jeweils noch kein Produkt zu sehen. Bei den circa 200bp großen Haushaltsgen-Banden lassen sich nach 22 oder 33 Zyklen keine quantitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen (Üe und K) erkennen; das zeigt, dass jeweils dieselbe Template-Menge eingesetzt wurde. Die circa 460bp große *Crk* Bande ist nach 22 Zyklen in der Kontrolle nur schwach zu sehen, in den Überexpressions-Fliegen jedoch recht stark. Nach 33 Zyklen ist aufgrund einer Sättigung der Reaktion kein Unterschied mehr zu erkennen. Es lässt sich somit feststellen, dass ubiquitäre Expression des *UAS-Crk* Konstrukts zu einer Erhöhung der cDNA Menge für dieses Gen führt.

Eine Wiederholung des Versuchs führte zum selben Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Somit konnte gezeigt werden, dass die ubiquitäre Expression des *UAS-Crk* Konstruktes tatsächlich zu einer Erhöhung der cDNA Menge für dieses Gen führt, das Konstrukt also funktioniert.

3.3.2.2. Nachweis der Funktionalität von *UAS-Crk-RNAi*: der *bent tibia* Phänotyp

Auch die Linie *UAS-Crk-RNAi_{1.1.1}(III)* wurde mit Fliegen des Treiberstammes *actin-GAL4/TM6B* gekreuzt. Zunächst wurde angenommen, der Genotyp *UAS-Crk-RNAi_{1.1.1}/actin-GAL4* sei letal, da in den Gläsern keine lebenden adulten Nachkommen dieses Genotyps gefunden werden konnten. Bei einer genaueren Auszählung stellte sich jedoch heraus, dass genauso viele leere Puppen dieses Genotyps wie des Genotyps *UAS-Crk-RNAi_{1.1.1}/TM6B*, zu erkennen an der kürzeren, gedrungeneren Form, in den Gläsern gefunden werden konnten. Die Fliegen waren also geschlüpft, offensichtlich jedoch kurz nach dem Schlüpfen gestorben. Derselbe Effekt zeigte sich auch bei Überexpression im *vap¹* oder *vap²* Hintergrund.

Wie sich bei genauerer Untersuchung herausstellte, blieben die frisch geschlüpften Tiere aufgrund eines *bent tibia* Phänotyps im Brei kleben und starben. Bei den betroffenen Fliegen zeigt die Tibia im dritten Beinpaar einen Knick (Abb. 21). Dies führt dazu, dass die Fliegen sich nicht normal bewegen können, wodurch sie wohl im Brei kleben bleiben.

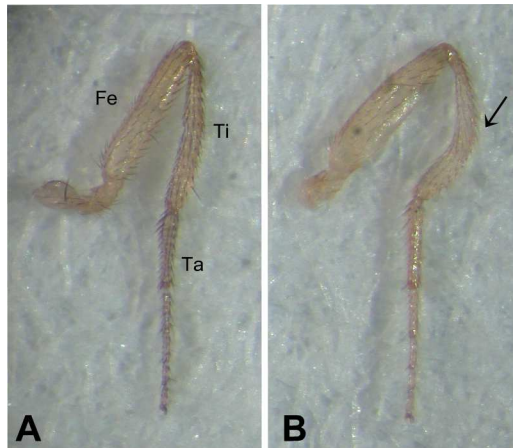


Abb. 21: Der *bent tibia* Phänotyp von *UAS-Crk-RNAi* ubiquitär überexprimierenden Fliegen.

Abgebildet ist jeweils das dritte Bein einer wildtypischen Fliege (*CantonS*) (A) und einer Fliege mit dem Genotyp *UAS-Crk-RNAi/actin-GAL4* (B). Deutlich zu erkennen ist ein Knick (Pfeil) in der Tibia bei der RNAi Fliege, der in wildtypischen Fliegen nicht vorkommt und der eine Störung der Bewegungsfähigkeit verursacht, welche zum Festkleben der adulten Fliegen im Brei und dadurch zum Tod der Fliegen in normalen Fliegengläsern führt.

Fe: Femur, Ti: Tibia, Ta: tarsale Segmente 1-5.

Der *bent tibia* Phänotyp wurde von Ward *et al.* (2003) beschrieben und für seine Entstehung wird der kleinen GTPase Rho1 eine Rolle zugeschrieben. Auch die Funktion von Crk steht mit der Regulation solcher kleiner GTPasen in einem Zusammenhang, wodurch die Annahme einer Verbindung zwischen der Unterdrückung der Expression von *Crk* und dem Auftreten des Phänotyps gestützt wird.

Eine weitere Untersuchung der Fliegen war jedoch leider nicht möglich, da auch eine Haltung auf Filterpapier schwierig war und nur wenige Fliegen überlebten; möglicherweise führt die ubiquitäre Überexpression von *UAS-Crk-RNAi* auch zu einer Verkürzung der Lebensspanne. Jedenfalls ist die Funktionalität des *UAS-Crk-RNAi* Konstrukts damit ebenfalls bewiesen.

3.3.3. Auswirkungen der Überexpression der *Crk* Konstrukte mit Hilfe verschiedener Treiber

Da sich mit dem *actin-GAL4* Treiber kein Phänotyp zeigte, wurde der Stamm *UAS-Crk_{1.5.3}/TM3* auch mit dem Treiberstamm *Da-GAL4(III)* gekreuzt; dieser führt ebenfalls zu ubiquitärer Expression. Doch auch mit diesem Treiber konnte kein Effekt der Überexpression festgestellt werden. Zur gezielten Missexpression in verschiedenen Geweben wurde noch mit den Treiberstämmen *GMR-GAL4(II)* und *MS1096(I)* gekreuzt. Dies führte jedoch weder zu einem Phänotyp im Auge (*GMR-GAL4*), noch im Flügel (*MS1096*). Für die Treiber *actin-GAL4* und *GMR-GAL4* wurde die Missexpression auch im *vap²* Hintergrund durchgeführt, auch hier zeigte sich jedoch kein Effekt. Auch Überexpression des *UAS-Crk-RNAi* Konstruktes mit dem *GMR-* oder *MS1096-GAL4* Treiber zeigte keinen Phänotyp in den betroffenen Strukturen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Crk möglicherweise in den untersuchten Geweben keine entscheidende Funktion besitzt beziehungsweise die Missexpression hier durch andere Faktoren ausgeglichen werden kann. Die Funktion von RasGAP wird vor

allem in Neuronen gebraucht. Deshalb wurden die *Crk* Konstrukte schließlich mit Hilfe des neuronalen Treibers *appl-GAL4* in den Neuronen wildtypischer sowie *vap²* mutanter Fliegen exprimiert.

3.3.4. Beeinflussung des *vap²* Neurodegenerations-Phänotyps durch Überexpression der *Crk* Konstrukte mit Hilfe neuronaler Treiber

Dazu wurden Jungfrauen der Stämme *appl-GAL4(III)* oder *vap²/vap²; +;appl-GAL4/SM6::TM6B* mit Männchen der Stämme *UAS-Crk_{1.5.3}/TM3* oder *UAS-Crk-RNAi_{1.1.1}(III)* gekreuzt und die männlichen Nachkommen, die Konstrukt und Treiber tragen, abgesammelt. Zur Kontrolle wurden auch Männchen des Wildtypstammes *CantonS* sowie der Treiberstämme mitgeführt. Die Fliegen wurden jeweils 20 Tage gealtert, dann wurden Paraffinschnitte angefertigt (Abb. 22).

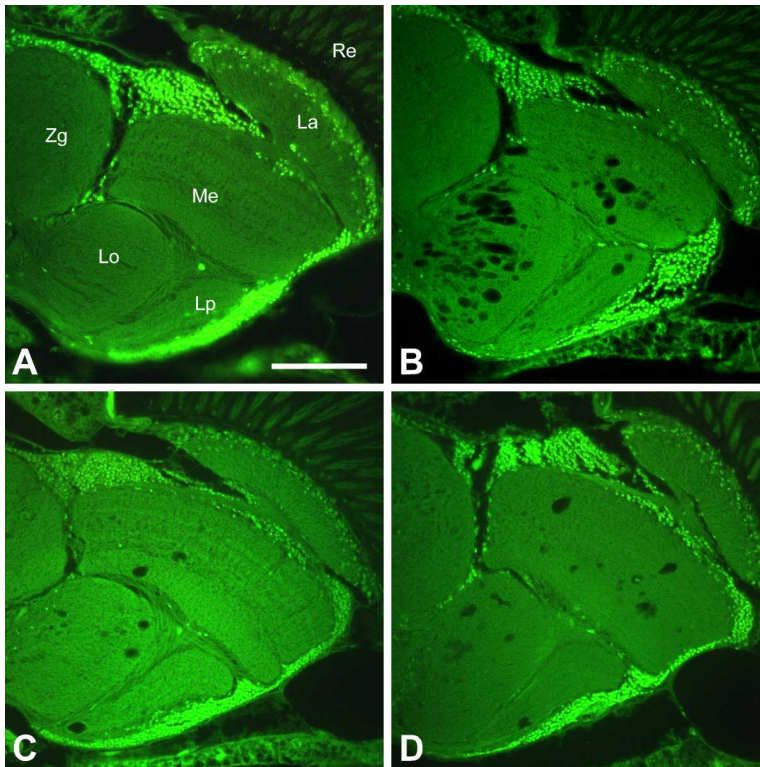


Abb. 22: Neurodegeneration von *vap²* Fliegen bei neuronaler Expression von *UAS-Crk* oder *UAS-Crk-RNAi*.

Männchen des Stammes *CantonS* (A) zeigen in horizontalen Paraffinschnitten mit 20 Tagen keine Vakuolisierung des Gehirngewebes, wie dies bei gleich alten männlichen *vap²* Fliegen (B) der Fall ist. Ein Phänotyp zeigt sich auch nach neuronaler Expression der Konstrukte *UAS-Crk* (C) oder *UAS-Crk-RNAi* (D) in 20 Tage alten *vap²* Fliegen.

Genotypen: (A) *CS/Y*, (B) *vap²/Y*, (C) *vap²/Y; UAS-Crk/appl-GAL4*, (D) *vap²/Y; UAS-Crk-RNAi/appl-GAL4*.

Zg: Zentralgehirn, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte, Me: Medulla, La: Lamina, Re: Retina. Maßstab: 50µm.

Fliegen des Stammes *CantonS* zeigen in diesem Alter keine Neurodegeneration (Abb. 22A), ebenso wie 20 Tage alte Männchen des Treiberstammes *appl-GAL4* (nicht gezeigt). Auch die Überexpression der Konstrukte im wildtypischen Hintergrund führte nicht zu einer Vakuolisierung (nicht gezeigt); damit genügt Überexpression beziehungsweise durch RNAi ausgelöste Verminderung der Expression, zumindest in der hier untersuchten Stärke, von *Crk* in Neuronen nicht aus, um einen *vap* ähnlichen Neurodegenerations-Phänotyp herbeizuführen. Männchen der Linie *vap²* (Abb. 22B) zeigen dagegen, ebenso wie solche des Genotyps *vap²/Y; +/+; UAS-Crk(-RNAi)/appl-GAL4* (Abb. 22C und 22D), eine Vakuolisierung in den optischen Loben.

Die Vakuolisierung in Lobula und Medulla wurde mit Hilfe der AnalySIS-Software quantifiziert; zur Berechnung wurde jeweils aus den Werten beider Hemisphären eines Kopfes in drei aufeinanderfolgenden Schnitten der Mittelwert gebildet. Pro Genotyp wurden jeweils vier bis fünf Köpfe ausgewertet (Abb. 23).

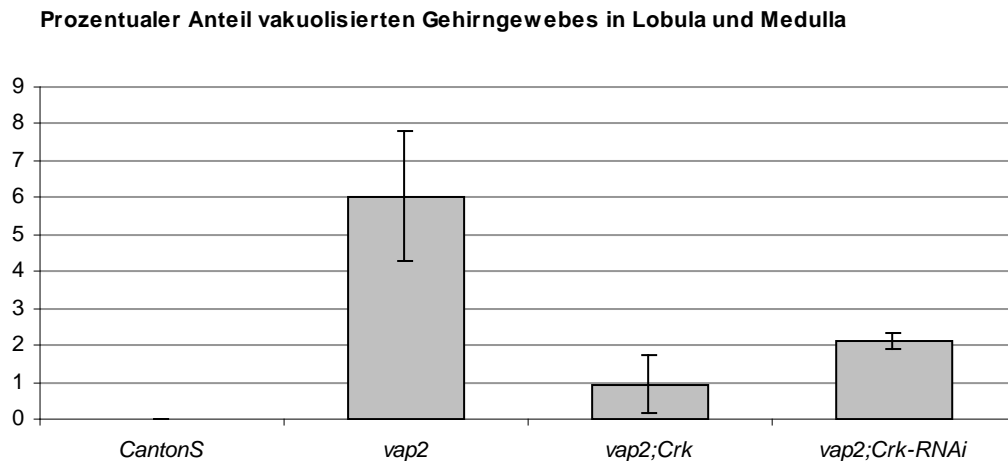


Abb. 23: Beeinflussung des Neurodegenerations-Phänotyps von *vap*² Fliegen durch neuronale Expression von *UAS-Crk* oder *UAS-Crk-RNAi*.

20 Tage alte männliche *vap*² Fliegen zeigen circa 6% Vakuolisierung des Gewebes in Lobula und Medulla. Neuronale Expression des Konstruktes *UAS-Crk* in *vap*² Fliegen mit dem Treiber *appl-GAL4* reduziert die Neurodegeneration auf in etwa 1%, bei Expression von *UAS-Crk-RNAi* beträgt der Wert circa 2%. Unerklärlicherweise beeinflussen also sowohl eine Überexpression als auch eine Reduktion der Menge von *Crk* den *vap* Neurodegenerations-Phänotyp positiv.

Genotypen: **CantonS:** *CS/Y*, ***vap2*:** *vap*²/*Y*, ***vap2;UAS-Crk*:** *vap*²/*Y*; *UAS-Crk/appl-GAL4*, ***vap2;UAS-Crk-RNAi*:** *vap*²/*Y*; *UAS-Crk-RNAi/appl-GAL4*.

In 20 Tage alten *vap*² Männchen sind etwa 6% der Fläche der optischen Loben vakuolisiert, wobei sich jedoch, wie anhand der großen Fehlerbalken zu sehen ist, eine starke Variation des Phänotyps zeigt. Überexpression von *UAS-Crk*_{1.5.3} im *vap*² Hintergrund führt bei 20 Tage alten Männchen zu etwa 1% Vakuolisierung, Überexpression von *UAS-Crk-RNAi*_{1.1.1} zu etwa 2%. Es ist also festzustellen, dass neuronale Überexpression von *UAS-Crk* im *vap*² Hintergrund nicht, wie vielleicht zu erwarten gewesen wäre, zu einer Verschlechterung des Neurodegenerations-Phänotyps führt, sondern so wie Verringerung der Menge an *Crk* durch neuronale Expression des *UAS-Crk-RNAi* Konstruktes zu einer Verbesserung. Eigentlich sind darüber hinaus generell Zweifel an der Funktionalität der neuronalen Expression von RNAi Konstrukten angebracht, da hier oft Probleme auftreten (Dietzl *et al.*, 2007). Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist es schwierig, den Einfluss der Überexpression der *Crk* Konstrukte sicher zu interpretieren.

Ein Einfluss von *Crk* auf den *vap* Neurodegenerations-Phänotyp und damit eine genetische Interaktion der beiden Adaptor-Proteine konnte in den hier durchgeführten Versuchen somit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es gibt jedoch weitere Ansatzpunkte, um der Funktion von RasGAP genauer auf den Grund zu gehen. Beispielsweise ist für den N-terminalen Teil des Säugetier-Homologen eine anti-

apoptotische Funktion bekannt, die möglicherweise auch in *Drosophila* für das Überleben der Zellen von Bedeutung sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurden die im nächsten Teil dieser Arbeit beschriebenen Experimente durchgeführt.

3.4. RasGAP und Apoptose: der N-terminale Teil von RasGAP als möglicher genereller Überlebensfaktor

3.4.1. Apoptose in *Drosophila melanogaster*

3.4.1.1. Anti-apoptotische Funktion von Fragment N und Induktion von Apoptose in *Drosophila melanogaster*

Wie Wen *et al.* (1998) in Untersuchungen an Jurkat Zellen feststellten, wird RasGAP während der Apoptose von Caspasen gespalten. Yang & Widmann (2001) fanden heraus, dass das dabei entstehende Fragment N eine anti-apoptotische Wirkung besitzt. Neuronale Expression des Konstruktes *UAS-17.30* kann, wie im Abschnitt 3.1.3. beschrieben, den Neurodegenerations-Phänotyp von *vap* Fliegen vollständig retten. Das durch dieses Konstrukt codierte Teilstück von *Drosophila* RasGAP besitzt Ähnlichkeit zum erwähnten Fragment N. Deshalb sollte untersucht werden, ob möglicherweise dieses Proteinfragment auch in Fliegen eine generelle anti-apoptotische Funktion besitzt, die zur Rettung des Neurodegenerations-Phänotyps von *vap* Fliegen führt.

Es ist bekannt, dass ektopische Expression des Gens *reaper* (*rpr*) zum Zelltod führt; außerdem konnte gezeigt werden, dass Co-Expression von *DIAP1* (*Drosophila inhibitor of apoptosis*) dem entgegenwirken kann (Hay *et al.*, 1995). Mit Hilfe entsprechender Konstrukte sollte ein System zur Untersuchung einer möglichen anti-apoptotischen Wirkung von *UAS-17.30* erstellt werden. Augen und Flügel der Fliege wurden als möglicherweise geeignete Gewebe ausgewählt, da dort auftretende Phänotypen meist gut sichtbar und einfach zu identifizieren sind.

3.4.1.2. Modellsysteme zur Untersuchung von Apoptose in Auge und Flügel der Fliege

Zur Induktion von Apoptose im Auge wurde ein *UAS-rpr* Konstrukt mit Hilfe des *GMR-GAL4* Treibers überexprimiert; dazu wurden Jungfrauen des Treiber-Stammes *GMR-GAL4(II)* mit Männchen des Genotyps *UAS-rpr(II)* gekreuzt. Leider scheint der Treiber *GMR-GAL4* auch in anderen Geweben als dem Auge zu wirken, so dass Expression von *UAS-rpr* mit *GMR-GAL4* letal ist und nicht, wie erwartet, lediglich einen Augen-Phänotyp hervorruft. Folglich konnten aus den Kreuzungen keine Nachkommen gewonnen werden. Parallel zu der oben aufgeführten Kreuzung wurde der Treiber-Stamm zur Überprüfung der Methode allerdings auch mit dem Stamm *UAS-rpr(II); UAS-DIAP1/TM3* gekreuzt. Aus dieser Kreuzung gingen Nachkommen des Genotyps *UAS-rpr/UAS-GMR-GAL4; UAS-DIAP1/+* hervor, die normale Augen hatten. Damit konnte gezeigt werden, dass die durch Überexpression von *UAS-rpr* mit dem Treiber *GMR-GAL4* hervorgerufene Letalität durch Co-Expression von *UAS-DIAP1* gerettet werden kann. Das verwendete System ist somit geeignet, um die anti-apoptotische Wirkung von Konstrukten nachzuweisen.

Zur Überexpression von *UAS-rpr* im Flügel wurde der Treiber *MS1096-GAL4* verwendet. Dazu wurden Jungfrauen des Stammes *MS1096(I)* mit *UAS-rpr(II)* Männchen gekreuzt. Aus dieser Kreuzung gingen nur weibliche Nachkommen (mit dem Genotyp *MS1096/+; UAS-rpr/+*) hervor, bei denen die Entwicklung verzögert war: sie schlüpften erst nach 14 statt nach zehn Tagen. Männliche Nachkommen (Genotyp: *MS1096/Y; UAS-rpr/+*) waren nicht zu finden. Offensichtlich ist der Effekt der *reaper* Überexpression Dosis-abhängig, so dass die in den hemizygoten Männchen aufgrund von *dosage compensation* gegenüber heterozygoten Weibchen stärkere Expression des Treibers *MS1096-GAL4* zur Letalität führt. Aus einer Kreuzung des Treiber-Stammes mit dem Stamm *UAS-rpr(II); UAS-DIAP1/TM3* gingen hingegen auch männliche Nachkommen hervor; durch Expression von *UAS-DIAP1* kann also die Letalität der Männchen gerettet werden. Somit scheint auch dieses System geeignet zu sein, um zu überprüfen, ob ein Konstrukt gegen apoptotischen Zelltod wirkt. Die Expression von *UAS-rpr* mit dem *GMR-GAL4* und dem *MS1096-GAL4* Treiber wurde deshalb eingesetzt, um eine mögliche anti-apoptotische Wirkung von *UAS-17.30* zu analysieren.

3.4.2. Versuch der Rettung durch Expression des N-terminalen Teils von RasGAP

Im Gegensatz zur Rettungskreuzung mit *UAS-DIAP1* gingen aus einer Kreuzung des *GMR-GAL4* Treibers mit Männchen des Stammes *UAS-rpr(II); UAS-17.30/TM3* keine Nachkommen hervor. Überexpression von *UAS-17.30* kann folglich nicht, wie Überexpression von *UAS-DIAP1*, die durch *reaper* induzierte Letalität retten.

Aus Kreuzungen von *MS1096-GAL4(I)* Jungfrauen mit *UAS-rpr(II); UAS-17.30/TM3* Männchen gingen nur weibliche Nachkommen hervor. Männchen, wie bei Co-Expression von *UAS-DIAP1*, konnten dagegen nicht gefunden werden. *UAS-17.30* konnte hier folglich auch nicht retten.

Eine generelle anti-apoptotische Funktion von *UAS-17.30* in *Drosophila melanogaster* ähnlich der von Fragment N in menschlichen Zellen konnte im Rahmen der hier durchgeführten Versuche also nicht nachgewiesen werden. Eine solche war aufgrund verschiedener Hinweise, die in Abschnitt 4.4 näher diskutiert werden, auch nicht unbedingt zu erwarten. Vermutlich ersetzt *UAS-17.30* doch eher eine spezifische Funktion im in den *vap* Mutanten gestörten RasGAP Signalweg. Beim Zelltod in den Neuronen von *vap* Fliegen handelt es sich zudem nicht um apoptotischen Zelltod, sondern um Autophagie. Deshalb sollten mögliche Zusammenhänge zwischen diesem Mechanismus und der *vap* Mutation in den im Folgenden beschriebenen Teilen dieser Arbeit aufgeklärt werden.

3.5. RasGAP und Autophagie: Genetische Interaktionen von RasGAP mit PI3K/Akt/TOR und S6K

3.5.1. Beeinflussung der Aktivität von PI3K, Akt, TOR und S6K

Der wichtigste Signalweg zur Regulierung der Autophagie verläuft über PI3K, Akt und TOR. Ein wichtiges nachgeschaltetes Element von TOR ist auch die S6K, welche Einfluss auf die Translation hat und zudem für die *feedback regulation* des Weges wichtig ist (siehe Abschnitt 1.3.2.2.; Übersichtsartikel Wullschleger *et al.*, 2006). Wie Yue *et al.* (2004) herausfanden, bindet RasGAP an Akt und führt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung dieser Kinase. In den Neuronen von *vap* Mutanten kommt es zu autophagischem Zelltod (Botella *et al.*, 2003). Diese Befunde stellen Hinweise darauf dar, dass möglicherweise in *vap* Mutanten der autophagische Prozess in Neuronen durch den Funktionsverlust von RasGAP dereguliert sein könnte und dies die Neurodegeneration verursacht beziehungsweise beeinflusst.

Für verschiedene Elemente des Signalweges sind Linien mit *UAS* Konstrukten vorhanden, deren Expression zu einer Erhöhung der Menge (*UAS-Dp110*, *UAS-Dakt1*, *UAS-TOR*) oder sogar zur konstitutiven Aktivität der entsprechenden Proteine (*UAS-Dakt^{myr}*) führen sollte; bei den entsprechenden Elementen handelt es sich um solche, die jeweils die Autophagie negativ regulieren. Erhöhung ihrer Menge beziehungsweise Aktivität könnte eine durch die *vap* Mutation möglicherweise verursachte übermäßige Aktivierung der Autophagie kompensieren und somit zu einer Verbesserung des Phänotyps führen. Des weiteren gibt es auch RNAi Konstrukte (*UAS-Dp110-RNAi*, *UAS-Dakt1-RNAi*) beziehungsweise Konstrukte, durch die dominant negative Formen codiert werden (*UAS-TOR^{TED}*), und durch deren Expression die Aktivität der entsprechenden Elemente vermindert oder komplett verhindert werden sollte; ihre Überexpression könnte zu einer Verschlechterung des Phänotyps führen. Für die S6K gibt es sowohl ein *UAS* Konstrukt für die Expression einer konstitutiv aktiven (*UAS-S6K.STDETE*) als auch einer dominant negativen Form (*UAS-S6K.KQ*) (Literaturangaben siehe Tabelle 10).

Diese Konstrukte wurden verwendet, um genetische Interaktionen der Faktoren mit der *vap* Mutation zu untersuchen. Dazu wurden Jungfrauen der *appl-GAL4* Treiberstämme im *vap* Hintergrund (*vap²/vap²*; *+appl-GAL/SM6::TM6B* oder *vap¹/FM7c*; *appl-GAL4/TM3*) mit Männchen der *UAS* Stämme (siehe unten) gekreuzt und die gewünschten männlichen Nachkommen, welche das jeweilige Konstrukt im mutanten Hintergrund mit Hilfe des neuronalen Treibers exprimieren, 20 Tage gealtert und horizontale Paraffinschnitte der Gehirne angefertigt. Als Kontrolle wurden Männchen der Stämme CS (Wildtypkontrolle), *vap¹* und *vap²* sowie männliche Nachkommen aus einer Kreuzung der Treiberstämme im mutanten Hintergrund mit *UAS-17.30* als Positiv-Kontrolle und mit *w¹¹¹⁸* eingesetzt. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit im Einzelnen beschrieben.

3.5.2. Genetische Interaktion von *RasGAP* mit *PI3K*

Zunächst wurden die Nachkommen aus der Kreuzung der oben aufgeführten Treiberstämme im *vap²* Hintergrund mit *UAS-Dp110* (II) und *UAS-Dp110-RNAi* (III) analysiert (Abb. 24); Dp110 ist die katalytische Untereinheit der PI3K aus *Drosophila*.

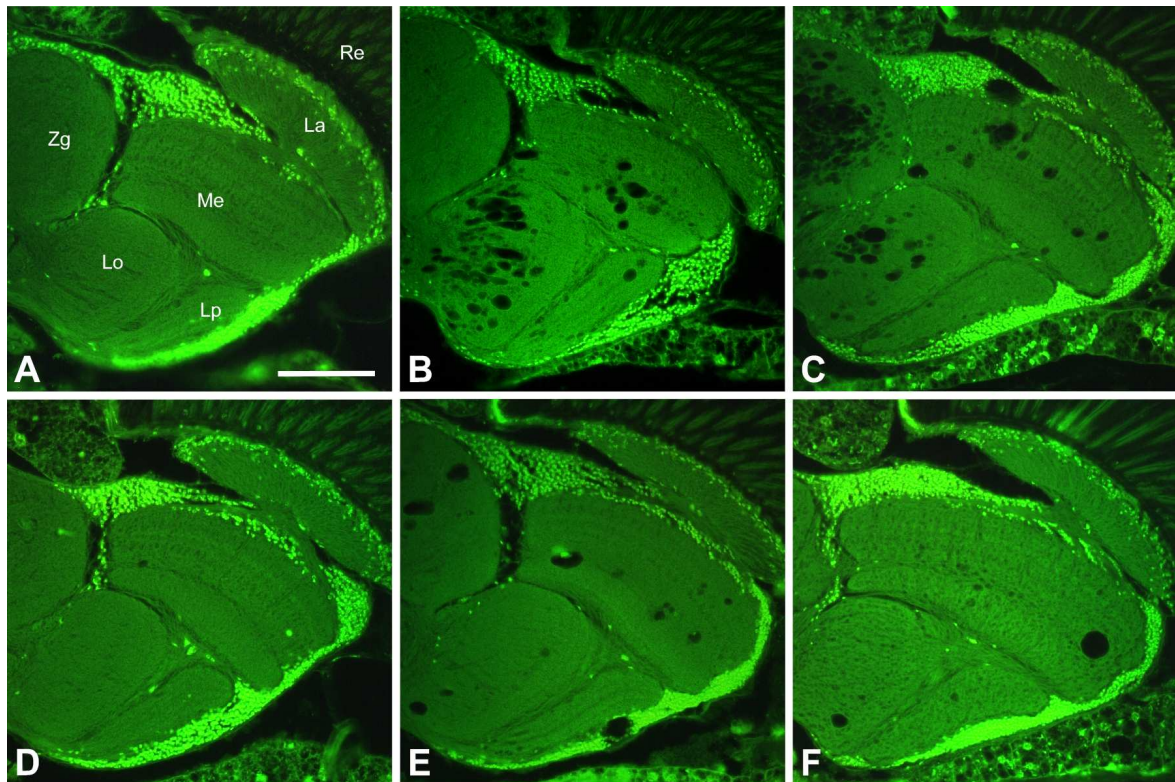


Abb. 24: Genetische Interaktion von *vap²* mit *PI3K*.

Männliche Fliegen der verschiedenen Genotypen (siehe unten) wurden jeweils 20 Tage gealtert und anschließend wurden Paraffinschnitte angefertigt. Kontrollfliegen zeigen keine Neurodegeneration (A). Dahingegen ist in *vap²* Fliegen eine recht starke Vakuolisierung zu beobachten (B). Auch Fliegen der Treiberlinie im *vap²* Hintergrund, rückgekreuzt mit *w¹¹¹⁸*, zeigen wie erwartet einen starken Neurodegenerationsphänotyp (C). Dieser kann durch Überexpression des *UAS-17.30* Konstruktes, wie bereits gezeigt (Abschnitt 3.1.3.), auf das wildtypische Niveau revertiert werden (D). Eine Erhöhung der Gendosis der p110-Untereinheit der PI3K aus *Drosophila melanogaster* führt zu einer Verbesserung des Phänotyps (E), ebenso wie eine mutmaßliche Verringerung der Gendosis durch Expression eines RNAi Konstruktes (F).

Genotypen: (A) *CantonS*, (B) *vap²/Y*, (C) *vap²/Y; +/appl-GAL4*, (D) *vap²/Y; UAS-17.30/appl-GAL4*, (E) *vap²/Y; UAS-Dp110/+; +/appl-GAL4*, (F) *vap²/Y; UAS-Dp110-RNAi/appl-GAL4*.

Zg: Zentralgehirn, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte, Me: Medulla, La: Lamina, Re: Retina. Maßstab: 50µm.

In *CantonS* ist keine Vakuolisierung zu beobachten (Abb. 24A). 20 Tage alte *vap²* Männchen zeigen eine starke Neurodegeneration (Abb. 24B), ebenso wie Fliegen des Treiberstammes, die mit *w¹¹¹⁸* rückgekreuzt worden waren (Abb. 24C). Zur Kontrolle wurde das Konstrukt *UAS-17.30* exprimiert (siehe Abschnitt 3.1.3.); wie erwartet, wird die Neurodegeneration vollständig gerettet (Abb. 24D). Expression eines Konstruktes, durch welches die p110 Untereinheit der PI3K codiert wird (*UAS-Dp110*), führt zu einer Verbesserung des Phänotyps (Abb. 24E). Expression einer RNAi-Linie für *Dp110* führt jedoch ebenso zur Suppression des Phänotyps (Abb. 24F).

Dieselben Tendenzen konnten in analogen Versuchen mit dem *vap*¹ Allel großteils bestätigt werden (Abb. 25A-F). Dabei war jedoch festzustellen, dass die Degeneration in 20 Tage alten *vap*¹ Fliegen insgesamt schwächer war als in *vap*² Fliegen, was nicht zu erwarten gewesen war, da *vap*¹ eigentlich das stärkere Allel sein sollte. Es ist auch zu bemerken, dass durch Expression des *UAS-17.30* Konstruktes im *vap*¹ Hintergrund der Phänotyp nicht so vollständig revertiert werden kann wie in *vap*². Auch der Einfluss der übrigen Konstrukte ist nicht so deutlich wie in *vap*².

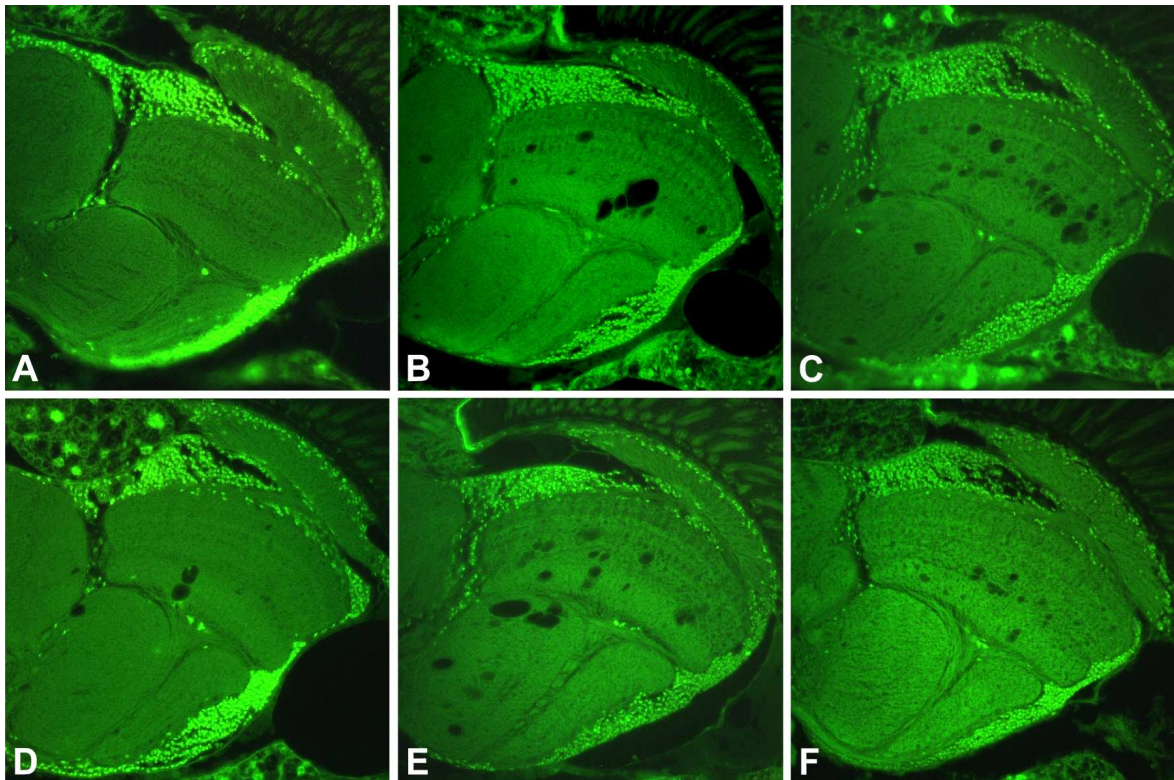


Abb. 25: Genetische Interaktion von *vap*¹ mit *PI3K*.

Kontrollfliegen zeigen im Alter von 20 Tagen keine Neurodegeneration (A). In *vap*¹ Fliegen hingegen ist Vakuolisierung zu beobachten (B); allerdings ist diese unerwarteterweise weniger stark als in *vap*² Fliegen (Näheres siehe Text). Fliegen der Treiberlinie im *vap*¹ Hintergrund, rückgekreuzt mit *w*¹¹¹⁸, zeigen einen etwas stärkeren Neurodegenerationsphänotyp (C). Dieser kann durch Überexpression des *UAS-17.30* Konstruktes verbessert werden (D), jedoch nicht auf das wildtypische Niveau wie im *vap*² Hintergrund (siehe Text). Eine Erhöhung der Gendosis der p110 Untereinheit der PI3 Kinase aus *Drosophila melanogaster* führt zu einer geringfügigen Verbesserung des Phänotyps (E), ebenso wie eine mutmaßliche Verringerung der Gendosis durch Expression eines RNAi Kontruktes (F).

Genotypen: (A) *CantonS*, (B) *vap*¹/*Y*, (C) *vap*¹/*Y*; *+/appl-GAL4*, (D) *vap*¹/*Y*; *UAS-17.30/appl-GAL4*, (E) *vap*¹/*Y*; *UAS-Dp110/+*; *+/appl-GAL4*, (F) *vap*¹/*Y*; *UAS-Dp110-RNAi/appl-GAL4*.

*vap*² ist der sensitivere Hintergrund für die Versuche; dennoch stützen die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem *vap*¹ Allel zumeist die im anderen Hintergrund beobachteten Tendenzen. Dies wird auch deutlich, wenn man die Quantifizierung der Ergebnisse aus den beiden Versuchen betrachtet (Abb. 26).

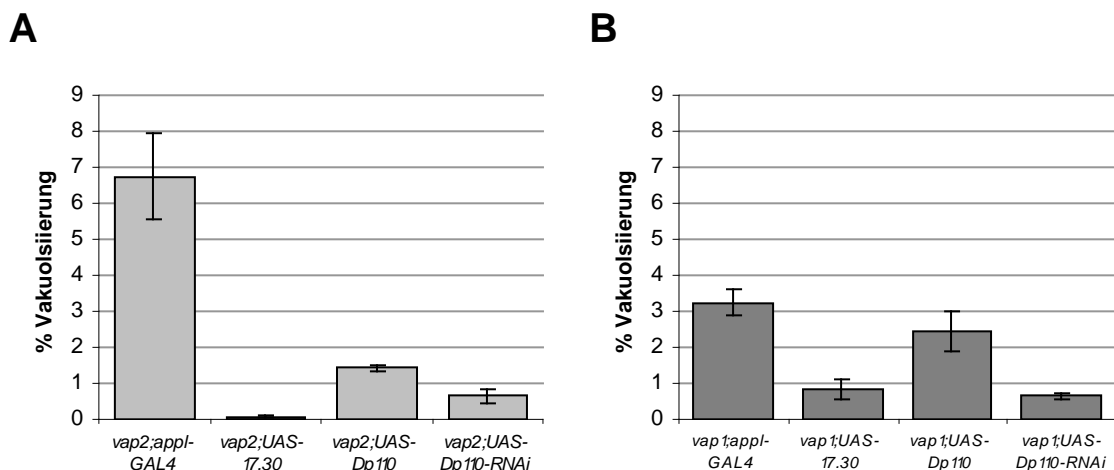


Abb. 26: Anteil vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Überexpression der katalytischen Untereinheit der PI3K im *vav* Hintergrund.

(A) Bei den als Kontrolle quantifizierten männlichen Nachkommen aus der Rückkreuzung des Treiberstammes im *vav*² mutanten Hintergrund mit *w*¹¹¹⁸ sind im Alter von 20 Tagen circa 7% Neurodegeneration in den optischen Loben festzustellen. Neuronale Expression von *UAS-17.30* führt wie erwartet zur Suppression des Neurodegenerations-Phänotyps. Expression von *UAS-Dp110* vermindert die Neurodegeneration auf in etwa 1,5%, Überexpression eines RNAi Konstruktes für *Dp110* führt jedoch ebenfalls zu einer deutlichen Suppression. (B) Im *vav*¹ Hintergrund ist das Niveau der Vakuolisierung insgesamt geringer und die Effekte weniger deutlich, es sind jedoch im Grunde dieselben Tendenzen zu beobachten.

Genotypen: ***vav2; appl-GAL4***: *vav*²/*Y*; +/*appl-GAL4*, ***vav2; UAS-17.30***: *vav*²/*Y*; *UAS-17.30/appl-GAL4*, ***vav2; UAS-Dp110***: *vav*²/*Y*; *UAS-Dp110/+*; +/*appl-GAL4*, ***vav2; UAS-Dp110-RNAi***: *vav*²/*Y*; *UAS-Dp110-RNAi/appl-GAL4*. Analog für *vav*¹.

Es wurde jeweils der Anteil degenerierten Gewebes in Lobula und Medulla in jeweils mindestens fünf Köpfen in drei aufeinanderfolgenden Ebenen in beiden Hemisphären quantifiziert. Um die relativen Werte aus den Versuchen im *vav*¹ und *vav*² Hintergrund besser vergleichen zu können, wurde in der folgenden Darstellung jeweils die Vakuolisierung im rückgekreuzten Treiberstamm gleich eins gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen (Abb. 27).

Vergleich der Neurodegeneration im *vav1* und *vav2* Hintergrund

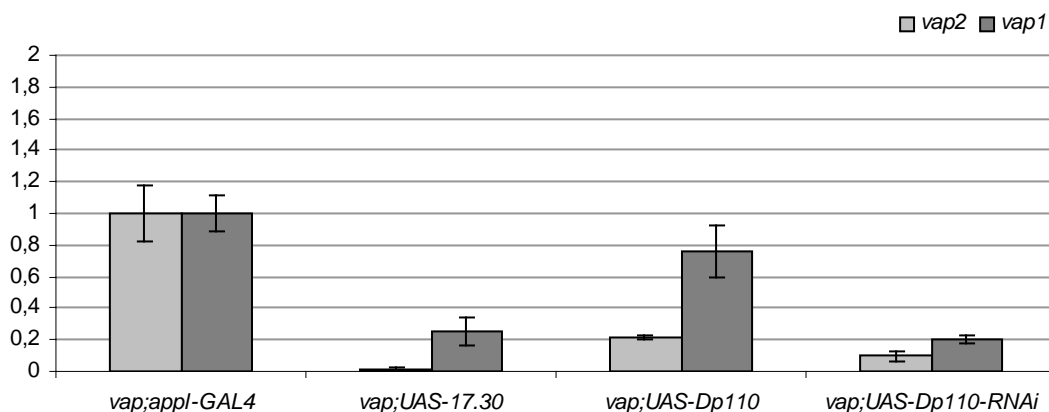


Abb. 27: Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis von *Dp110* im *vav*² und *vav*¹ Hintergrund.

Im Vergleich zum *vav*² Hintergrund ist der Effekt der neuronalen Überexpression des als Positiv-Kontrolle verwendeten Konstruktes *UAS-17.30* in *vav*¹ nicht so deutlich, aber dennoch vorhanden. Expression von *UAS-Dp110* besitzt ebenfalls in *vav*² eine deutlich stärker supprimierende Wirkung als in *vav*¹; hier besitzt das Konstrukt kaum einen Einfluss. Der erwartete verschlechternde Effekt der Überexpression von *UAS-Dp110-RNAi* bleibt in beiden Hintergründen aus; vielmehr wird sogar eine Suppression des Phänotyps erreicht.

Genotypen: ***vav; appl-GAL4***: *vav*/*Y*; +/*appl-GAL4*, ***vav; UAS-17.30***: *vav*/*Y*; *UAS-17.30/appl-GAL4*, ***vav; UAS-Dp110***: *vav*/*Y*; *UAS-Dp110/+*; +/*appl-GAL4*, ***vav; UAS-Dp110-RNAi***: *vav*/*Y*; *UAS-Dp110-RNAi/appl-GAL4*. *vav* steht in diesem Fall jeweils für das durch die Farbe der Säule (siehe Legende) gekennzeichnete Allel.

Es ist zu sehen, dass Expression des *UAS-Dp110* Konstruktes im *vap²* Hintergrund zu einer Verbesserung des Neurodegenerations-Phänotyps im Vergleich zur Kontrolle *vap²/Y; appl-GAL4/+* führt. In *vap¹* wird der Phänotyp kaum beeinflusst, die Tendenz ist jedoch in beiden Allelen dieselbe. Im *vap¹* Allel ist beispielsweise auch der Effekt von *UAS-17.30* nicht so deutlich und das Degenerations-Niveau generell recht gering, so dass hier die Effekte weniger deutlich ausfallen und deshalb insgesamt schwieriger zu beurteilen sind.

Unerwarteterweise verursacht Expression eines *UAS-Dp110-RNAi* Konstruktes, durch das eigentlich der gegenteilige Effekt, nämlich eine Verstärkung des Phänotyps, erzielt werden sollte, in beiden Allelen eine sogar noch deutlichere Suppression als das Überexpressions-Konstrukt.

Als nächstes wurde der Einfluss der Manipulation der Gendosis von *Akt* auf den Neurodegeneration-Phänotyp von *vap* Fliegen untersucht.

3.5.3. Genetische Interaktion von *RasGAP* mit *Akt*

Expression einer durch Myristoylierung konstitutiv aktiven Form von Akt (*UAS-Dakt^{myr}*) führt, wie erwartet, zur Abschwächung des Neurodegenerations-Phänotyps (Abb. 28A). Anders als Überexpression von *Dakt^{myr}* führt jedoch Überexpression der cDNA für *Dakt1* zu einer Verschlechterung des Phänotyps (Abb. 28B). Überexpression eines *UAS-RNAi* Konstruktes für *Dakt1* verursacht nicht, wie erwartet, eine Verschlechterung des Phänotyps, sondern wie das konstitutiv aktive Konstrukt eine Verbesserung (Abb. 28C).

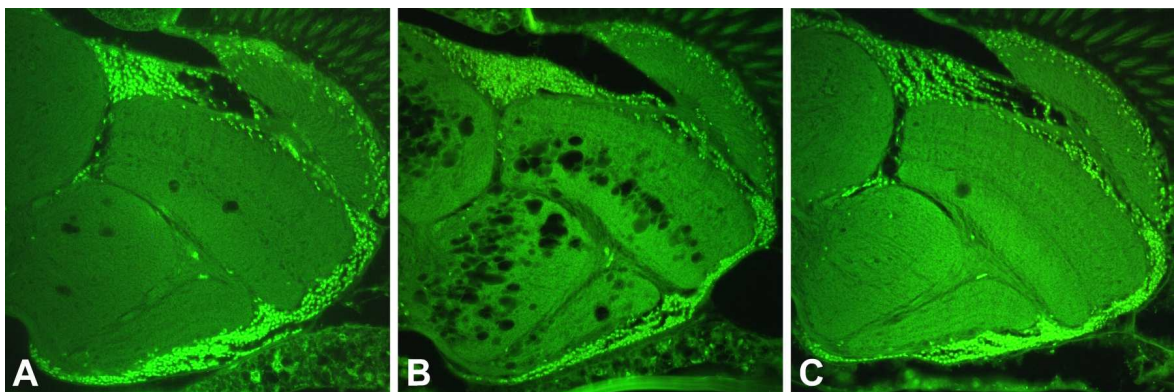


Abb. 28: Genetische Interaktion von *vap²* mit *Akt*.

Wird eine myristoylierte Form der Akt exprimiert, welche für eine konstitutive Membranlokalisierung und damit Aktivierung der Akt sorgt, kann die Vakuolisierung in 20 Tage alten Männchen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 24C) stark herabgesetzt werden (A). Überexpression der Akt cDNA führt jedoch zu einer starken Verschlechterung des Phänotyps (B). Durch Expression eines Akt RNAi Konstruktes hingegen wird der Phänotyp wiederum supprimiert (C).

Genotypen: (A) *vap²/Y; UAS-Dakt^{myr}/appl-GAL4*, (B) *vap²/Y; UAS-Dakt1/+; +/appl-GAL4*, (C) *vap²/Y; UAS-Dakt1-RNAi/appl-GAL4*.

Hier konnten wiederum die im *vap*² Hintergrund gefundenen Tendenzen auch im *vap*¹ Hintergrund bestätigt werden (Bilder nicht gezeigt). Die Degeneration wurde auch für diese Konstrukte in beiden Hintergründen in mindestens fünf Köpfen quantifiziert; die Werte wurden wiederum auf die Degeneration in der Kontrolle, *vap/Y; +/appl-GAL4*, bezogen (Abb. 29).

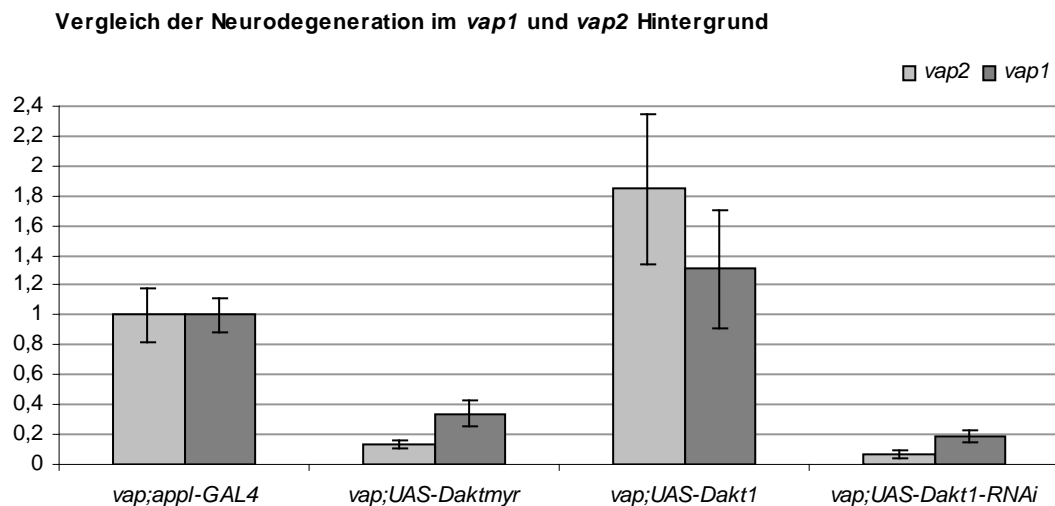


Abb. 29: Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis beziehungsweise Aktivierung von Akt im *vap*² und *vap*¹ Hintergrund.

Im Vergleich zum *vap*² Hintergrund ist der Effekt der Überexpression der aktivierten Form der Akt, *UAS-Dakt^{myr}*, in *vap*¹ wiederum nicht so deutlich, aber dennoch vorhanden. Unerwarteterweise verursacht Überexpression der Akt cDNA in beiden Hintergründen eine stärkere Vakuolisierung. Ebenso bleibt der erwartete verschlechternde Effekt der Überexpression von *UAS-Dakt1-RNAi* in beiden Hintergründen aus; es wird sogar eine Suppression des Phänotyps erreicht.

Genotypen: ***vap;appl-GAL4***: *vap/Y; +/appl-GAL4*, ***vap;UAS-Daktmyr***: *vap*²/*Y*; *UAS-Dakt^{myr}/appl-GAL4*, ***vap;UAS-Dakt1***: *vap*²/*Y*; *UAS-Dakt1/+; +/appl-GAL4*, ***vap;UAS-Dakt1-RNAi***: *vap*²/*Y*; *UAS-Dakt1-RNAi/appl-GAL4*. *vap* steht in diesem Fall jeweils für das durch die Farbe der Säule (siehe Legende) gekennzeichnete Allel.

Wiederum ist der Effekt im *vap*¹ Hintergrund im Vergleich zu *vap*² abgeschwächt. In beiden Fällen führt jedoch Überexpression einer konstitutiv membranlokalisierten und damit aktivierten Form der Akt zu einer deutlichen Suppression des Neurodegenerations-Phänotyps; jedoch wird ein sogar noch stärkerer Effekt durch Expression eines RNAi Konstruktes für Akt erzielt. Ebenso überraschend ist ein negativer Effekt der Überexpression der Akt cDNA, welcher in *vap*² wesentlich deutlicher ausfällt als in *vap*¹; wie an den großen Fehlerbalken zu erkennen, weist der Phänotyp hier auch eine besonders starke Variabilität auf.

Stromabwärts von Akt im Signaltransduktionsweg, der zur Inhibierung der Autophagie führt, liegt das als nächstes untersuchte TOR.

3.5.4. Genetische Interaktion von *RasGAP* mit *TOR*

Expression von *UAS-TOR* führt, wie erwartet, zur Abschwächung des Neurodegenerations-Phänotyps in *vap²* Fliegen (Abb. 30B). Überexpression eines angeblich dominant negativen Konstruktes für *TOR* (*UAS-TOR^{TED}*) verursacht jedoch nicht, wie erwartet, eine Verschlechterung des Phänotyps, sondern wie das cDNA Konstrukt eine Verbesserung (Abb. 30C). Dieselben Tendenzen werden im *vap¹* Hintergrund beobachtet (Bilder nicht gezeigt).

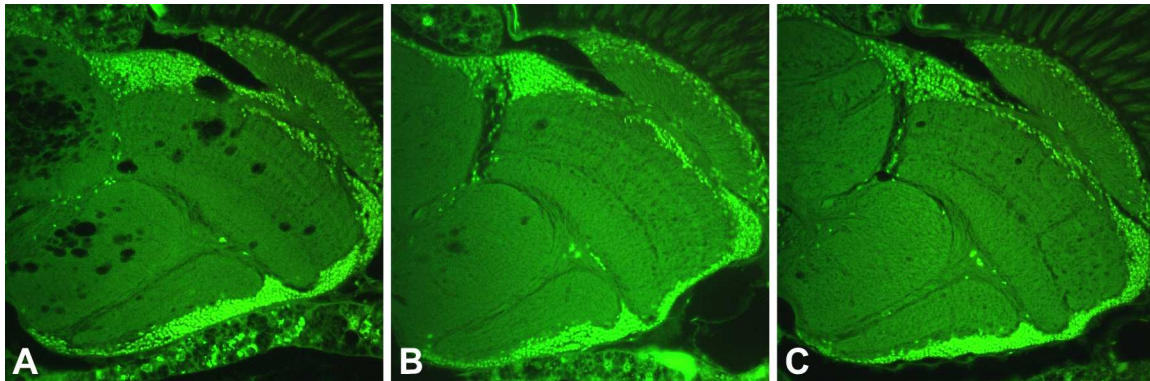


Abb. 30: Genetische Interaktion von *vap²* mit *TOR*.

Wird in *vap²* Fliegen in Neuronen ein Konstrukt exprimiert, mit dem die wildtypische cDNA für das *TOR* Gen überexprimiert wird, kann in Paraffinschnitten der Gehirne von 20 Tage alten Fliegen eine Suppression des Phänotyps im Vergleich zur Kontrolle (A) beobachtet werden (B). Allerdings führt auch Expression einer angeblich dominant negativen Form von *TOR* zur Abschwächung (C).

Genotypen: (A) *vap¹/Y; +/appl-GAL4*, (B) *vap²/Y; UAS-TOR/appl-GAL4*, (C) *vap²/Y; UAS-TOR^{TED}/+; +/appl-GAL4*.

Wiederum kann der Einfluss auf die Neurodegeneration in den beiden Allelen verglichen werden (Abb. 31):

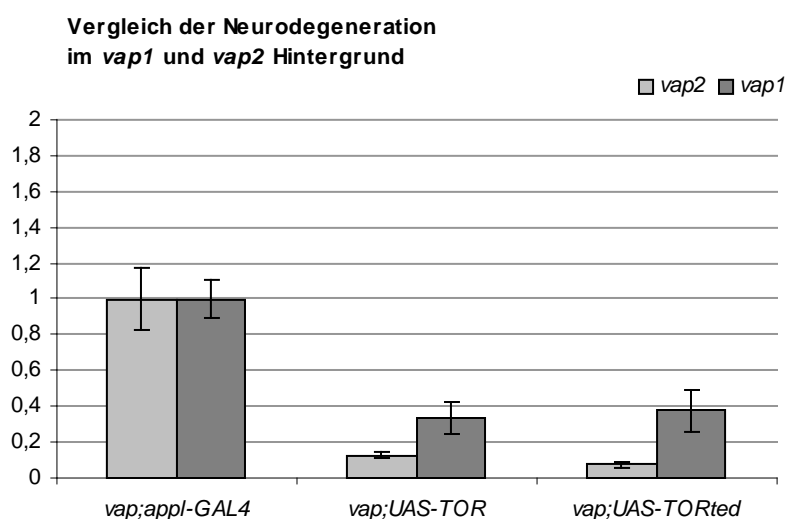


Abb. 31: Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis von *TOR* im *vap²* und *vap¹* Hintergrund.

Im Vergleich zum *vap²* Hintergrund ist die Suppression des Phänotyps durch Überexpression von *TOR* in *vap¹* nicht so deutlich, aber dennoch vorhanden. Unerwarteterweise verursacht Überexpression einer dominant negativen Form von *TOR* den selben Effekt.

Genotypen: ***vap;appl-GAL4***: *vap/Y; +/appl-GAL4*, ***vap;UAS-TOR***: *vap²/Y; UAS-TOR/appl-GAL4*, ***vap;UAS-TORTed***: *vap²/Y; UAS-TOR^{TED}/+; +/appl-GAL4*. *vap* steht in diesem Fall jeweils für das durch die Farbe der Säule (siehe Legende) gekennzeichnete Allel.

Abermals ist der Effekt in *vap*¹ schwächer. Insgesamt ist auch hier zu erkennen, dass wie in den vorhergehenden Versuchen die Ergebnisse nicht eindeutig sind: Überexpression der Elemente des Signalweges, die die Autophagie hemmen und damit den *vap* Neurodegenerations-Phänotyp verbessern sollten, führen zwar tatsächlich zur Suppression (Ausnahme ist die Überexpression der *Akt* cDNA, die eine Verschlechterung verursacht). Jedoch erzielt Expression von Konstrukten, die die Elemente inhibieren sollten, denselben oder einen sogar noch stärker positiven Effekt. Darüber wird später zu diskutieren sein. Zuletzt wurde jedoch auch noch der Einfluss einer veränderten Gendosis der S6K analysiert, eines Elementes, welches selbst vom geschilderten Signalweg reguliert wird und zudem den zur Inhibierung der Autophagie führenden Signalweg in einer *feedback loop* hemmt.

3.5.5. Genetische Interaktion von *RasGAP* mit *S6K*

Neuronale Überexpression einer konstitutiv aktiven Form der S6K (*UAS-S6K.STDETE*) führt zur Abschwächung des Neurodegenerations-Phänotyps in *vap*² Fliegen (Abb. 32B). Bei Expression einer dominant negativen Form der S6K (*UAS-S6K.KQ*) hingegen bleibt der Phänotyp im *vap*² Hintergrund unverändert (Abb. 32C). Im *vap*¹ Hintergrund führt Expression der konstitutiv aktiven Form wiederum zur Suppression, Expression der dominant negativen Form verursacht eine Verschlechterung des Phänotyps (Bilder nicht gezeigt).

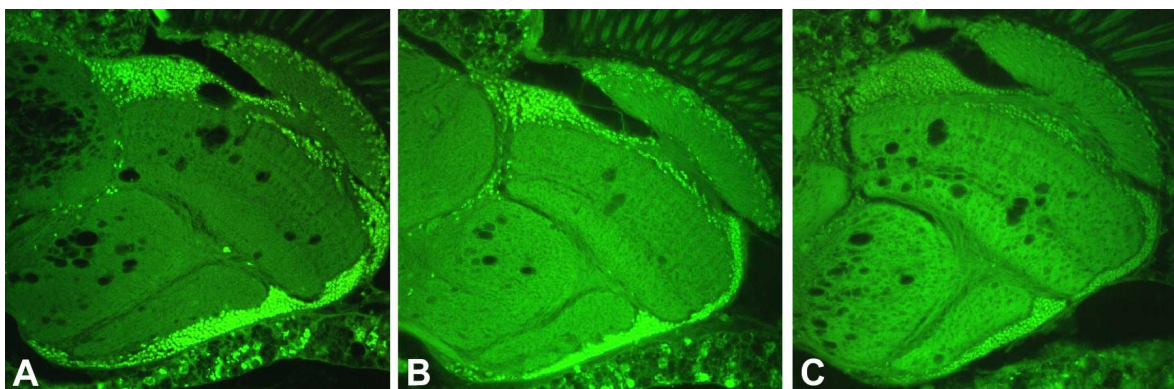


Abb. 32: Genetische Interaktion von *vap*² mit *S6K*.

Paraffinschnitte der Gehirne von 20 Tage alten *vap*² Fliegen, in denen in Neuronen eine konstitutiv aktive Form der S6K exprimiert wird (B), zeigen eine Suppression des Phänotyps im Vergleich zur Kontrolle (A). Expression einer dominant negativen Form führt in *vap*² zu keiner Veränderung der Neurodegeneration (C).

Genotypen: (A) *vap*²/Y; +/*appl*-GAL4, (B) *vap*²/Y; *UAS-S6K.STDETE*/+; +/*appl*-GAL4, (C) *vap*²/Y; *UAS-S6K.KQ*/+; +/*appl*-GAL4.

Dies ist auch in den Ergebnissen aus der Quantifizierung zu sehen (Abb. 33).

Vergleich der Neurodegeneration im *vap1* und *vap2* Hintergrund

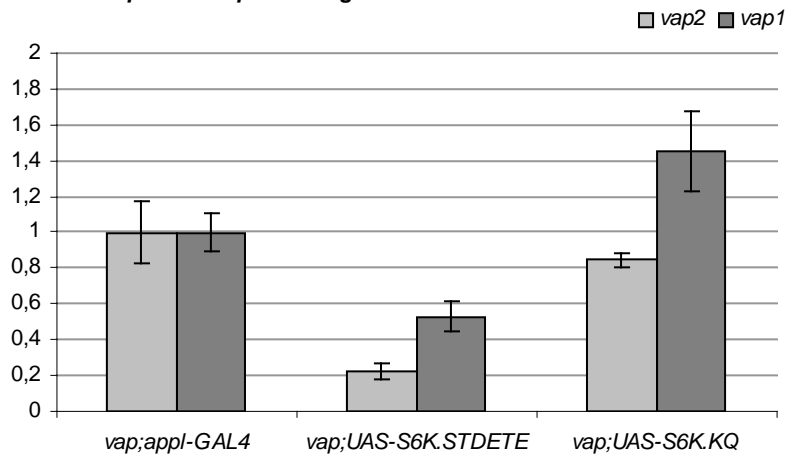


Abb. 33: Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis von *S6K* im *vap2* und *vap1* Hintergrund.

Überexpression der konstitutiv aktiven Form von *S6K* zeigt in beiden Allelen einen supprimierenden Effekt. Expression einer dominant negativen Form verändert in *vap2* den Neurodegenerations-Phänotyp nicht, in *vap1* kommt es zu einer Verschlechterung.

Genotypen: ***vap;appl-GAL4***: *vap/Y*; *+/appl-GAL4*, ***vap;UAS-S6K.STDETE***: *vap/Y*; *UAS-S6K.STDETE/+*; *+/appl-GAL4*, ***vap;UAS-S6K.KQ***: *vap/Y*; *UAS-S6K.KQ/+*; *+/appl-GAL4*. *vap* steht in diesem Fall jeweils für das durch die Farbe der Säule (siehe Legende) gekennzeichnete Allel.

Für die *S6K* sind die Ergebnisse der Untersuchung einer genetischen Interaktion von *vap* mit der konstitutiv aktiven und der dominant negativen Form nicht widersprüchlich; die Ergebnisse sind jedoch insgesamt schwierig zu interpretieren und sollen in der abschließenden Diskussion ausführlich besprochen werden. Es kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob durch Beeinflussung dieses für die Regulation der Autophagie entscheidenden Signalweges Einfluss genommen werden kann auf den *vap* Neurodegenerations-Phänotyp. Jedoch konnten die Ergebnisse der im letzten Abschnitt dieses Teils der Arbeit beschriebenen Versuche Hinweise liefern, dass tatsächlich in den *vap* Fliegen eine Deregulation der Autophagie vorliegen könnte.

3.6. RasGAP und Autophagie: Genetische Interaktion von *vap*¹ mit *car*¹

3.6.1. Entfernung der *car*¹ Mutation aus dem *vap*¹ Hintergrund durch Rekombinationskreuzung

Aufgrund der im Abschnitt 1.3.2.5. beschriebenen Hinweise lässt sich vermuten, dass es in *vap* Fliegen zu einer erhöhten Aktivierung der Autophagie kommt. Wie in ultrastrukturellen Untersuchungen festgestellt worden war, häufen sich in den Neuronen von *vap* Fliegen autophagische Vakuolen an. Dieser Effekt ist in *vap*¹ Fliegen besonders stark zu sehen. Allerdings tragen diese Fliegen neben der *vap*¹ Mutation auch den Augenfarbenmarker *car*¹, also eine Mutation im *carnation* Gen. Carnation ist vermutlich am Prozess der Vesikelverschmelzung im Rahmen der Autophagie beteiligt (siehe Abschnitt 1.3.2.1.). Es besteht die Möglichkeit, dass es in *vap*¹ durch eine von der *car*¹ Mutation verursachte Behinderung der Vesikelverschmelzung zu der ultrastrukturell sichtbaren erhöhten Anhäufung der aufgrund der *vap* Mutation vermehrt gebildeten Vesikel kommt und dies auch den früheren Tod der Fliegen im Vergleich zu *vap*² verursacht. Wenn tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der *vap* Mutation und einer Deregulation autophagischer Prozesse besteht, sollte eine Entfernung der *car*¹ Mutation aus dem *vap*¹ Hintergrund zu einer Verminderung der Anzahl der angehäuften Vakuolen und dadurch vermutlich auch zu einer Verbesserung des Neurodegenerations-Phänotyps und der Verkürzung der Lebensspanne führen.

Um einen *vap*¹ Stamm zu etablieren, der keine *car*¹ Mutation trägt, wurden Rekombinationskreuzungen durchgeführt. Zunächst wurden Jungfrauen des *vap*¹ Stammes (Genotyp $w^+vap^1f^1car^1/w^+vap^1f^1car^1$) mit Männchen des Stammes *CantonS* (CS/Y) gekreuzt. In den Keimzellen der weiblichen Nachkommen dieser Kreuzung kann es unter anderem zu folgendem Rekombinationsereignis kommen (Abb. 34):

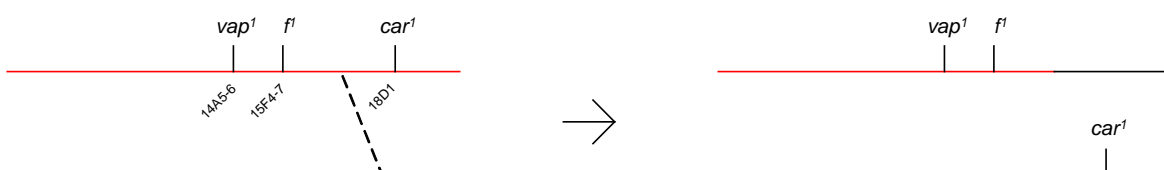


Abb. 34: Schematische Darstellung des gewünschten Rekombinationsereignisses zur Herstellung eines *vap*¹ Stammes ohne *car*¹.

Die weiblichen Nachkommen einer Kreuzung von *vap*¹ Jungfrauen mit CS Männchen tragen das links abgebildete erste Chromosomenpaar: in rot ist das von der Mutter ererbte Chromosom mit der *vap*¹ Mutation in der zytologischen Position 14A5-14A6 dargestellt. Dieses Chromosom trägt daneben die äußerlich sichtbaren Marker *f*¹ (*forked*; Borstenphänotyp) und *car*¹ (*carnation*; dunklere Augenfarbe) in den angegebenen zytologischen Positionen. In den Keimzellen kommt es zur Rekombination zwischen den beiden Chromosomen. Nach Rückkreuzung mit CS Männchen werden diejenigen männlichen Nachkommen selektiert, die den durch *f*¹ verursachten Borstenphänotyp zeigen und aber den Marker *car*¹, der zu einer weiteren Verdunkelung der roten Augenfarbe führen würde, nicht tragen. Durch weitere Kreuzung dieser Männchen kann ein stabiler Stamm *vap*¹ ohne *car*¹ etabliert werden (siehe Text).

Natürlich kann die Rekombination auch an anderen Stellen des Chromosoms stattfinden; hier ist lediglich das gewünschte Rekombinationsereignis dargestellt, welches später anhand der Markerkombination identifiziert werden kann. Dazu wurden die aus der Kreuzung entstandenen Weibchen in großer Menge wiederum mit Männchen des CS Stammes gekreuzt; einzelne Männchen mit der gewünschten Markerkombination f^1car^+ (nicht car^1) wurden zur Stabilisierung des rekombinierten Chromosoms mit Weibchen des Balancerstammes $FM6/arm$ gekreuzt und die weiblichen Nachkommen mit Genotyp $vap^1f^1car^+/FM6$ mit $FM6/Y$ Männchen gekreuzt. Durch Kreuzung von $vap^1f^1car^+/FM6$ Weibchen mit $vap^1f^1car^+/Y$ Männchen kann schließlich ein stabiler Stamm etabliert werden; $vap^1f^1car^+$ Weibchen sind homozygot lebensfähig und fertil, so dass ein neuer Stamm $vap^1f^1car^+$ (ohne Balancerchromosom $FM6$) entstanden ist. Dieser wird im Weiteren vap^1 ohne car^1 genannt. Zur besseren Unterscheidung wird der bisher einfach vap^1 genannte Stamm in diesem Teil der Arbeit mit vap^1car^1 bezeichnet. Mit diesen Stämmen wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

3.6.2. Einfluss der car^1 Mutation auf die Lebensspanne von vap^1

Zunächst wurde die Lebenserwartung von vap^1 Fliegen mit und ohne car^1 verglichen. Von dem durch Rekombinationskreuzung entstandenen Stamm vap^1 ohne car^1 sowie dem ursprünglichen vap^1car^1 Stamm und weiteren Kontrollen wurden jeweils 100 Männchen abgesammelt und gealtert. Dabei ergaben sich folgende Lebensspannen (Abb. 35):

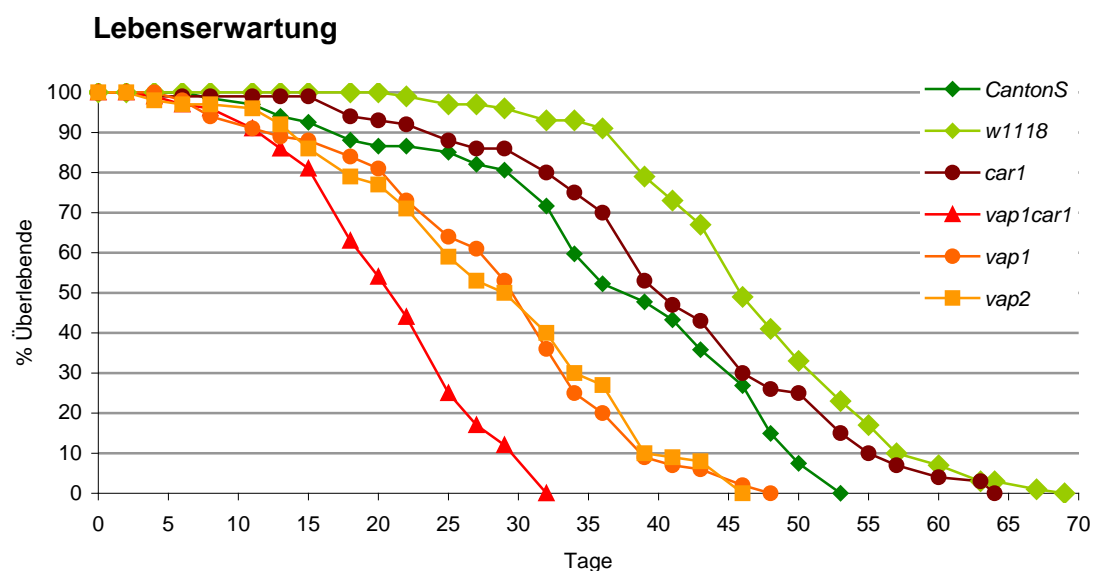


Abb. 35: Lebenserwartung verschiedener Fliegenstämme.

Als Kontrolle wurden der Wildtyp-Stamm *CantonS* und der „Mutterstamm“ der übrigen Linien, w^{1118} , verwendet. w^{1118} besitzt generell aus bisher unbekanntem Gründen eine etwas höhere Lebenserwartung als *CantonS*. Die Lebensspanne von car^1 Fliegen liegt zwischen der dieser beiden Kontrollstämme; die Mutation führt folglich nicht zu einer Verkürzung der Lebenserwartung. Im vap^1 Hintergrund führt die car^1 Mutation jedoch zu einer weiteren Erniedrigung der in vap Mutanten gegenüber den Wildtypen erniedrigten Lebenserwartung.

Genotypen: **CantonS**: CS/Y , **w1118**: w^{1118}/Y , **car1**: car^1/Y ; **vap1car1**: $vap^1f^1car^1/Y$, **vap1**: vap^1f^1/Y , **vap2**: vap^2/Y .

Der Wildtyp-Stamm *CantonS* besitzt stets, aus bisher unbekanntem Gründen, eine etwas niedrigere Lebenserwartung als *w¹¹¹⁸*, der „Mutterstamm“ der anderen in diesem Versuch eingesetzten Stämme. Die Lebensspanne von *car¹* Fliegen liegt zwischen der dieser beiden Kontrollen; durch die Mutation in diesem Gen allein kommt es also nicht zu einer Erniedrigung der Lebenserwartung. *vap²* Fliegen zeigen dagegen eine verkürzte Lebensspanne. Im bisher verwendeten *vap¹car¹* Stamm ist die Lebenserwartung noch weiter herabgesetzt. Entfernung der *car¹* Mutation aus dem *vap¹* Hintergrund führt zu einer Anhebung der Lebensspanne auf dasselbe Niveau wie im anderen Allel. Zusätzliches Vorhandensein der *car¹* Mutation besitzt also, obwohl sie allein keine Auswirkung auf die Lebenserwartung hat, einen negativen Effekt auf die Lebensspanne von *vap* Fliegen. Dies ist ein Hinweis auf ein Zusammenwirken der beiden Mutationen.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die *car¹* Mutation auch eine Auswirkung auf den Neurodegenerations-Phänotyp von *vap¹* Fliegen besitzt.

3.6.3. Einfluss der *car¹* Mutation auf den Neurodegenerations-Phänotyp von *vap¹*

Männchen des Stammes *vap¹car¹* sowie von *vap¹* ohne *car¹* wurden abgesammelt, 20 Tage gealtert und horizontale Paraffinschnitte der Gehirne angefertigt (Abb. 36C und 36D). Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm *CantonS* verwendet (Abb. 36A). Zusätzlich wurden auch Männchen des *car¹* Stammes untersucht (Abb. 36B).

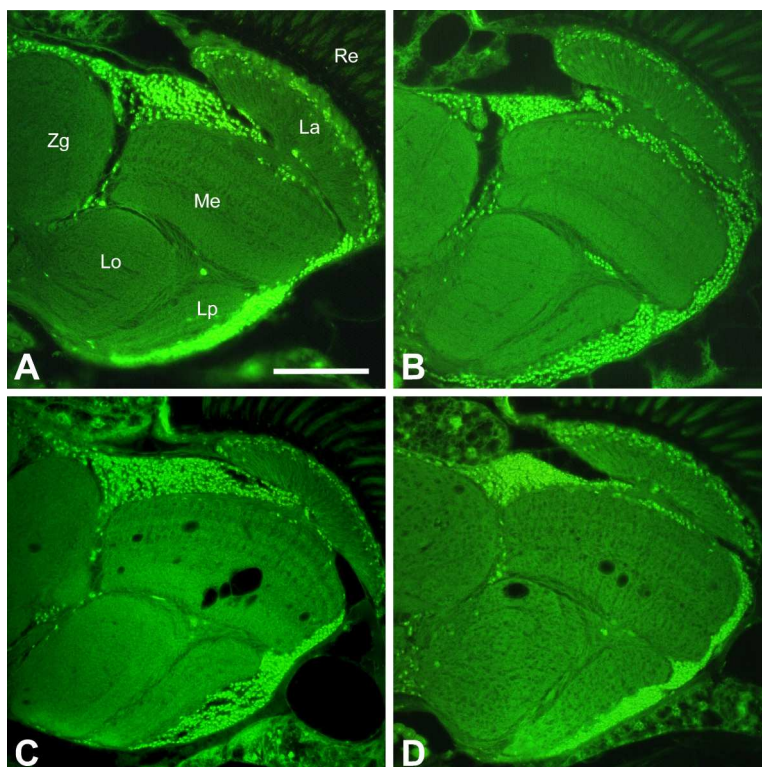


Abb. 36: Genetische Interaktion von *vap¹* mit *car¹* (Paraffinschnitte).

Wildtypische Fliegen (A) sowie Fliegen des Stammes *car¹* (B) zeigen im Alter von 20 Tagen keine Neurodegeneration. Die in *vap¹car¹* Fliegen (C) auftretende Vakuolisierung kann durch Entfernung der *car¹* Mutation aus dem genetischen Hintergrund vermindert werden (D).

Genotypen: (A) *CS/Y*, (B) *car¹/Y*, (C) *vap¹f¹car¹/Y*, (D) *vap¹f¹/Y*. Maßstab: 50µm.

Männchen des *car*¹ Stammes zeigen im Alter von 20 Tagen ebenso wie die Wildtyp-Kontrolle keine Vakuolisierung des Gehirngewebes, *vap*¹*car*¹ Fliegen hingegen schon. Durch die Entfernung der *car*¹ Mutation aus dem genetischen Hintergrund des Stammes wird die Neurodegeneration vermindert. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Quantifizierung des Anteils an vakuolisiertem Gehirngewebe in Lobula und Medulla von jeweils mindestens sieben Köpfen (Abb. 37):

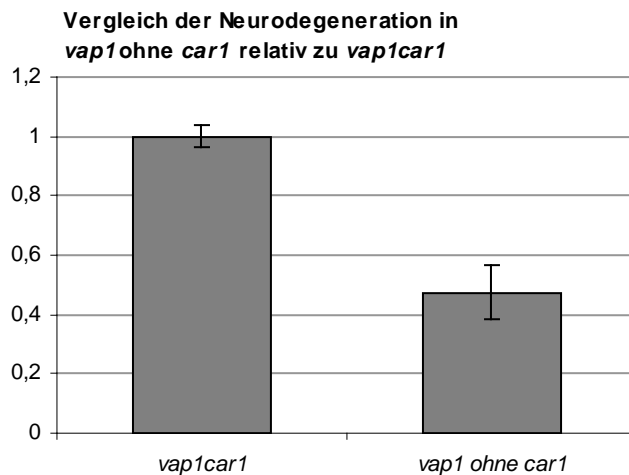


Abb. 37: Einfluss von *car*¹ auf die Neurodegeneration in *vap*¹.

Die in *vap*¹*car*¹ Fliegen auftretende Vakuolisierung kann durch Entfernung der *car*¹ Mutation aus dem genetischen Hintergrund vermindert werden.

Genotypen: ***vap*¹*car*¹**: *vap*¹*f*¹*car*¹/Y,
***vap*¹ ohne *car*¹**: *vap*¹*f*¹/Y.

Die *car*¹ Mutation besitzt also einen Einfluss auf die durch die *vap* Mutation hervorgerufene Neurodegeneration. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass der Neurodegenerations-Phänotyp von *vap* Fliegen mit einem gestörten Autophagie-Prozess zusammenhängt.

Abschließend sollte auch auf ultrastruktureller Ebene der Effekt der *car*¹ Mutation im *vap*¹ Hintergrund untersucht werden.

3.6.4. Einfluss der *car*¹ Mutation auf die Anhäufung autophagischer Vakuolen in *vap*¹

Um zu untersuchen, ob *car*¹ die Anhäufung autophagischer Vakuolen in *vap*¹ Fliegen beeinflusst, wurden Semidünn- und Ultradünnschnitte der entsprechenden Fliegenstämme angefertigt. Dazu wurden Männchen der Stämme *car*¹, *vap*¹*car*¹ und *vap*¹ ohne *car*¹ für 14 Tage gealtert, dann wurden ihre Gehirne präpariert, in Glutaraldehyd fixiert und in Epon eingebettet. Anschließend wurden Semidünn- und Ultradünnschnitte angefertigt (freundlicherweise durchgeführt von Frau Ursula Roth).

In mit Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitten sind bei Fliegen, welche zusätzlich zur *vap*¹ Mutation die *car*¹ Mutation tragen (Abb. 38B) in einigen Zellen Anhäufungen dunkler Punkte (Pfeil) zu erkennen, während in *car*¹ (Abb. 38A) und *vap*¹ ohne *car*¹ (Abb. 38C) in jeder Zelle lediglich ein dunkel gefärbter Punkt, nämlich der aufgrund seines sauren pH Wertes mit Toluidinblau angefärbte Zellkern, zu sehen ist.

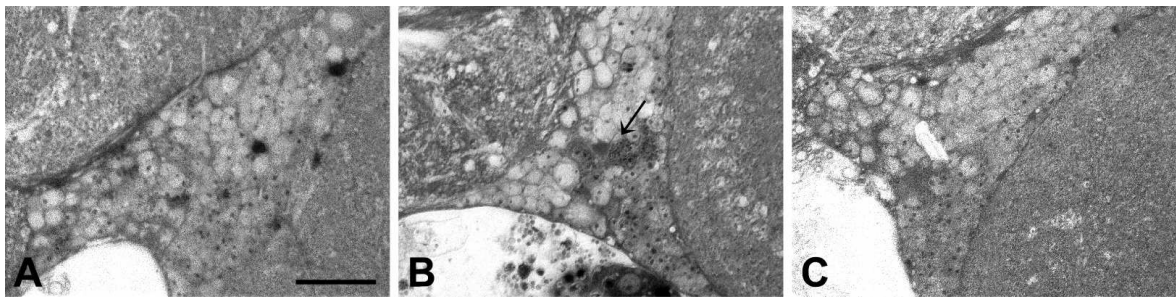


Abb. 38: Genetische Interaktion von *vap*¹ mit *car*¹ (Semidünnschnitte).

Fliegen des Stammes *car*¹ (A) zeigen im Alter von 14 Tagen in jeder Zelle einen mit Toluidinblau dunkel angefärbten Punkt, nämlich den Zellkern. In *vap*¹*car*¹ (B) sind dagegen in vereinzelt Zellen (Beispiel siehe Pfeil) Ansammlungen solcher dunkel gefärbter Punkte zu erkennen. Vermutlich handelt es sich dabei um autophagische Vakuolen mit einem sauren pH; ihre Anhäufung deutet auf vermehrte autophagische Aktivität beziehungsweise gestörten Abbau der autophagischen Vakuolen hin. In *vap*¹ ohne *car*¹ (C) sind wiederum lediglich dunkel gefärbte Zellkerne zu sehen. Der Ausschnitt zeigt jeweils den Cortex-Bereich zwischen Medulla-Neuropil und Zentralgehirn.

Genotypen: (A) *car*¹/*Y*, (B) *vap*¹*f**car*¹/*Y*, (C) *vap*¹*f*/*Y*. Maßstab: 10µm.

Die Ansammlungen in *vap*¹ mit *car*¹ stellen vermutlich aufgrund von Problemen mit der Autophagie angehäufte Vakuolen dar, die wie Zellkerne einen sauren pH besitzen und deshalb mit Toluidinblau angefärbt werden können. Vermehrtes Auftreten solcher Vakuolen bei Fliegen, die beide Mutationen, *vap*¹ und *car*¹, besitzen, im Vergleich zu Fliegen, die nur jeweils eine Mutation aufweisen, deutet auf eine Beteiligung der beiden codierten Proteine am selben Prozess, nämlich der Autophagie, hin. Dieser Effekt ist jedoch nur schwer zu quantifizieren, da dazu jeweils der exakt gleiche Bereich in der gleichen Ebene des Gehirns untersucht werden müsste, was, anders als bei Paraffinschnitten, in einer statistisch relevanten Anzahl für Semidünnschnitte nicht realisierbar ist.

Bei Betrachtung der entsprechenden kontrastierten Ultradünnschnitte mit dem Elektronenmikroskop ergibt sich folgendes Bild (Abb. 39):

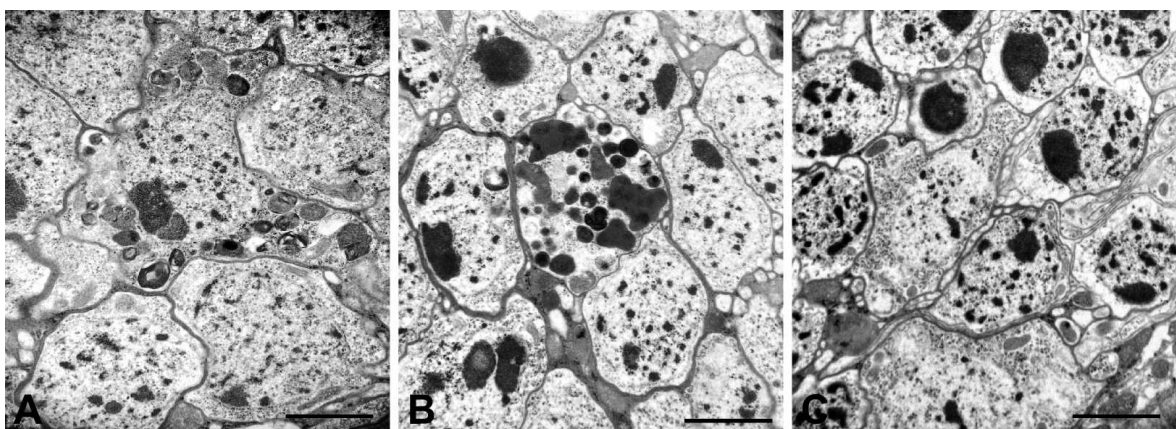


Abb. 39: Genetische Interaktion von *vap*¹ mit *car*¹ (Ultradünnschnitte).

In Fliegen des Stammes *car*¹ (A) sind nur wenige autophagische Partikel zu erkennen. In *vap*¹*car*¹ (B) scheint ihre Zahl hingegen erhöht zu sein. Durch Entfernung von *car*¹ (C) häufen sich weniger dieser Partikel in den Neuronen an.

Genotypen: (A) *car*¹/*Y*, (B) *vap*¹*f**car*¹/*Y*, (C) *vap*¹*f*/*Y*. Maßstab: 2µm.

In *car*¹ (Abb. 39A) können vereinzelte Autolysosomen identifiziert werden, die wohl einen basalen Autophagie-Level zum normalen Protein- und Organell-Turnover darstellen. In *vap*¹*car*¹ (Abb. 39B) Fliegen fällt die bereits veröffentlichte erhöhte Anzahl autophagischer Vakuolen auf (siehe Abschnitt 1.3.2.5.), die in *vap*¹ ohne *car*¹ (Abb. 39C) wiederum auf ein geringeres Niveau gesunken zu sein scheint; jedoch ist auch hier eine Quantifizierung nicht durchführbar.

Eine quantitative Auswertung des Einflusses von *car*¹ auf die Anhäufung autophagischer Vakuolen in *vap* Fliegen konnte somit zwar nicht erfolgen; die Ergebnisse aus der ultrastrukturellen Analyse geben dennoch gemeinsam mit der gezeigten genetischen Interaktion von *car*¹ mit *vap*¹ in Bezug auf Lebensspanne und Neurodegenerations-Phänotyp der Fliegen einen deutlichen Hinweis auf eine Beteiligung von RasGAP am autophagischen Prozess.

DISKUSSION

4.1. Funktionelle Analyse von *Drosophila* RasGAP

4.1.1. Letalität der ubiquitären *RasGAP* Überexpression

Um die Funktion von *Drosophila* RasGAP besser zu verstehen, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer Missexpression der *RasGAP* cDNA genauer analysiert. Es konnten Ergebnisse aus zuvor durchgeführten Untersuchungen (Kiermayer, 2003) bestätigt werden, dass eine ubiquitäre Missexpression mit dem Treiber *actin-GAL4* für die Fliegen tödlich ist. Das im Abschnitt 3.1.1.1. beschriebene Experiment zeigte, dass die Überexpression bereits im frühen Puppenstadium zum Tod führt. Dass die Überexpression nicht erst in adulten Tieren zur Letalität führt, weist auf eine Auswirkung der Missexpression in früheren Entwicklungsabschnitten hin. Tatsächlich sind ja Funktionen von *Drosophila* RasGAP im Zusammenhang mit für die Entwicklung zuständigen RTKs nachgewiesen (Cleghon *et al.*, 1998; Woodcock & Hughes, 2004); deren Überfunktion könnte den tödlichen Effekt hervorrufen.

Im Gegensatz zur Überexpression besitzt ein Funktionsverlust von RasGAP, wie er in den *vap* Mutanten vorliegt, jedoch keinen Effekt auf die Entwicklung der Tiere (Botella *et al.*, 2003); überlebenswichtige Funktionen von RasGAP können in Embryonen und Larven vermutlich durch andere Faktoren, möglicherweise die beiden anderen in *Drosophila* vorhandenen GAP Proteine für Ras, NF1 und GAP1, kompensiert werden. Anders jedoch in adulten Tieren: die Mutation im *RasGAP* Gen verursacht in den *vap* Mutanten altersabhängige Neurodegeneration. Dieser Phänotyp kann durch Wiederherstellung der GAP katalytischen Funktion, entweder durch Expression von Konstrukten mit intakter GAP Domäne oder Expression von GAP1, nicht kompensiert werden (siehe Abschnitt 3.1.3.). Dies weist auf eine spezifischere Funktion von RasGAP in adulten Tieren, und wie weitere Untersuchungen zeigten, insbesondere in den Neuronen adulter Tiere, hin (ausführlichere Diskussion hierzu siehe unter Abschnitt 4.1.2.).

Drosophila RasGAP, das Homologe zum humanen p120RasGAP, weist im Gegensatz zu den anderen GAPs neben der GAP katalytischen Domäne weitere Domänen auf, die für Interaktionen des Proteins mit Lipiden oder anderen Proteinen zuständig sind. Besonders die SH2 Domänen vermitteln eine Vielzahl der bisher bekannten Protein/Protein Interaktionen von RasGAP. Wie in Abschnitt 3.1.1.2. gezeigt, verursacht ubiquitäre Überexpression von Konstrukten, die Mutationen in der GAP katalytischen oder in den SH2 Domänen tragen, im Gegensatz zur Überexpression der intakten cDNA keine Letalität. Auch Überexpression eines Konstruktes, durch das nur die Adapter-Domäne des Proteins codiert wird, führt nicht zum verfrühten Tod der Fliegen.

Überexpression eines Konstruktes, in dem nur die SH3 Domäne eine Mutation aufweist, ist letal für die Fliegen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die SH3 Domäne für die Funktion von RasGAP keine entscheidende Rolle spielt. Möglicherweise führt aber die

Mutation auch nicht zu einem vollständigen Funktionsverlust der Domäne, so dass das verwendete Konstrukt der wildtypischen cDNA entspricht und deshalb denselben Phänotyp aufweist. Während nämlich beispielsweise für die verwendeten Konstrukte mit Mutationen in den SH2 Domänen gezeigt werden konnte, dass sie tatsächlich die Bindungsfähigkeit an bekannte Interaktionspartner verhindern (Woodcock & Hughes, 2004), fehlt ein solcher Nachweis für das SH3 Konstrukt *UAS-B111.4*. Dass alle im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit mit dem Konstrukt durchgeführten Versuche keinen vom wildtypischen Konstrukt abweichenden Effekt gezeigt haben, kann als Hinweis gedeutet werden, dass die SH3 Domäne nicht wirklich in ihrer Funktion gestört ist. Um dies mit Sicherheit sagen zu können, müsste beispielsweise die Bindungsfähigkeit an bekannte Interaktionspartner über Co-Präzipitations-Versuche oder Two-Hybrid gesondert untersucht werden.

Die Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, dass nur Überexpression des voll funktionstüchtigen RasGAP mit all seinen Domänen, also auch der GAP Domäne, zu einer übermäßigen Aktivität des Proteins führt, die für die Tiere in der Entwicklung tödlich ist, möglicherweise über eine Deregulation von Ras.

Der Effekt der Mutation in *RasGAP* in adulten Tieren unterscheidet sich hiervon, wie die Ergebnisse der Analyse des Phototaxis- und des Neurodegenerations-Phänotyps von *vap* Mutanten zeigen, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.1.2. Einfluss der verschiedenen Domänen von RasGAP auf Phototaxis- und Neurodegenerations-Phänotyp

Neuronale Expression der RasGAP cDNA mit Hilfe des Treibers *elav-GAL4* kann den Phototaxis-Phänotyp von *vap* Fliegen positiv beeinflussen oder retten; der Anteil der Fliegen im ersten Röhrchen am Ende des Versuchs (ungefähr 40%) ist signifikant geringer als in den *vap* Fliegen (circa 70%), wenn auch nicht identisch mit dem in wildtypischen Tieren (in etwa 20%). Das Ergebnis liefert einen deutlichen Hinweis, dass der Funktionsverlust von RasGAP in Neuronen die Ursache des Phänotyps ist.

Untersuchung des Einflusses der einzelnen Domänen des Proteins auf den Verhaltens-Phänotyp erweist sich allerdings als schwierig: relativ eindeutig lässt sich lediglich zeigen, dass die GAP Domäne oder der N-terminale Teil von RasGAP mit den SH2 und SH3 Domänen allein nicht genügen, um das wildtypische Verhalten wiederherzustellen (Kiermayer, 2003 und diese Arbeit). Eine Mutation in der SH3 Domäne scheint den rettenden Effekt des cDNA Konstruktes nicht zu beeinflussen; hier gilt jedoch wiederum, dass ein tatsächlicher Funktionsverlust durch die eingeführte Mutation nicht bewiesen ist.

Der genaue Einfluss von Mutationen in beiden oder jeweils einer der SH2 Domänen lässt sich schwer einschätzen; sind beide Domänen mutiert, wird das Verhalten nicht signifikant

verbessert. Ist nur jeweils eine der SH2 Domänen mutiert, liegt der Anteil der Fliegen im ersten Röhrchen am Ende des Versuchs zwischen den Werten für die *vap* Mutante und für die Rettung durch das wildtypische Konstrukt. Möglicherweise kann neuronale Expression der entsprechenden Konstrukte das Verhalten retten, was dafür sprechen würde, dass die Funktion dieser Domänen für das wildtypische Verhalten nicht entscheidend ist beziehungsweise, dass eine funktionierende SH2 Domäne allein ausreicht, um Funktionsfähigkeit zu gewährleisten. Eindeutig können die Ergebnisse allerdings nicht eingeordnet werden. Dies zeigt die Schwierigkeit der Interpretation der Daten aus Verhaltensversuchen; vermutlich spielen alle Domänen des Proteins eine Rolle für die korrekte Steuerung des Verhaltens. Die Ergebnisse sprechen möglicherweise für eine kooperative Rolle beider SH2 Domänen und der GAP Domäne. Eine eindeutige Aussage ist jedoch schwer zu treffen.

Davon unterscheidet sich der Einfluss der einzelnen Domänen auf den Neurodegenerations-Phänotyp: der Effekt einer neuronalen Überexpression von *UAS-RasGAP* auf den Neurodegenerations-Phänotyp ist eindeutig: die Vakuolisierung kann vollständig gerettet werden. Für diesen Phänotyp ist folglich definitiv die Mutation in *RasGAP* verantwortlich; die Funktion des Proteins wird in Neuronen gebraucht. Neuronale Überexpression von *RasGAP* cDNA Konstrukten, die Mutationen in beiden oder in einer der SH2 Domänen besitzen, kann den wildtypischen Phänotyp nicht wiederherstellen; diese Domänen haben eine Bedeutung für die Integrität der Neuronen. Überexpression des Konstruktes mit der Mutation in der SH3 Domäne scheint vollständig zu retten, jedoch ist wiederum zu erwähnen, dass eventuell der Funktionsverlust nicht vollständig ist; eine Rolle dieser Domäne für die Funktion von RasGAP in adulten Neuronen kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Eindeutig ist jedoch, dass die GAP katalytische Domäne für den Neurodegenerations-Phänotyp keine Bedeutung besitzt: Expression eines Konstruktes mit einer Mutation in der GAP Domäne kann den Phänotyp vollständig retten. Darüber hinaus kann durch Expression eines Konstruktes, in dem nur die SH2 und SH3 Domänen vorhanden sind, die Vakuolisierung ebenfalls vollständig verhindert werden. Dies zeigt eindeutig eine entscheidende Rolle dieses Teils des RasGAP Proteins beziehungsweise der dort vorhandenen Domänen für die Integrität der Neuronen.

Da SH2 und SH3 Domänen bekannte Adapter-Domänen darstellen, die Protein/Protein Interaktionen vermitteln, wird eine wichtige Rolle solcher Wechselwirkungen von RasGAP vermutet. Die Ergebnisse eines deshalb in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Yeast Two Hybrid Screens zur Identifizierung von Interaktionspartnern von *Drosophila* RasGAP werden im nächsten Teil diskutiert.

4.2. Untersuchung molekularer Interaktionen von *Drosophila* RasGAP mittels Yeast Two Hybrid Screen

4.2.1. Verwendetes System und Köder-Vektoren

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifizierung von Interaktionspartnern von *Drosophila* RasGAP das ProQuest™ Two Hybrid System von Invitrogen verwendet, das verschiedene Vorkehrungen gegen das Auftreten falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse sowie Kontrollstämme zur Überprüfung der korrekten Handhabung und zur Einordnung der Interaktionsstärken beinhaltet (näher erläutert in Abschnitt 3.2.1.). Unter Verwendung dieses Systems konnten im Rahmen dieser Dissertation jedoch keine Interaktionspartner von RasGAP beziehungsweise seiner SH3 Domäne identifiziert werden. Bevor dieses Ergebnis näher diskutiert wird, sollen vorab noch einige Punkte bezüglich des verwendeten Systems und der Köder-Vektoren erläutert werden.

Ein parallel zur hier vorgestellten Arbeit mit demselben System durchgeführter Yeast Two Hybrid Screen nach Interaktionspartnern des *Drosophila* GABARAP zeigte, dass das verwendete System hervorragend geeignet ist, sowohl bereits bekannte oder vermutete Interaktionen zu bestätigen, als auch bisher unbekannte, neue Interaktionen zu entdecken, deren weitere Untersuchung Aufschluss über die Funktion des als Köder verwendeten Proteins geben könnte. In diesem Screen konnten insgesamt 16 verschiedene Interaktionspartner identifiziert werden; darunter waren solche, für deren Homologe aus Säugern eine Interaktion mit dem Säuger-GABARAP bekannt war oder deren Funktion im Zusammenhang mit der vermuteten Funktion von GABARAP stand, sowie verschiedene Proteine bisher unbekannter Funktion (Ruckerbauer, 2006).

Von Michaela Mark konnte für RasGAP gezeigt werden, dass die (weiter unten näher erläuterten) Köder-Konstrukte weder selbständig die Reportergene induzieren, noch toxisch für die Hefen sind, so dass das System grundsätzlich eingesetzt werden kann. Zudem konnte unter Verwendung des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Systems eine beschriebene Interaktion von *Drosophila* RasGAP mit der Aurora Kinase bestätigt werden (Mark, 2005). Auch wurde die korrekte Handhabung durch den Experimentator überprüft. Grundsätzlich sprach also nichts gegen eine erfolgreiche Durchführung des Screens.

Im Sinne einer unvoreingenommenen Identifizierung von Interaktionspartnern von RasGAP und zur Aufrechterhaltung der oftmals für Interaktionen einzelner Domänen entscheidenden Gesamtkonformation wurde die gesamte Sequenz als Köder für den Screen eingesetzt. Jedoch ist nicht nur die Klonierung und Vermehrung größerer DNA Stücke schwieriger als die kleinerer Teile; zudem ist auch die Detektion von Interaktionen einzelner Domänen einfacher: selbst bei Bindung eines Interaktionspartners kann die räumliche Assoziation der Transkriptionsfaktor-Domänen bei einem großen Protein

(RasGAP: 108kDa) gefährdet sein. Deshalb sollte der Screen auch mit einer einzelnen Domäne aus RasGAP durchgeführt werden; es wurde die SH3 Domäne gewählt, da trotz der Ergebnisse aus der funktionellen Analyse eine Rolle dieser Domäne für die korrekte Funktion von RasGAP im Zusammenhang mit der Neurodegeneration nicht ausgeschlossen werden kann und Interaktionen der SH2 Domänen mit Hilfe des verwendeten Systems aufgrund der erforderlichen Phosphorylierung des Interaktionspartners nicht untersucht werden können.

Vergleicht man die Ergebnisse aus den Screens mit der RasGAP cDNA und der SH3 Domäne, so kann man feststellen, dass für die einzelne Domäne tatsächlich leichter Interaktionen zu finden sind, auch wenn es sich im Nachhinein herausgestellt hat, dass es sich nicht um echte, spezifische Interaktionen handelte, sondern um Falsch-Positive. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass trotz der verschiedenen Vorkehrungen, die im System gegen das Auftreten Falsch-Positiver getroffen wurden, diese nicht vermieden werden können, vor allem, da zwei der drei unabhängigen Reportergene (*HIS3* und *URA3*) aufgrund der heiklen Handhabung des Replika Cleaning (siehe unten) nicht mit großer Zuverlässigkeit verwendet werden konnten. Insgesamt war jedoch in den durchgeführten Screens nicht das Auftreten zu vieler falsch-positiver Klone das Problem, sondern eher die Möglichkeit von Falsch-Negativen.

Dass trotz der nachgewiesenen grundsätzlichen Eignung des Systems bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Screen keine Interaktionen von RasGAP beziehungsweise seiner SH3 Domäne festgestellt werden konnten, kann verschiedene Gründe haben. Zunächst muss erläutert werden, dass bei der Durchführung des Screens verschiedene systematische Probleme auftraten; ihre Bedeutung wird im nun folgenden Abschnitt diskutiert. Danach werden generelle Gründe aufgeführt, warum die Identifizierung von Interaktionspartnern von RasGAP mittels Two Hybrid Screen möglicherweise spezielle Probleme in sich birgt.

4.2.2. Systemprobleme

Zunächst muss die Repräsentativität der verwendeten Bibliothek hinterfragt werden. Wie bereits erwähnt, waren bereits die von Dr. Megan Goodwin erhaltenen DNAs einmal aus der ursprünglichen Bibliothek amplifiziert worden, wodurch sicherlich manche cDNAs verloren gingen beziehungsweise andere bevorzugt vermehrt wurden, wie sich deutlich am Ergebnis aus dem parallel am Lehrstuhl durchgeführten Screen des SS1 Amplifikats mit GABARAP zeigte: für die SS1 Bibliothek wurden 150 His⁺ Klone identifiziert, von denen 50 weiter getestet wurden. Diese enthielten alle dasselbe Konstrukt: die cDNA für *cinnamon*, das *Drosophila* Homologe eines aus Säugetieren bekannten Interaktionspartners von GABARAP. Hingegen konnten in einem Screen mit der liquid

Bibliothek 15 unterschiedliche Interaktionspartner identifiziert werden; diese Art der Amplifikation scheint eine bessere Repräsentativität zu besitzen (Ruckerbauer, 2006); eine Vollständigkeit kann dennoch auch hier nicht als sicher angenommen werden.

Zudem waren auch die Transformationsraten nicht befriedigend; sie konnten aber trotz großer Bemühungen nicht verbessert werden. Von der Transformationsrate für die Bibliothek ist jedoch die Anzahl der gescreenten Klone abhängig. Zum Test durchgeführte Transformationen mit anderen Hefe-Stämmen und anderen DNAs brachten zum Teil recht hohe Transformationsraten. Auch in den parallel von Sabine Ruckerbauer durchgeführten Screens mit dem GABARAP Protein konnten höhere Raten erzielt werden. Scheinbar war speziell die Transformation der Hefen, welche die *RasGAP* Plasmide enthielten, mit den Bibliotheks-Plasmiden problematisch.

Weiters war auch die sichere Identifizierung von His⁺ Klonen schwierig, da es trotz der zuvor ausgetesteten 3AT Konzentration zu einem relativ starken Hintergrundwachstum kleinerer Kolonien kam, da die Platten recht lange inkubiert werden mussten, um überhaupt Wachstum zu beobachten; eine Kontamination wurde mittels Mikroskopie ausgeschlossen. Mit den nach abermaligem Ausstreichen als His⁺ eingeordneten Klonen wurde weitergearbeitet; sie wurden auf Masterplatten ausgestrichen und den Interaktionstests unterzogen. Aufgrund der Replika Cleaning Schritte, die für die Auswertung des Wachstums auf den Platten ohne Uracil und ohne Histidin nötig waren, konnten die Phänotypen hier jedoch relativ schlecht eingeordnet werden, da bei zu gründlicher Reinigung möglicherweise positive Klone verloren gehen, bei zu oberflächlicher Reinigung hingegen eigentlich negative Klone trotzdem wachsen können. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, war das Ergebnis aus dem X-gal Assay am eindeutigsten. Hier als positiv beobachtete Kolonien wurden weiter untersucht; allerdings waren das recht wenige, nur insgesamt acht Kolonien aus den beiden Screens mit der SH3 Domäne. Diese erwiesen sich in den durchgeführten Retransformationsversuchen jedoch als Falsch-Positive, da hier keine positiven Phänotypen mehr festgestellt wurden. Zudem zeigte auch die Sequenzierung der Inserts, dass es sich um typische Falsch-Positive wie mitochondriale RNAs oder Proteine handelt, die unter physiologischen Bedingungen mit dem zytoplasmatischen RasGAP nicht interagieren können. Neben diesen systematischen Problemen mit Repräsentativität der Bibliothek, Transformationsrate und Interpretation des Wachstums der Hefen auf den verschiedenen Selektionsmedien können mögliche spezifische Gründe aufgeführt werden, die dazu führten, dass für RasGAP keine Interaktionspartner gefunden wurden.

4.2.3. Spezifische Schwierigkeiten

Die bei der Transformation aufgetretenen Schwierigkeiten speziell mit den verwendeten *RasGAP* Plasmiden sowie das langsame Wachstum der damit transformierten Hefen deuten darauf hin, dass die Plasmide nicht optimal von den Hefen vertragen werden. Möglicherweise wird das RasGAP Protein auch nicht stark exprimiert; ein Nachweis über die vorhandene Proteinmenge mittels Western Blot war nicht gelungen (Mark, 2005). Zudem könnten im Hefe-System Probleme mit Bioprocessing, Faltung und Stabilität des Proteins auftreten, welche die Bildung richtiger Interaktionen verhindern.

Ein Vergleich mit dem von Sabine Ruckerbauer durchgeführten Screen deutet darauf hin, dass generell die Identifizierung von Interaktionspartnern von RasGAP mittels Yeast Two Hybrid Screen schwierig sein könnte: in einem von Gigoux *et al.* beschriebenen Screen einer *Drosophila melanogaster embryo cDNA library* nach Interaktionspartnern der RasGAP SH3 Domäne wurden 6×10^6 Transformanten erhalten, jedoch nur zwei positive Klone identifiziert, die beide die Aurora Kinase codierten. Im Gegensatz dazu konnte Sabine Ruckerbauer bei der gleichen Anzahl Transformanten 15 verschiedene Interaktionspartner von GABARAP identifizieren.

Diese Schwierigkeit zeigt sich möglicherweise auch daran, dass in der Literatur bisher insgesamt lediglich drei in einem Yeast Two Hybrid Screen identifizierte Interaktionspartner von RasGAP beschrieben sind: Filamin C (Lypowy *et al.*, 2005) und Akt (Yue *et al.*, 2004), die beide aus demselben Screen einer *neonatal rat heart cDNA library* hervorgingen, sowie die Aurora Kinase (Gigoux *et al.*, 2002).

Auch sind schwache Interaktionen, wie sich am Kontrollstamm B zeigt, mit dem verwendeten System nur sehr schwer zu detektieren. Möglicherweise sind aber die Interaktionen von RasGAP beziehungsweise seiner SH3 Domäne nur vorübergehend und schwach; auf diese Möglichkeit deutet die Tatsache hin, dass in auf den Ergebnissen von *High Throughput Screens* basierenden *Protein Interaction Maps* von *Drosophila* (Giot *et al.*, 2003; Formstecher *et al.*, 2005) RasGAP nicht zu finden ist. Ein weiterer Grund für diese Befunde könnte sein, dass die meisten der bisher beschriebenen und damit vielleicht überhaupt aller Interaktionen von RasGAP über die SH2 Domänen stattfinden, und solche Interaktionen mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden können.

Die Bedeutung einer solchen bekannten Interaktion der RasGAP SH2 Domänen, nämlich der mit dem EGFR, wird im nun folgenden Abschnitt diskutiert.

4.3. Analyse genetischer Interaktionen von *RasGAP* mit *Crk*

4.3.1. Mögliche Bedeutung des Gleichgewichts der Expression von *RasGAP* und *Crk*

Über seine SH2 Domänen bindet RasGAP an verschiedene RTKs, unter anderen an den EGFR. Bekannt ist, dass *in vitro* eine quantitative Konkurrenz zwischen RasGAP und dem Adapter-Protein Crk um Bindestellen am EGFR besteht (Birge *et al.*, 1992). Der von diesem Rezeptor ausgelöste Ras Signalweg ist in den *vap* Mutanten nachweislich dereguliert (Kiermayer, 2003; Botella *et al.*, 2003). Eine naheliegende Vermutung wäre deshalb, diese Deregulation auf die fehlende negative Regulierung von Ras durch die GAP katalytische Domäne zurückzuführen; allerdings spielt diese Domäne bei der Rettung des neurodegenerativen Phänotyps in *vap* Mutanten keine Rolle. Wenn man davon ausgeht, dass die Deregulation ursächlich mit der Neurodegeneration in Zusammenhang steht, ist ein solcher direkter Zusammenhang deshalb nicht wahrscheinlich. Der N-terminale Teil von RasGAP hingegen rettet den Neurodegenerations-Phänotyp; denkbar wäre ein indirekter Einfluss über die Bindung dieser Domäne an den Rezeptor und dadurch veränderte Lokalisation weiterer Faktoren, möglicherweise über Bindung an die SH3 Domäne von RasGAP, welche die Aktivität von Ras beeinflussen. Möglicherweise ist die Deregulation von Ras aber auch ein indirekter Effekt und nicht die Ursache für die Neurodegeneration, und andere Signalwege sind von der *vap* Mutation betroffen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die fehlende Bindung von RasGAP in *vap* Fliegen die Bindung anderer Faktoren wie Crk in ihrer Dynamik gestört ist, was die Balance der zellulären Signalweitergabe, über Ras oder andere Signalwege, stört und so die Neurodegeneration verursacht. Die direkte Auswirkung einer genetischen Beeinflussung der Expression von *Crk* wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dazu wurden Fliegenlinien geschaffen, die entweder ein Überexpressionskonstrukt oder ein *RNAi* Konstrukt für *Crk* trugen; korrekte Sequenz sowie erfolgreiche Etablierung stabiler Fliegenlinien konnten gezeigt werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Überexpression der Konstrukte diskutiert.

4.3.2. Auswirkungen der Überexpression von *UAS-Crk*

Für das *UAS-Crk* Konstrukt konnte recht eindeutig mittels semi-quantitativer PCR gezeigt werden, dass ubiquitäre Expression die mRNA Menge erhöht; eine Auswirkung auf die Proteinmenge müsste jedoch gesondert mittels Western Blot untersucht werden. Ubiquitäre Überexpression verursachte weder mit *actin-GAL4* noch mit *Da-GAL4* irgendeinen Phänotyp. Denkbar wäre, dass das Niveau der Expression nicht genügt, die

Proteinmenge überhaupt oder zumindest so stark zu erhöhen, dass es zu Störungen kommt.

Gezielte Expression des Konstruktes in Geweben wie Auge oder Flügel verursachte ebenfalls keinerlei erkennbare Phänotypen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Missexpression durch andere Faktoren kompensiert werden kann; möglicherweise ist das Niveau der Missexpression auch zu gering oder sie erfolgt zum falschen Zeitpunkt, um eine größere Störung zu verursachen. Vielleicht besitzt Crk in den Geweben auch keine entscheidende Funktion. Über die natürliche Expression dieses Gens in den analysierten Geweben sind im übrigen keine Daten vorhanden.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen zu *Crk* stand jedoch die Wechselwirkung mit *RasGAP*, insbesondere im Bezug auf den Neurodegenerations-Phänotyp. Die Expression von *Crk* in Köpfen adulter Taufliegen konnte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt); eine Rolle von Crk in Gehirnen ist folglich nicht von vorne herein ausgeschlossen. Überexpression von *UAS-Crk* in den Neuronen wildtypischer Tiere in dem Maße, wie diese durch das Konstrukt stattfindet, führte nicht zur Entstehung eines Neurodegenerations-Phänotyps wie in *vap* Fliegen. Im *vap²* Hintergrund führte die Überexpression unerwarteterweise zu einer Suppression des Phänotyps. Dieser Effekt wird am Ende des nächsten Abschnittes gemeinsam mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit *UAS-Crk-RNAi* diskutiert.

4.3.3. Auswirkungen der Expression von *UAS-Crk-RNAi*

Für das *UAS-Crk-RNAi* Konstrukt konnte der Einfluss auf die Genexpression bei ubiquitärer Expression mittels RT-PCR nicht analysiert werden, da genügend Tiere aus den erforderlichen Kreuzungen nur schwer zu erhalten waren; dieser Effekt wurde jedoch wiederum als Hinweis auf die Funktionalität des Konstruktes gewertet, wie im Folgenden genauer diskutiert.

Ubiquitäre Expression von *UAS-Crk-RNAi* verursachte einen *bent tibia* Phänotyp: die Tibia des dritten Beinpaares in den Fliegen weist einen deutlichen Knick auf, der dazu führt, dass sich die Tiere nicht richtig bewegen können. Vermutlich führt diese Behinderung dazu, dass die Fliegen nach dem Schlüpfen im Fliegenbrei kleben bleiben und dort sterben. Ein solcher Phänotyp wurde auch gefunden in einem *genetic modifier screen* nach genetischen Elementen, die den durch die *broad* Mutation (*br¹*) verursachten Phänotyp verstärken (Ward *et al.*, 2003). Die Ergebnisse dieses Screens legen einen wichtigen Einfluss des Rho1 Signalweges auf die Morphogenese des Fliegenbeins nahe. Rho1 gehört wie Rap, das vom Crk Interaktionspartner C3G reguliert wird, zu den kleinen GTPasen. Der gefundene Phänotyp der *UAS-Crk-RNAi* ubiquitär exprimierenden Fliegen

deutet möglicherweise auf eine bisher unbekannte Rolle von Crk, eventuell über den Interaktionspartner C3G, in diesem Signalweg hin.

Möglicherweise ist dieser Phänotyp aber auch nur die einzige sichtbare Auswirkung der Interferenz, und weitere, nicht auf den ersten Blick erkennbare Schädigungen führen zum Tod der Tiere: *actin-GAL4* ist schließlich ein ubiquitärer Treiber, so dass es unwahrscheinlich scheint, dass nur die Beine der Tiere von einer Hemmung der Funktion von Crk betroffen sind. Eine weitere Untersuchung der Tiere war jedoch nicht durchführbar, da eine Aufzucht der Tiere in ausreichender Anzahl nicht gelang. Jedenfalls zeigt die Entstehung eines Phänotyps bei ubiquitärer Expression des *RNAi* Konstruktes, dass dieses funktioniert.

Wie beim *UAS-Crk* Konstrukt hatte auch Expression des *UAS-Crk-RNAi* Konstruktes in Auge oder Flügel der Tiere keine Auswirkung. Expression in Neuronen wildtypischer Fliegen zeigte auch keinen Einfluss auf die Integrität des Gehirns. Interessanter ist jedoch ohnehin der Einfluss einer geänderten Expression im *vap* mutanten Hintergrund, in dem möglicherweise die deregulierte Balance der Menge von RasGAP und Crk zur Entstehung der Neurodegeneration führt, und der deshalb auf eine veränderte Expression von *Crk* reagieren könnte.

Neuronale Expression des *RNAi* Konstruktes, durch das ein möglicher schädlicher Effekt des Fehlens von RasGAP durch Reduktion der Dosis des mutmaßlichen Konkurrenten Crk ausgeglichen werden könnte, führte tatsächlich zu einer Verringerung der Neurodegeneration. Allerdings besaß Überexpression denselben oder einen sogar noch stärker positiven Effekt. Aus diesen widersprüchlichen Ergebnissen kann folglich nicht geschlossen werden, ob und wie das Expressionsniveau von *Crk* tatsächlich den Neurodegenerations-Phänotyp von *vap* Fliegen beeinflusst; es sollten in keinem Fall die zwei Konstrukte, die einen gegenteiligen Effekt auf die Expressionsstärke des Gens haben sollten, dieselbe Auswirkung auf den Phänotyp zeigen. Generell traten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Probleme bei der Interpretation der Daten aus solchen genetischen Interaktionsversuchen unter Verwendung von *UAS-(RNAi)* Konstrukten auf, die später noch diskutiert werden (siehe Abschnitt 4.5.).

Zunächst werden aber noch die Ergebnisse aus Versuchen zu einer potentiellen Rolle von *Drosophila* RasGAP in der Apoptose diskutiert.

4.4. RasGAP und Apoptose: der N-terminale Teil von RasGAP als möglicher genereller Überlebensfaktor

4.4.1. Induktion von Apoptose in *Drosophila melanogaster* und Untersuchung des Einflusses von „Fragment N“

In Säugerzellen war gezeigt worden, dass es bei niedriger Caspase-Aktivität zu einer Spaltung von RasGAP kommt und dass das dabei entstehende sogenannte Fragment N die Zellen vor Apoptose schützen kann (Yang & Widmann, 2001). Eine gewisse Ähnlichkeit zu diesem Fragment besitzt das *UAS-17.30* Konstrukt, welches die Neurodegeneration in *vap* Fliegen retten kann. In den Neuronen ist zwar keine Apoptose zu beobachten; die Zellen scheinen durch autophagischen Zelltod zu sterben. Allerdings existieren zahlreiche Hinweise, dass Apoptose und Autophagie keine ausschließlichen Vorgänge sind; vielmehr scheinen zahlreiche Verknüpfungen zwischen diesen beiden Mechanismen zu bestehen, so dass beispielsweise auch bei der Auslösung der Autophagie Caspasen eine Rolle spielen können (Übersichtsartikel Baehrecke, 2003). Möglicherweise ist also eine der Funktionen von *Drosophila* RasGAP, ähnlich wie beim Säugetier-Homologen, eine Sensorfunktion für Caspase-Aktivität. Fehlen des Proteins in den Neuronen der *vap* Mutanten verursacht Fehlen der protektiven Wirkung von „Fragment N“, so dass Zelltod eingeleitet wird, der durch Expression des Fragments verhindert werden kann.

Ähnlich wie bei der Untersuchung in den Säugetier-Zellen wurde deshalb ein künstliches System geschaffen, um in den Fliegen Apoptose zu induzieren: das pro-apoptotische Gen wurde mittels eines *UAS* Konstruktes in bestimmten Geweben unter Verwendung entsprechender Treiber exprimiert. Dies führte jedoch zu stärkeren Effekten als erwartet: es traten nicht nur Veränderungen in den Strukturen auf, in denen *reaper* überexprimiert wurde, vielmehr führte Überexpression des pro-apoptotischen Gens zur Letalität der Tiere. Dies zeigt, dass eventuell die Expression der verwendeten Treiber, *GMR-GAL4* und *MS1096-GAL4*, nicht auf Augen und Flügel beschränkt ist, sondern eventuell auch andere, lebenswichtige Zellen oder Organe betroffen sind. Alternativ könnte auch der Effekt in den Augen oder Flügeln so stark sein, dass der gesamte Organismus kollabiert. Dennoch wurde das System als geeignet eingestuft, um die Wirkung anti-apoptotischer Faktoren zu untersuchen, da die Letalität durch Co-Expression des anti-apoptotischen Gens *DIAP1* herabgesetzt werden konnte.

Co-Expression von *UAS-17.30* konnte die durch Überexpression von *UAS-rpr* in Auge und Flügel der Fliegen verursachte Letalität jedoch nicht verhindern. Es muss beachtet werden, dass *DIAP1* wirklich eine entscheidende und direkte Rolle bei der Inhibition der Apoptose zukommt, während RasGAP vermutlich wohl eher eine modulierende Funktion über die Regulation nachgeschalteter Signalwege besitzt, und im verwendeten System selbst der Effekt des Caspase-Inhibitors *DIAP1* die auftretende Letalität nicht komplett

unterdrücken kann, sondern lediglich das Überleben weniger Fliegen ermöglicht. Darüber hinaus stellt wohl auch Expression von *reaper* nicht, wie der im Säuger-Versuch verwendete Reiz, einen milden apoptischen Stress dar, sondern eine, wie auch an den schwerwiegenden Folgen für das Überleben der Fliegen zu sehen ist, massive Induktion der Apoptose. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass, selbst wenn *UAS-17.30* eine anti-apoptotische Funktion besäße, diese durch die auch im Säuger beschriebene zweite Spaltung bei hoher Caspase-Aktivität im verwendeten Versuchsaufbau verhindert würde. Darüber hinaus gibt es auch Argumente, warum eine dem Säuger-Homologen vergleichbare Funktion des N-terminalen Teils von *Drosophila* RasGAP generell nicht unbedingt zu erwarten ist.

4.4.2. Unterschiedliche Rollen von RasGAP im Zusammenhang mit der Apoptose in *Drosophila melanogaster* und Säugern

Zunächst ist der Ablauf der Auslösung der Apoptose in Säugern und Fliegen unterschiedlich: in Säugetieren wird die erste Entscheidung, Caspase-abhängigen Zelltod einzuleiten, auf der Ebene positiver Zelltod-Signale getroffen, die die Aktivierung von Initiator-Caspasen auslösen. Im Gegensatz dazu liegt in vielen Zellen in *Drosophila* eine ständige Aktivierung der Initiator-Caspase Dronc vor; die Zellen überleben diesen ständigen Stimulus zur Auslösung von Zelltod, weil sie den Caspase-Inhibitor DIAP1 exprimieren (Übersichtsartikel Hay & Guo, 2006). Diese doch sehr großen Unterschiede der Auslöse-Mechanismen lassen weitere Unterschiede in der Regulation, trotz des hohen Konservierungsgrades zahlreicher Elemente des Weges, wahrscheinlich erscheinen.

Zudem bestehen trotz der grundsätzlichen großen Homologie strukturelle Unterschiede zwischen RasGAP aus Säugern und aus *Drosophila*, die für die Funktion von RasGAP während der Apoptose entscheidend sein könnten: zunächst scheinen die Caspase-Schnittstellen nicht konserviert zu sein. Allerdings kann Caspase-3 offensichtlich auch an *non-consensus sites* schneiden, die nicht der bevorzugten Sequenz DEXD entsprechen (Jahani-Asl *et al.*, 2007), so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch *Drosophila* RasGAP trotz der strukturellen Unterschiede von Caspasen gespalten wird; es gibt dafür jedoch bisher keine Beweise. Dieser Sachverhalt müsste mittels weiterer Experimente überprüft werden. Ob sich das lohnt, ist aufgrund der oben aufgeführten Unterschiede in der Auslösung der Apoptose in Fliegen und Säugern allerdings fraglich.

Außerdem besteht ein weiterer struktureller Unterschied zwischen den RasGAP Proteinen von *Drosophila* und Säugern darin, dass im Fliegen-Protein neben einer ungefähr 70 Aminosäuren langen hydrophoben Region am Aminoterminal eine Prolin-reiche Sequenz in diesem Bereich fehlt (Feldmann *et al.*, 1999). Über diese Sequenzen möglicherweise

vermittelte Interaktionen, beispielsweise mit den SH3 Domänen anderer Proteine wie den Src-Kinasen, fehlen wohl in *Drosophila* und könnten eine Rolle für die Funktion von RasGAP während der Apoptose spielen, da es dieser Teil ist, der bei der zweiten Spaltung von RasGAP in Säugern bei hoher Caspase-Aktivität abgespalten wird, wodurch die anti-apoptotische Funktion von Fragment N aufgehoben wird.

Trotz der aufgeführten Unterschiede zwischen dem Ablauf der Apoptose und der Struktur der RasGAP Proteine sowie der beschriebenen Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche kann eine Funktion des N-terminalen Teils von *Drosophila* RasGAP im Zusammenhang mit der Apoptose ähnlich der des Fragment N in Säugern zwar nicht ausgeschlossen werden; die aufgeführten Punkte lassen eine solche Funktion allerdings unwahrscheinlich erscheinen.

Auch die Tatsache, dass in den Neuronen der *vap* Fliegen keine Merkmale des apoptotischen Zelltods beobachtet werden konnten, sondern vielmehr autophagischer Zelltod festgestellt werden konnte, lässt trotz der Überschneidungen der Mechanismen eine abweichende Funktion von RasGAP in *Drosophila* vermuten. Dieser Zusammenhang soll in den abschließenden Teilen dieser Arbeit mit Bezug auf die erhaltenen Ergebnisse diskutiert werden.

4.5. RasGAP und Autophagie: Genetische Interaktionen von RasGAP mit PI3K/Akt/TOR und S6K

4.5.1. Zusammenhänge zwischen RasGAP und Akt

Nicht nur die Tatsache, dass in den Neuronen von *vap* Fliegen morphologische Merkmale für Autophagie festgestellt wurden, weist auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Mutation im *RasGAP* Gen und diesem zellulären Mechanismus hin. Auch die Identifizierung der Akt Kinase als Interaktionspartner von RasGAP in einem Yeast Two Hybrid Screen (Yue *et al.*, 2004) kann als Hinweis auf einen solchen Zusammenhang gedeutet werden, denn Akt besitzt eine Rolle bei der Regulation der Autophagie (Übersichtsartikel Wullschleger *et al.*, 2006). In der folgenden Abbildung ist ein hypothetisches Modell der Rolle von RasGAP im PI3K/Akt/TOR Signalweg und im Zusammenhang mit der Autophagie dargestellt (Abb. 40):

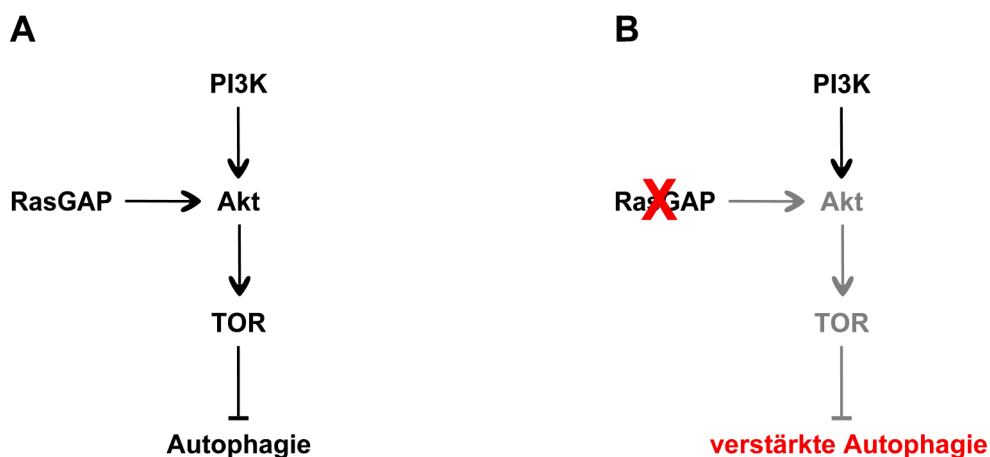


Abb. 40: Hypothetisches Modell zur Funktion von RasGAP im PI3K/Akt/TOR Signalweg und dadurch in der Regulation der Autophagie.

Autophagie wird in den Zellen über eine Signalkaskade, welche PI3K, Akt und TOR als wesentliche Faktoren beinhaltet, reguliert; weitere Faktoren und Zwischenschritte wurden der Einfachheit halber in diesem Schema vernachlässigt, eine genauere Darstellung des Signalweges findet sich in Abb. 8. Im „Normalfall“ ist in den Zellen nur ein geringes Level an Autophagie vorhanden, da dieser Vorgang von TOR gehemmt wird; TOR selbst wird dabei von Akt aktiviert, welche wiederum von der PI3K und auch von RasGAP aktiviert werden kann (A). Durch den Funktionsverlust von RasGAP in den *vap* Mutanten kommt es zu einer verringerten Aktivierung der Akt und dadurch von TOR, so dass der hemmende Einfluss auf die Autophagie wegfällt, wodurch diese in einem möglicherweise für die Zellen schädlichen Umfang stattfindet (B).

Vereinfacht dargestellt, hat RasGAP, wie von Yue *et al.* (2004) festgestellt, „im Normalfall“ einen aktivierenden Einfluss auf die Akt (welche auch durch die PI3K aktiviert werden kann). Akt wiederum aktiviert TOR, welches die Autophagie inhibiert (Abb. 40A). Durch den Funktionsverlust von RasGAP in *vap* Mutanten kommt es zu einer verringerten Aktivierung der Akt, wodurch auch TOR weniger aktiv ist und die hemmende Wirkung auf die Autophagie entfällt (Abb. 40B). Durch die daraus resultierende übermäßige Aktivierung der Autophagie könnte der Zelltod der Neuronen verursacht werden.

Leider waren die Ergebnisse genetischer Interaktionsversuche mit verschiedenen *Akt* Konstrukten im Zusammenhang mit dem *vap* Neurodegenerations-Phänotyp nicht eindeutig. Zwar kann neuronale Expression einer konstitutiv membrangebundenen und damit aktiven Form der Akt den Phänotyp verbessern, was darauf hinweist, dass durch das Konstrukt das Fehlen der Aktivierung von Akt durch RasGAP kompensiert werden kann. Jedoch hat Überexpression eines *RNAi* Konstruktes für die Akt denselben oder einen sogar noch stärkeren Effekt. Dass dies ein spezifischer Effekt ist und nicht einfach bei Überexpression egal welchen Konstruktes eine Verbesserung des Phänotyps eintritt, dafür spricht die beobachtete Verschlechterung bei Überexpression der *Akt* cDNA sowie die Tatsache, dass die Effekte auch jeweils in beiden *vap* Allelen in derselben Richtung zum Ausdruck kommen.

Über die Aussagekraft der Ergebnisse mit diesen Konstrukten kann jedoch diskutiert werden: der verschlechternde Effekt der Expression der *Akt* cDNA könnte dadurch erklärt werden, dass eine zu große Menge von Akt, welche nicht durch RasGAP aktiviert werden kann, aus ungeklärten Gründen schädlich für die Zellen sein könnte. Der Effekt des *UAS-Akt-RNAi* Konstruktes muss in der Zusammenschau mit den Ergebnissen der weiteren Versuche mit *RNAi* Konstrukten betrachtet werden: auch für das *UAS-Crk-RNAi* Konstrukt (Diskussion hierzu siehe Abschnitt 4.3.3.) sowie für *UAS-Dp110-RNAi* wurden positive Effekte der Überexpression beobachtet. Während dies für Crk der Erwartung entsprach, war für Dp110 so wie für Akt ein negativer Einfluss erwartet worden. Das Ergebnis mit *UAS-Crk-RNAi* muss insofern mit Vorsicht interpretiert werden, als auch das *UAS-Crk* Konstrukt eine Verbesserung verursacht, was eine spezifische Interaktion wiederum in Frage stellt. Man könnte spekulieren, dass generell durch die *RNAi* in den Neuronen ein Überlebensmechanismus aktiviert wird, der zufällig dem untersuchten Akt *survival* Signalweg entspricht, so dass die *RNAi* Konstrukte stets zu einer Verbesserung des *vap* Neurodegenerations-Phänotyps führen.

Vernachlässigt man also aufgrund dieser Argumente die Ergebnisse aus den *RNAi*-Versuchen, spricht der beschriebene positive Effekt der Überexpression von *UAS-Dakt^{myr}* dafür, dass Akt tatsächlich eine Rolle im Zusammenhang mit der Neurodegeneration in *vap* spielt. Um dies genauer zu charakterisieren, wurden am Lehrstuhl Versuche durchgeführt, in denen mit Hilfe von Western Blots gegen die aktive, phosphorylierte Form der Akt ihre Aktivierung in *vap* Fliegen untersucht werden sollte. Die Ergebnisse waren nicht ganz eindeutig, deuten aber darauf hin, dass tatsächlich die Aktivierung der Akt in Fliegen mit mutiertem *RasGAP* Gen gegenüber wildtypischen Tieren vermindert ist (Kalteis, 2008). Untersucht werden müsste noch, ob Expression des *UAS-Dakt^{myr}* Konstruktes diesen Effekt wieder aufheben kann, und ob sich auch Unterschiede im Autophagie-Level beobachten lassen. Im Hinblick auf die funktionelle Analyse wäre es interessant, den Einfluss der Expression der verschiedenen *UAS-RasGAP* Konstrukte auf Aktivierung von Akt und Autophagie im *vap* Hintergrund zu untersuchen.

4.5.2. Zusammenhänge zwischen RasGAP und weiteren Elementen des Signalweges

Die Ergebnisse der Untersuchung genetischer Interaktionen weiterer Elemente des Akt Signalweges mit *RasGAP* stützen die Vermutung einer Beteiligung dieses Weges an der Entstehung der Neurodegeneration. Geht man davon aus, dass für *UAS-Dp110-RNAi* gilt, dass die wider erwarten positive Wirkung seiner neuronalen Überexpression wie oben erklärt auf einen allgemeinen Überlebensmechanismus zurückzuführen ist, so spricht die Tatsache, dass die Überexpression des *UAS-Dp110* Konstruktes zu einer Verbesserung des Phänotyps führen kann, dafür, dass eine erhöhte Aktivierung der Akt Aktivität durch Überexpression dieses die Akt aktivierenden Enzyms den Ausfall von *RasGAP* kompensieren kann.

Auch ein stromabwärts vom vermuteten Angriffspunkt von *RasGAP* im Signalweg gelegenes Element kann bei Überexpression den Phänotyp verbessern: neuronale Expression von *UAS-TOR* vermindert die Vakuolisierung. Die TOR Kinase ist ein negativer Regulator der Autophagie stromabwärts von Akt; Erhöhung seiner Aktivität durch Erhöhung der Gendosis kann die in *vap* eventuell fehlende oder verminderte Aktivierung von Akt kompensieren. Allerdings verbessert auch ein angeblich dominant negatives Konstrukt den Phänotyp. Es gibt jedoch Hinweise aus der Literatur, dass Überexpression der beiden Konstrukte in manchen Zusammenhängen tatsächlich dieselbe Wirkung haben kann; die genaue Menge von TOR im Verhältnis zu weiteren Faktoren scheint entscheidend zu sein (Henning & Neufeld, 2002).

Neben der Autophagie werden auch Proteinsynthese und Stoffwechsel von TOR reguliert, und zwar über die S6K (siehe Abb. 8). Die Ergebnisse aus der Untersuchung der genetischen Interaktion von *vap* mit der S6K zeigen einen Zusammenhang mit dem Neurodegenerations-Phänotyp: neuronale Expression der konstitutiv aktiven Form besitzt einen positiven Einfluss, Expression einer dominant negativen Form einen negativen. Dieser Befund spricht für eine tatsächliche Beteiligung von *RasGAP* an den beschriebenen Vorgängen. Das in sich konsistente Ergebnis aus diesem Versuch zeigt im übrigen, dass man den Ergebnissen aus Versuchen mit gut getesteten dominant negativen Konstrukten eher Vertrauen schenken kann als solchen mit den bislang recht wenig untersuchten *RNAi* Konstrukten.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse aus den Untersuchungen genetischer Interaktionen der *vap* Mutation mit Elementen des Akt Signalweges für eine Beteiligung des Signalweges in der vermuteten Art und Weise an der Entstehung des Neurodegenerations-Phänotyps, obwohl natürlich weitere Versuche nötig wären, um diesen Befund abzusichern.

Die im folgenden diskutierten Ergebnisse weiterer im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie zusätzlich am Lehrstuhl durchgeführter Versuche lieferten Hinweise, die die Vermutung einer entscheidenden Rolle der Autophagie in *vap* stützen.

4.6. RasGAP und Autophagie: Genetische Interaktion von *vap*¹ mit *car*¹

In den Neuronen von *vap*¹ Fliegen kommt es zu einer stark erhöhten Anzahl autophagischer Vesikel, welche in *vap*² Fliegen nicht in diesem Maß zu beobachten ist. Die Tiere sterben außerdem früher. Ebenso setzt die Neurodegeneration früher ein, auch wenn sie sich, wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnte, nicht so stark verschlechtert wie die in *vap*² Fliegen. Diese Unterschiede können zum einen durch eine stärkere Auswirkung der *vap*¹ Mutation auf die Expression des Proteins erklärt werden, wie sie das Ergebnis eines Western Blots zeigte (siehe Abb. 3). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre das Vorhandensein weiterer Mutationen im *vap*¹ Hintergrund. Der *vap*¹ Stamm trägt auf dem ersten Chromosom den Augenfarbenmarker *carnation*. Dem von diesem Gen codierten Protein wird neueren Erkenntnissen zufolge auch eine Funktion bei der Vesikelverschmelzung im Rahmen der Autophagie zugeschrieben (Lindmo *et al.*, 2006). Deshalb wurde untersucht, welche Auswirkung eine Entfernung dieser Mutation aus dem genetischen Hintergrund von *vap*¹ besitzt.

Tatsächlich kann Wiederherstellung der wildtypischen Genfunktion die Lebensspanne der *vap*¹ Fliegen auf den gleichen Wert wie für das *vap*² Allel zurückbringen. Natürlich könnte dieser Effekt auf einen generellen schädlichen Einfluss einer weiteren Mutation in einem bereits durch eine Mutation geschwächten Tier zurückzuführen sein. Allerdings zeigten *carnation* Mutanten im hier durchgeführten Versuch keine verkürzte Lebensspanne; der lebensverkürzende Effekt ist nur im Zusammenspiel mit der *vap* Mutation zu beobachten, was für eine gewisse Spezifität spricht.

Noch deutlicher für einen funktionellen Zusammenhang sprechen die Ergebnisse der Untersuchungen über die Auswirkung der *car*¹ Mutation auf Neurodegeneration und ultrastrukturelle Befunde in *vap*¹. Entfernung der *car*¹ Mutation verbessert den Neurodegenerations-Phänotyp von *vap*¹ Fliegen; dadurch scheint eine Rolle dieser Mutation in Neuronen und im Zusammenhang mit *vap* sehr wahrscheinlich. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, dass die *carnation* Mutation auch tatsächlich einen Einfluss auf die Bildung der autophagischen Vesikel in *vap*¹ Fliegen hat: auch wenn eine Quantifizierung leider nicht möglich war, konnte in Neuronen von Fliegen mit beiden Mutationen eine verstärkte Anhäufung beobachtet werden.

Die Hypothese, dass der *vap* Phänotyp im Zusammenhang mit einer vermehrt induzierten Autophagie stehen könnte, erhält zudem durch die Ergebnisse weiterer am Lehrstuhl durchgeführter Versuche Unterstützung. Auch mehrere Veröffentlichungen sprechen für eine solche Verbindung. Die Befunde über eine Rolle von RasGAP und von durch RasGAP beeinflussten Signalwegen im Zusammenhang mit der Autophagie werden im folgenden Abschnitt abschließend zusammengefasst.

4.7. RasGAP und Autophagie: Allgemeine Zusammenhänge

vap Mutanten sterben unter Hungerbedingungen wesentlich schneller als wildtypische Tiere (Kalteis, 2008). Dies könnte erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass in *vap* Fliegen konstitutiv die Autophagie verstärkt aktiviert ist (siehe Abb. 40), so dass die zellulären Vorräte, die in wildtypischen Fliegen im Falle von Hungerbedingungen mobilisiert werden können, in den *vap* Fliegen bereits aufgebraucht sind. Die Tiere besitzen deshalb unter diesen Bedingungen keine Reserven und sterben schneller. Eine Analyse der in *vap* Mutanten vorhandenen Mengen an Speicherfetten zeigte auch tatsächlich eine Verminderung gegenüber wildtypischen Tieren (Kalteis, 2008).

Diese Ergebnisse bilden zusammen mit den morphologischen Merkmalen des Zelltods deutliche Hinweise, dass in *vap* Mutanten Probleme mit der Nährstoffversorgung der Zellen beziehungsweise deren „Einschätzung“ vorliegen könnten. Vielleicht „glauben“ die Neuronen in *vap* Fliegen aufgrund der Deregulation des Akt Signalweges (oder auch anderer Wege), dass sie zu wenig mit Nährstoffen versorgt werden und aktivieren deshalb die Autophagie, um unter diesen „gefühlten“ Hungerbedingungen zelluläre Reserven zu mobilisieren. Dieser Vorgang läuft jedoch irgendwann aus dem Ruder und die Zellen sterben.

Der Mechanismus des Zelltods in den *vap* Mutanten könnte so relativ eindeutig erklärt werden. Die Rolle verschiedener Signalwege im Zusammenhang mit dem Neurodegenerations-Phänotyp zu bestimmen, erweist sich dagegen als schwieriger: Elemente verschiedenster Signaltransduktionswege können die Stärke des Phänotyps beeinflussen.

Für den Einfluss von Elementen des Akt Signalweges konnten in der vorliegenden Arbeit Hinweise gefunden werden. In früheren Untersuchungen wurden genetische Interaktionen der *vap* Mutation mit Elementen des EGFR/Ras/MAPK Signalweges festgestellt. Auch diese Ergebnisse sprechen nicht gegen einen Zusammenhang der Mutation mit der Regulation der Autophagie: dieser Signalweg spielt hier ebenfalls eine Rolle (Chi *et al.*, 1999; Subramaniam & Unsicker, 2003). Zudem können auch Verbindungen zwischen den beiden Signalwegen (Akt und Ras) ausgemacht werden, die über RasGAP vermittelt werden (Sanchez-Margalet & Najib, 2001).

Weitere Faktoren, wie die Histon-Deacetylase Rpd3, zeigen einen Einfluss auf die Ausprägung der Neurodegeneration in *vap* Fliegen (Kiermayer, 2003); jedoch kann auch dieses Ergebnis, ebenso wie die Ergebnisse weiterer Analysen im Säuger-System, die eine Rolle von RasGAP in der Regulation des RNA Metabolismus oder des Zellwachstums andeuten (Parker *et al.*, 1996; Gigoux *et al.*, 2002; Lypowy *et al.*, 2005), mit der Regulation des Zellstoffwechsels in Verbindung gebracht werden.

Weiters sind auch Zusammenhänge zwischen verschiedenen Zytoskelett-Proteinen, zu denen einige der Interaktionspartner von RasGAP gehören, und der Autophagie bekannt (Simonsen *et al.*, 2007); Paxillin zum Beispiel, mit dem zusammen RasGAP in Komplexen gefunden werden kann (Hecker *et al.*, 2004), besitzt eine Verbindung mit Atg1 und Nährstoffmangel (Chen *et al.*, 2008).

RasGAP nimmt über seine Interaktionen vermutlich in vielen zellulären Signaltransduktionsvorgängen, vielleicht auch auf jeweils mehreren Ebenen, eine regulatorische Funktion ein. Diese Wege können jeweils mit der Regulation der Autophagie beziehungsweise des Zellstoffwechsels in Verbindung gebracht werden. Die Mutation im *RasGAP* Gen verschiebt die Balance dieser miteinander verschalteten Signalwege und führt zur Deregulation vermutlich nicht nur eines, sondern mehrerer Wege. Eingriff in die Balance durch Manipulation der Gendosis von Elementen verschiedener Wege kann diesen Effekt teilweise ausgleichen, teilweise wird der Effekt verschlechtert. Vermutlich können bestimmte Einflüsse durch weitere Elemente kompensiert werden. All dies führt möglicherweise, wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe legen, zu einer Störung der Autophagie, die schließlich den Tod der Zellen verursacht. Eine wirklich eindeutige „Schuldzuweisung“ an einen bestimmten zellulären Signaltransduktionsweg für die Auslösung des *vap* Phänotyps wird vermutlich schwierig bleiben. Die durch die zahlreichen Versuche gewonnenen Hinweise auf betroffene Wege erlauben aber einen Einblick in die faszinierende Komplexität der Regulation zellulärer Vorgänge.

ZUSAMMENFASSUNG

Mutationen im *RasGAP* Gen der Taufliege *Drosophila melanogaster* verursachen neben anderen Phänotypen wie Verkürzung der Lebensspanne und Verhaltensstörungen die Entstehung altersabhängiger Neurodegeneration. Wie eine funktionelle Analyse ergab, ist für die Entstehung dieses *vap* (*vacuolar peduncle*) Phänotyps der **N-terminale Teil** des in den Fliegen betroffenen RasGAP Proteins von besonderer Bedeutung. In diesem Teil von RasGAP sind für Protein/Protein Interaktionen zuständige Domänen zu finden, was eine Bedeutung solcher Interaktionen für die korrekte Funktion von RasGAP in den Neuronen nahe legt.

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern von RasGAP aus adulten Köpfen von *Drosophila melanogaster* wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein Yeast Two Hybrid Screen durchgeführt; es konnten jedoch **keine Interaktionspartner identifiziert** werden. Dies kann zum einen durch methodische Probleme wie eine möglicherweise aufgrund mehrerer Amplifikationsschritte nicht mehr vollständig repräsentative Bibliothek oder generelle Schwierigkeiten der Detektion schwacher Interaktionen mit dem verwendeten System begründet werden. Zum anderen findet der Großteil der bisher identifizierten, und damit möglicherweise überhaupt aller, Interaktionen von RasGAP über seine SH2 Domänen statt; solche Phosphorylierungs-abhängigen Interaktionen können mit dem verwendeten System jedoch grundsätzlich nicht detektiert werden.

Ein bekannter Interaktionspartner der SH2 Domänen von RasGAP ist der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Ebenfalls bekannt ist eine quantitative Konkurrenz um Bindestellen in diesem Rezeptor von RasGAP mit dem Adapter-Protein Crk. Um Auswirkungen der Störung des Gleichgewichts der Bindung dieser beiden Proteine zu untersuchen, wurden zur Beeinflussung der Genexpression von *Crk* *UAS-Crk* und *UAS-Crk-RNAi* Fliegenlinien hergestellt. Die Funktionalität der Konstrukte konnte gezeigt werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zur Beeinflussung der Expression in Neuronen lassen jedoch **keine eindeutige Aussage zu einer genetischen Interaktion von RasGAP mit Crk** in Bezug auf den Neurodegenerations-Phänotyp zu.

Eine weitere denkbare Erklärung für den Tod von Neuronen in *vap* Fliegen wäre das Fehlen des möglicherweise als genereller Überlebensfaktor benötigten N-terminalen Teils von RasGAP. Um das zu untersuchen, wurde ein Modellsystem entwickelt, mit dem in *Drosophila melanogaster* Apoptose induziert und eine eventuelle Rettung durch Expression bestimmter Faktoren beobachtet werden kann. Expression des N-terminalen Teils von *Drosophila melanogaster* RasGAP konnte jedoch den induzierten Zelltod nicht verhindern, was **gegen eine Rolle als genereller Überlebensfaktor** spricht. Insgesamt ist ein Zusammenhang der *vap* Mutation mit apoptotischen Vorgängen unwahrscheinlich. Hingegen sprechen verschiedene Hinweise für eine Rolle der Autophagie.

Die Ergebnisse der Untersuchung genetischer Interaktionen deuten auf einen möglichen **Einfluss verschiedener Elemente des PI3K/Akt/TOR Signalweges**, welcher für die Regulation der Autophagie wichtig ist, auf den Neurodegenerations-Phänotyp in *vap* Mutanten hin.

Zudem konnte eine **genetische Interaktion von *vap*¹ mit der *car*¹ Mutation**, der eine Bedeutung bei der Vesikelverschmelzung im Laufe der Autophagie zugeschrieben wird, in Bezug auf die Lebensspanne der Tiere sowie auf den Neurodegenerations-Phänotyp nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich ein Einfluss der *car*¹ Mutation auf das Auftreten autophagischer Vesikel in den Neuronen von *vap* Fliegen.

Insgesamt kann aufgrund der Ergebnisse aus den beiden zuletzt beschriebenen Teilen der vorliegenden Arbeit sowie weiterer im Anschluss daran am Lehrstuhl durchgeführter Versuche und verschiedener Hinweise aus der Literatur eine **Beteiligung autophagischer Prozesse an der Entstehung des Neurodegenerations-Phänotyps in *Drosophila melanogaster vap* Mutanten** angenommen werden. Vermutlich haben verschiedene der zahlreichen Interaktionen von RasGAP in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen einen Einfluss auf die Regulation dieser Vorgänge.

SEQUENZ DES *UAS-Crk-RNAi* KONSTRUKTES

```

ctctccggatccaagcttgcattgcctgcaggtcggagtagtctcctccgagcggagtagtctg
tctcctccgagcggagtagtctcctccgagcggagtagtctcctccgagcggagtagtctcct
ccgagcggagactctagcgagcgccggagtataaatagaggcgcttcgtctacggagcgac
aattcaattcaaacaagcaaatggaacacgctcgctaagcgaagctaagcaataaacaag
cgcagctgaacaagctaaacaatctgcagtaaagtgaagttaaagtgaatcaattaaaag
taaccagcaaccaagtaaatcaactgcaactactgaaatctgccaagaagtaattattgaa
tacaagaagagaactctgaataggggaattgggaattcgttaacAGATCTctgcgtgtagaa
gggtggaaaaagtaataggaaagttcgatttcgattggcagcgatcaagatgatttaccttt
tcaaagaggtgaagttttaacaatagttcgaaaagacgaggatcaatgggtggactgcgcgt
aactcctcggggaaaattgggtcaataaccggttccttatatacaacagtatgacgattata
tggatgaagatgctattgataaaaacgaaccttcatttcgggatctagcaatgtatttga
aagtactcttaaaaggacagatttaaatcgaaaactacctgcataacgcccgcgtaaaacag
tcaaggggtccctaacgcatacagataagactgcattaaaattggaaataggtagacattatta
aagtcactaaaacaacattaatgggcaatgggagggagaattaaatggaaaaaatggtca
tttcccttcacgcacggtgaatCTCGAGactagtgacctaggtgagtttctattcgcagtc
ggctgatctgtgtgaaatcttaataaagggccaattaccaatttgaaactcaGCTAGAat
tcaacgtgcgtgaagggaaaatgaccattttttccatttaattctcctcccattgcccatt
taatgtttgttttagtgactttaataatgtcacctatttccaattttaatgcagtccttatc
gtatgcgttagggaccttgactgttttacgcgggcgtagtcaggtagttttcgatttaa
tctgtccttttaagagtagtcttcaatacattgctagatcccgaaatggaaggttcgtttt
tatcaatagcatcttcatccatataatcgtcactactgttgatatatagggaaccggatttg
accaattttcccggaggagtacgcgcagtcaccattgatcctcgtcttttcgaactatt
gttaaaacttcacctctttgaaaaggtaaatcatcttgatcgctgccaacgaaatcgaact
ttcctattactttttccaccttctacacgcagtcctagatcgaatcACTAGCctacgcgttc
tagagg

```

Abb. A2: Sequenz des *UAS-Crk-RNAi* Konstruktes.

Abgebildet sind nur die relevanten Teile des Konstruktes in 5'→3' Richtung; der verwendete pWIZ-Vektor basiert auf dem pUAST-Vektor von Brand & Perrimon (Lee & Carthew, 2003). In rot sind die fünf optimierten GAL4 Bindestellen und in orange die *hsp70* TATA Box mit Transkriptionsstart aus pUAST dargestellt. In dunkelrot ist das im pWIZ-Vektor enthaltene *white* Intron abgebildet. Die Sequenz des auf den beiden Seiten des Introns in entgegengesetzter Orientierung eingebrachten Abschnitts aus *Crk* ist jeweils grün markiert. Großbuchstaben stellen die für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzym-Schnittstellen (BglII A↓GATCT und XhoI C↓TCGAG) beziehungsweise die bei der Klonierung entstandenen gemischten Sequenzen der ligationskompatiblen Schnittstellen (GCTAGA aus NheI G↓CTAGC und XbaI T↓CTAGA sowie ACTAGC aus SpeI A↓CTAGT und NheI G↓CTAGC) dar.

STATISTISCHE AUSWERTUNG DES PHOTOTAXIS-PHÄNOTYPS

Genotyp (vereinfacht; siehe Abb. 15)	<i>CantonS</i>	<i>vap2;UAS</i> <i>-RasGAP</i>	<i>vap2;UAS</i> <i>-17.30</i>	<i>vap2;UAS</i> <i>-22.2</i>	<i>vap2;UAS</i> <i>-N15.1</i>	<i>vap2;UAS</i> <i>-C75.6</i>	<i>vap2;UAS</i> <i>-B111.4</i>
P-Wert (Test gegen <i>vap2</i>)	0,0004	0,0149	0,4052	0,059	0,024	0,0227	0,0017
Signifikanzniveau ($P < 0,05$)	***	*	ns	ns	*	*	**

Tab. A1: Statistische Auswertung der Ergebnisse aus dem Phototaxis-Versuch (zu Abb. 15).

LITERATURVERZEICHNIS

- Akassoglou K, Malester B, Xu J, Tessarollo L, Rosenbluth J, Chao MV.**
Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 6;101(14):5075-80. Epub 2004 Mar 29.
- Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC.**
Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting.
J Biol Chem. 1998 May 1;273(18):11177-82.
- Aplin AC, Kaufman TC.**
Homeotic transformation of legs to mouthparts by proboscipedia expression in *Drosophila* imaginal discs.
Mech Dev. 1997 Feb;62(1):51-60.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.**
Current Protocols in Molecular Biology.
John Wiley & Sons Inc, New York 1987-2006.
- Baehrecke EH.**
Autophagic programmed cell death in *Drosophila*.
Cell Death Differ. 2003 Sep;10(9):940-5. Review.
- Bainbridge SP, Bownes M.**
Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*.
J Embryol Exp Morphol. 1981 Dec;66:57-80.
- Barcelo H, Stewart MJ.**
Altering *Drosophila* S6 kinase activity is consistent with a role for S6 kinase in growth.
Genesis. 2002 Sep-Oct;34(1-2):83-5.
- Benzer S.**
Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1967 Sep;58(3):1112-1119.
- Bernards A.**
GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*.
Biochim Biophys Acta. 2003 Mar 17;1603(2):47-82. Review.
- Birge RB, Fajardo JE, Mayer BJ, Hanafusa H.**
Tyrosine-phosphorylated epidermal growth factor receptor and cellular p130 provide high affinity binding substrates to analyze Crk-phosphotyrosine-dependent interactions in vitro.
J Biol Chem. 1992 May 25;267(15):10588-95.
- Birnboim HC, Doly J.**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Botella JA, Kretschmar D, Kiermayer C, Feldmann P, Hughes DA, Schneuwly S.**
Deregulation of the Egrf/Ras signaling pathway induces age-related brain degeneration in the *Drosophila* mutant vap.
Mol Biol Cell. 2003 Jan;14(1):241-50.
- Brand AH, Perrimon N.**
Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.
Development. 1993 Jun;118(2):401-15.
- Bryant SS, Mitchell AL, Collins F, Miao W, Marshall M, Jove R.**
N-terminal sequences contained in the Src homology 2 and 3 domains of p120 GTPase-activating protein are required for full catalytic activity toward Ras.
J Biol Chem. 1996 Mar 1;271(9):5195-9.
- Cailliau K, Browaeys-Poly E, Vilain JP.**
RasGAP is involved in signal transduction triggered by FGF1 in *Xenopus* oocytes expressing FGFR1.
FEBS Lett. 2001 May 11;496(2-3):161-5.
- Capdevila J., Guerrero I.**
Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings.
EMBO J. 1994;13(19): 4459--4468.
- Cavaliere V, Donati A, Hsouna A, Hsu T, Gargiulo G.**
dAkt kinase controls follicle cell size during *Drosophila* oogenesis.
Dev Dyn. 2005 Mar;232(3):845-54.
- Celotto AM, Palladino MJ.**
Drosophila: a "model" model system to study neurodegeneration.
Mol Interv. 2005 Oct;5(5):292-303. Review.

Chen GC, Lee JY, Tang HW, Debnath J, Thomas SM, Settleman J.

Genetic interactions between *Drosophila melanogaster* Atg1 and paxillin reveal a role for paxillin in autophagosome formation.

Autophagy. 2008 Jan-Feb;4(1):37-45. Epub 2007 Oct 8.

Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, Fujita H, Yoshida M, Chen W, Asai A, Himeno M, Yokoyama S, Kuchino Y.

Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells.

Oncogene. 1999 Apr 1;18(13):2281-90.

Clarke PG.

Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms.

Anat Embryol (Berl). 1990;181(3):195-213. Review.

Cleghon V, Feldmann P, Ghiglione C, Copeland TD, Perrimon N, Hughes DA, Morrison DK.

Opposing actions of CSW and RasGAP modulate the strength of Torso RTK signaling in the *Drosophila* terminal pathway.

Mol Cell. 1998 Dec;2(6):719-27.

Codogno P, Meijer AJ.

Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death.

Cell Death Differ. 2005 Nov;12 Suppl 2:1509-18. Review.

Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, et al.

Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase.

Science. 1993 Aug 20;261(5124):1047-51.

Di Cristofano A, Carpino N, Dunant N, Friedland G, Kobayashi R, Strife A, Wisniewski D, Clarkson B, Pandolfi PP, Resh MD.

Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins.

J Biol Chem. 1998 Feb 27;273(9):4827-30.

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ.

A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*.

Nature. 2007 Jul 12;448(7150):151-6.

Drugan JK, Rogers-Graham K, Gilmer T, Campbell S, Clark GJ.

The Ras/p120 GTPase-activating protein (GAP) interaction is regulated by the p120 GAP pleckstrin homology domain.

J Biol Chem. 2000 Nov 10;275(45):35021-7.

Duchesne M, Schweighoffer F, Parker F, Clerc F, Frobert Y, Thang MN, Tocqué B.

Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling.

Science. 1993 Jan 22;259(5094):525-8.

Dupont H, Blancq M.

Formation of complexes involving RasGAP and p190 RhoGAP during morphogenetic events of the gastrulation in *Xenopus*.

Eur J Biochem. 1999 Oct;265(2):530-8.

Eisenmenger M, Pötzsch O, Sommer B.

Bevölkerung Deutschlands bis 2050 – 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006.

Ellis C, Moran M, McCormick F, Pawson T.

Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases.

Nature. 1990 Jan 25;343(6256):377-81.

Feany MB, Bender WW.

A *Drosophila* model of Parkinson's disease.

Nature. 2000 Mar 23;404(6776):394-8.

Feldmann P, Eicher EN, Leever SJ, Hafen E, Hughes DA.

Control of growth and differentiation by *Drosophila* RasGAP, a homolog of p120 Ras-GTPase-activating protein.

Mol Cell Biol. 1999 Mar;19(3):1928-37.

Feller SM.

Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles.

Oncogene. 2001 Oct 1;20(44):6348-71. Review.

Fields S, Song O.

A novel genetic system to detect protein-protein interactions.

Nature. 1989 Jul 20;340(6230):245-6.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.

Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Flybase Consortium.

Flybase.

<http://flybase.bio.indiana.edu/>

Formstecher E, Aresta S, Collura V, Hamburger A, Meil A, Trehin A, Reverdy C, Betin V, Maire S, Brun C, Jacq B, Arpin M, Bellaiche Y, Bellusci S, Benaroch P, Bornens M, Chanet R, Chavrier P, Delattre O, Doye V, Fehon R, Faye G, Galli T, Girault JA, Goud B, de Gunzburg J, Johannes L, Junier MP, Mirouse V, Mukherjee A, Papadopoulo D, Perez F, Plessis A, Rossé C, Saule S, Stoppa-Lyonnet D, Vincent A, White M, Legrain P, Wojcik J, Camonis J, Daviet L.

Protein interaction mapping: a Drosophila case study.

Genome Res. 2005 Mar;15(3):376-84. Epub 2005 Feb 14.**Freeman M.**

Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the Drosophila eye.

Cell. 1996 Nov 15;87(4):651-60.

Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, Capony JP, Tocque B, Tazi J.

A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability.

Mol Cell Biol. 1998 Jul;18(7):3956-65.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G.

Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.

Cell Death Differ. 2007 Jul;14(7):1237-43. Epub 2007 Apr 13. Review.**Giesecke A.**

Molekulare und funktionelle Analyse der Neurodegenerationsmutante vap in Drosophila melanogaster.

Diplomarbeit, 2002.

Gigoux V, L'Hoste S, Raynaud F, Camonis J, Garbay C.

Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins.

J Biol Chem. 2002 Jun 28;277(26):23742-6. Epub 2002 Apr 25.

Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF.

Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(7):2725-9.

Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioigne N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrola S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley RL Jr, White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J, Rothberg JM.

A protein interaction map of Drosophila melanogaster.

Science. 2003 Dec 5;302(5651):1727-36. Epub 2003 Nov 6.

Gloor GB, Engels WR.

Single fly DNA preps for PCR.

Dros. Inform. Ser. 1992; 71: 148-9.

Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ.

Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4078-83. Epub 2003 Mar 17.

Greeve I, Kretschmar D, Tschäpe JA, Beyn A, Brellinger C, Schweizer M, Nitsch RM, Reifegerste R.

Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic Drosophila.

J Neurosci. 2004 Apr 21;24(16):3899-906.

Grewal T, Enrich C.

Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex.

Bioessays. 2006 Dec;28(12):1211-20. Review.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N.

Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice.

Nature. 2006 Jun 15;441(7095):885-9. Epub 2006 Apr 19.

Hay BA, Guo M.

Caspase-dependent cell death in Drosophila.

Annu Rev Cell Dev Biol. 2006;22:623-50. Review.

Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM.

Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death.

Cell. 1995 Dec 29;83(7):1253-62.

Hecker TP, Ding Q, Rege TA, Hanks SK, Gladson CL.

Overexpression of FAK promotes Ras activity through the formation of a FAK/p120RasGAP complex in malignant astrocytoma cells.
Oncogene. 2004 May 13;23(22):3962-71.

Heisenberg M, Böhl K.

Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means.
Z. Naturforsch. 1979; 34:143-147.

Hennig KM, Neufeld TP.

Inhibition of cellular growth and proliferation by dTOR overexpression in *Drosophila*.
Genesis. 2002 Sep-Oct;34(1-2):107-10.

Hu KQ, Settleman J.

Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation.
EMBO J. 1997 Feb 3;16(3):473-83.

Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL.

Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons.
Neuron. 1998 Sep;21(3):633-42.

Jahani-Asl A, Basak A, Tsang BK.

Caspase-3-mediated cleavage of Akt: involvement of non-consensus sites and influence of phosphorylation.
FEBS Lett. 2007 Jun 26;581(16):2883-8. Epub 2007 May 24.

Juhász G, Erdi B, Sass M, Neufeld TP.

Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*.
Genes Dev. 2007 Dec 1;21(23):3061-6.

Kalteis N.

Untersuchungen zur Funktion des PI3-Kinase/TOR-Signalweges in der vap Mutante.
Diplomarbeit, 2008.

Katayama H, Brinkley WR, Sen S.

The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis.
Cancer Metastasis Rev. 2003 Dec;22(4):451-64. Review.

Kazlauskas A, Ellis C, Pawson T, Cooper JA.

Binding of GAP to activated PDGF receptors.
Science. 1990 Mar 30;247(4950):1578-81.

Kiermayer C.

Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Neurodegeneration in der RasGAP (vap) Mutante in *Drosophila melanogaster*.
Dissertation, 2003.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N.

Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.
Nature. 1998 Apr 9;392(6676):605-8.

Koehler JA, Moran MF.

RACK1, a protein kinase C scaffolding protein, interacts with the PH domain of p120GAP.
Biochem Biophys Res Commun. 2001 May 18;283(4):888-95.

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K.

Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice.
Nature. 2006 Jun 15;441(7095):880-4. Epub 2006 Apr 19.

Kretschmar D, Hasan G, Sharma S, Heisenberg M, Benzer S.

The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*.
J Neurosci. 1997 Oct 1;17(19):7425-32.

Kretschmar D.

Neurodegenerative mutants in *Drosophila*: a means to identify genes and mechanisms involved in human diseases?
Invert Neurosci. 2005 Nov;5(3-4):97-109. Epub 2005 Oct 24. Review.

Leblanc V, Delumeau I, Tocqué B.

Ras-GTPase activating protein inhibition specifically induces apoptosis of tumour cells.
Oncogene. 1999 Aug 26;18(34):4884-9.

Leblanc V, Tocque B, Delumeau I.

Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain.
Mol Cell Biol. 1998 Sep;18(9):5567-78.

Lee YS, Carthew RW.

Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers.
Methods. 2003 Aug;30(4):322-9.

Leevers SJ, Weinkove D, MacDougall LK, Hafen E, Waterfield MD.

The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth.
EMBO J. 1996 Dec 2;15(23):6584-94.

Lemmon MA.

Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides.
Biochem Soc Trans. 2004 Nov;32(Pt 5):707-11. Review.

Levine B, Yuan J.

Autophagy in cell death: an innocent convict?
J Clin Invest. 2005 Oct;115(10):2679-88. Review. Erratum in: *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3293.

Lindmo K, Simonsen A, Brech A, Finley K, Rusten TE, Stenmark H.

A dual function for Deep orange in programmed autophagy in the Drosophila melanogaster fat body.
Exp Cell Res. 2006 Jul 1;312(11):2018-27. Epub 2006 Apr 4.

Lindsley DM, Zimm GG.

The genome of Drosophila melanogaster.
Acad. Press, San Diego 1992.

Liu K, Li G.

Catalytic domain of the p120 Ras GAP binds to RAb5 and stimulates its GTPase activity.
J Biol Chem. 1998 Apr 24;273(17):10087-90.

Liu YF, Deth RC, Devys D.

SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes.
J Biol Chem. 1997 Mar 28;272(13):8121-4.

Lowy DR, Willumsen BM.

Function and regulation of ras.
Annu Rev Biochem. 1993;62:851-91. Review.

Lypowy J, Chen IY, Abdellatif M.

An alliance between Ras GTPase-activating protein, filamin C, and Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein regulates myocyte growth.
J Biol Chem. 2005 Jul 8;280(27):25717-28. Epub 2005 May 9.

Machida K, Mayer BJ.

The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target.
Biochim Biophys Acta. 2005 Feb 14;1747(1):1-25. Epub 2004 Nov 19. Review.

Mainx F.

Analyse der Genwirkung durch Faktorenkombination. Versuche mit den Augenfarbenfaktoren von Drosophila melanogaster.
Z. indukt. Abstamm.- u. VererbLehre 1938;75: 256--276.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G.

Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):741-52. Review.

Mandel M, Higa A.

Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.
J Mol Biol. 1970 Oct 14;53(1):159-62.

Margolis B, Li N, Koch A, Mohammadi M, Hurwitz DR, Zilberstein A, Ullrich A, Pawson T, Schlessinger J.

The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma.
EMBO J. 1990 Dec;9(13):4375-80.

Mark M.

Entwicklung eines Two-Hybrid Systems in Hefe für das Drosophila vap-Gen.
Diplomarbeit, 2005.

Marsh JL, Thompson LM.

Drosophila in the study of neurodegenerative disease.
Neuron. 2006 Oct 5;52(1):169-78. Review.

Mayer BJ.

SH3 domains: complexity in moderation.
J Cell Sci. 2001 Apr;114(Pt 7):1253-63. Review.

McDonnell MW, Simon MN, Studier FW.

Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J Mol Biol. 1977 Feb 15;110(1):119-46.

- Mühlig-Versen M, da Cruz AB, Tschäpe JA, Moser M, Büttner R, Athenstaedt K, Glynn P, Kretzschmar D.**
Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila*.
J Neurosci. 2005 Mar 16;25(11):2865-73.
- Mutsuddi M, Nambu JR.**
Neural disease: *Drosophila* degenerates for a good cause.
Curr Biol. 1998 Nov 5;8(22):R809-11. Review.
- Parker F, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighoffer F, Tocque B.**
A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein.
Mol Cell Biol. 1996 Jun;16(6):2561-9.
- Phillips JP, Tainer JA, Getzoff ED, Boulianne GL, Kirby K, Hilliker AJ.**
Subunit-destabilizing mutations in *Drosophila* copper/zinc superoxide dismutase: neuropathology and a model of dimer dysequilibrium.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 12;92(19):8574-8.
- Polaina J, Adam AC.**
A fast procedure for yeast DNA purification.
Nucleic Acids Res. 1991 Oct 11;19(19):5443.
- Pomerance M, Thang MN, Tocque B, Pierre M.**
The Ras-GTPase-activating protein SH3 domain is required for Cdc2 activation and mos induction by oncogenic Ras in *Xenopus* oocytes independently of mitogen-activated protein kinase activation.
Mol Cell Biol. 1996 Jun;16(6):3179-86.
- Pronk GJ, Medema RH, Burgering BM, Clark R, McCormick F, Bos JL.**
Interaction between the p21ras GTPase activating protein and the insulin receptor.
J Biol Chem. 1992 Nov 25;267(33):24058-63.
- Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S.**
Ras oncogenes and their downstream targets.
Biochim Biophys Acta. 2007 Aug;1773(8):1177-95. Epub 2007 Jan 28. Review.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E.**
A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*.
Genome Res. 2001 Jun;11(6):1114-25.
- Reynolds ES.**
The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J Cell Biol. 1963 Apr;17:208-12.
- Robert Koch-Institut (Hrsg).**
Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
Robert Koch-Institut, Berlin 2006.
- Rubin GM, Spradling AC.**
Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors.
Science. 1982 Oct 22;218(4570):348-53.
- Rubinsztein DC.**
The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration.
Nature. 2006 Oct 19;443(7113):780-6. Review.
- Ruckerbauer S.**
Ein Hefe 2-Hybrid Screen mit dem *Drosophila* GABARAP Protein.
Diplomarbeit, 2006.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.**
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science. 1988 Jan 29; 239 (4839): 487-91.
- Sánchez-Margalet V, Najib S.**
Sam68 is a docking protein linking GAP and PI3K in insulin receptor signaling.
Mol Cell Endocrinol. 2001 Oct 25;183(1-2):113-21.
- Schiestl RH, Gietz RD.**
High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.
Curr Genet. 1989 Dec;16(5-6):339-46.
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP.**
Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body.
Dev Cell. 2004 Aug;7(2):167-78.

Shigekawa K, Dower WJ.

Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells.
Biotechniques. 1988 Sep;6(8):742-51.

Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD.

Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*.
Autophagy. 2008 Mar-Apr;4(2):176-84. Epub 2007 Nov 6.

Simonsen A, Cumming RC, Finley KD.

Linking lysosomal trafficking defects with changes in aging and stress response in *Drosophila*.
Autophagy. 2007 Sep-Oct;3(5):499-501. Epub 2007 Jun 20.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, et al.

SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences.
Cell. 1993 Mar 12;72(5):767-78.

Sriram V, Krishnan KS, Mayor S.

deep-orange and carnation define distinct stages in late endosomal biogenesis in *Drosophila melanogaster*.
J Cell Biol. 2003 May 12;161(3):593-607.

Staveley BE, Ruel L, Jin J, Stambolic V, Mastronardi FG, Heitzler P, Woodgett JR, Manoukian AS.

Genetic analysis of protein kinase B (AKT) in *Drosophila*.
Curr Biol. 1998 May 7;8(10):599-602.

Stefanis L.

Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury.
Neuroscientist. 2005 Feb;11(1):50-62. Review.

Subramaniam S, Unsicker K.

Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death.
Neuroscience. 2006;138(4):1055-65. Epub 2006 Jan 25. Review.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T.

Small GTP-binding proteins.
Physiol Rev. 2001 Jan;81(1):153-208. Review.

Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F.

Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras.
Cell Signal. 1997 Feb;9(2):153-8. Review.

United States National Library of Medicine

Medical Subject Headings (MeSH).
<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>

United States National Library of Medicine

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN.

Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.
Ann Hematol. 2005 Oct;84(10):627-39. Epub 2005 Jul 22. Review.

Ward RE, Evans J, Thummel CS.

Genetic modifier screens in *Drosophila* demonstrate a role for Rho1 signaling in ecdysone-triggered imaginal disc morphogenesis.
Genetics. 2003 Nov;165(3):1397-415.

Warrick JM, Paulson HL, Gray-Board GL, Bui QT, Fischbeck KH, Pittman RN, Bonini NM.

Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*.
Cell. 1998 Jun 12;93(6):939-49.

Wen LP, Madani K, Martin GA, Rosen GD.

Proteolytic cleavage of ras GTPase-activating protein during apoptosis.
Cell Death Differ. 1998 Sep;5(9):729-34.

Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB.

Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles.
Science. 2001 Jul 27;293(5530):711-4. Epub 2001 Jun 14.

Woodcock SA, Hughes DA.

p120 Ras GTPase-activating protein associates with fibroblast growth factor receptors in *Drosophila*.
Biochem J. 2004 Jun 15;380(Pt 3):767-74.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN.

TOR signaling in growth and metabolism.
Cell. 2006 Feb 10;124(3):471-84. Review.

Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM.

Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution.
Mol Cell Neurosci. 1999 Sep;14(3):180-98.

Yang JY, Michod D, Walicki J, Widmann C.

Surviving the kiss of death.
Biochem Pharmacol. 2004 Sep 15;68(6):1027-31. Review.

Yang JY, Walicki J, Michod D, Dubuis G, Widmann C.

Impaired Akt activity down-modulation, caspase-3 activation, and apoptosis in cells expressing a caspase-resistant mutant of RasGAP at position 157.
Mol Biol Cell. 2005 Aug;16(8):3511-20. Epub 2005 May 18.

Yang JY, Widmann C.

Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP.
Mol Cell Biol. 2001 Aug;21(16):5346-58.

Yue Y, Lypowy J, Hedhli N, Abdellatif M.

Ras GTPase-activating protein binds to Akt and is required for its activation.
J Biol Chem. 2004 Mar 26;279(13):12883-9. Epub 2004 Jan 5.

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1:	Phänotyp des adulten Gehirns der <i>vap</i> ² Mutante.	S. 17
Abb. 2:	Exon/Intron-Struktur des <i>RasGAP</i> Gens, <i>vap</i> Allele und Struktur des RasGAP Proteins im Wildtyp und in den <i>vap</i> Mutanten.	S. 18
Abb. 3:	Western Blot gegen das RasGAP Protein.	S. 19
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Regulation der Ras Aktivität.	S. 20
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Struktur von <i>Drosophila</i> RasGAP.	S. 21
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Spaltung von RasGAP durch Caspasen.	S. 25
Abb. 7:	Ablauf der Autophagie.	S. 26
Abb. 8:	Molekulare Mechanismen der Regulation der Autophagie.	S. 28
Abb. 9:	Ultrastrukturelle Analyse der Neuronen in <i>vap</i> Fliegen.	S. 31
Abb. 10:	Grundlage des Two Hybrid Systems.	S. 34
Abb. 11:	Durchführung der Interaktionstests.	S. 53
Abb. 12:	Kreuzungsschema für die ubiquitäre Expression von <i>UAS-RasGAP</i> in wildtypischen Fliegen.	S. 63
Abb. 13:	Schematische Darstellung der Proteine, die bei Expression verschiedener <i>UAS-RasGAP</i> cDNA Konstrukte entstehen.	S. 64
Abb. 14:	Phototaxis-Phänotyp von fünf Tage alten <i>vap</i> ² Fliegen.	S. 65
Abb. 15:	Beeinflussung des Phototaxis-Phänotyps von <i>vap</i> ² Fliegen durch neuronale Expression verschiedener <i>UAS</i> Konstrukte.	S. 66
Abb. 16:	Rescue des Neurodegenerations-Phänotyps von <i>vap</i> ² Fliegen durch neuronale Expression verschiedener <i>UAS</i> Konstrukte.	S. 68
Abb. 17:	Beeinflussung des Neurodegenerations-Phänotyps von <i>vap</i> ² Fliegen durch neuronale Expression verschiedener <i>UAS</i> Konstrukte.	S. 69
Abb. 18:	Durchführung eines Yeast Two Hybrid Screens zur Identifizierung bisher unbekannter Interaktionspartner eines Proteins X mit dem ProQuest™ Two Hybrid System von Invitrogen.	S. 71
Abb. 19:	Masterplatte und Ergebnisse von Interaktionstests.	S. 75
Abb. 20:	Semi-quantitative RT-PCR zur Überprüfung der Überexpression des <i>Crk</i> Gens bei <i>actin-GAL4</i> getriebener Expression von <i>UAS-Crk</i> .	S. 81
Abb. 21:	Der <i>bent tibia</i> Phänotyp von <i>UAS-Crk-RNAi</i> ubiquitär überexprimierenden Fliegen.	S. 82
Abb. 22:	Neurodegeneration von <i>vap</i> ² Fliegen bei neuronaler Expression von <i>UAS-Crk</i> oder <i>UAS-Crk-RNAi</i> .	S. 83
Abb. 23:	Beeinflussung des Neurodegenerations-Phänotyps von <i>vap</i> ² Fliegen durch neuronale Expression von <i>UAS-Crk</i> oder <i>UAS-Crk-RNAi</i> .	S. 84
Abb. 24:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ² mit <i>PI3K</i> .	S. 89
Abb. 25:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ¹ mit <i>PI3K</i> .	S. 90
Abb. 26:	Anteil vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Überexpression der katalytischen Untereinheit der PI3K im <i>vap</i> Hintergrund.	S. 91
Abb. 27:	Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis von <i>Dp110</i> im <i>vap</i> ² und <i>vap</i> ¹ Hintergrund.	S. 91
Abb. 28:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ² mit <i>Akt</i> .	S. 92
Abb. 29:	Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis beziehungsweise Aktivierung von <i>Akt</i> im <i>vap</i> ² und <i>vap</i> ¹ Hintergrund.	S. 93
Abb. 30:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ² mit <i>TOR</i> .	S. 94
Abb. 31:	Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis von <i>TOR</i> im <i>vap</i> ² und <i>vap</i> ¹ Hintergrund.	S. 94
Abb. 32:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ² mit <i>S6K</i> .	S. 95
Abb. 33:	Vergleich des relativen Anteils vakuolisierten Gehirngewebes in Lobula und Medulla bei Manipulation der Gendosis von <i>S6K</i> im <i>vap</i> ² und <i>vap</i> ¹ Hintergrund.	S. 96
Abb. 34:	Schematische Darstellung des gewünschten Rekombinationsereignisses zur Herstellung eines <i>vap</i> ¹ Stammes ohne <i>car</i> ¹ .	S. 97
Abb. 35:	Lebenserwartung verschiedener Fliegenstämme.	S. 98
Abb. 36:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ¹ mit <i>car</i> ¹ (Paraffinschnitte).	S. 99
Abb. 37:	Einfluss von <i>car</i> ¹ auf die Neurodegeneration in <i>vap</i> ¹ .	S. 100
Abb. 38:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ¹ mit <i>car</i> ¹ (Semidünnschnitte).	S. 101
Abb. 39:	Genetische Interaktion von <i>vap</i> ¹ mit <i>car</i> ¹ (Ultradünnschnitte).	S. 101
Abb. 40:	Hypothetisches Modell zur Funktion von RasGAP im PI3K/Akt/TOR Signalweg und dadurch in der Regulation der Autophagie.	S. 117
Abb. A1:	Sequenz des <i>UAS-Crk</i> Konstruktes.	S. 127
Abb. A2:	Sequenz des <i>UAS-Crk-RNAi</i> Konstruktes.	S. 128

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1:	Auflistung der verwendeten Enzyme, Standards und Kits	S. 38
Tab. 2:	Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen.	S. 40
Tab. 3:	Auflistung der verwendeten Medien.	S. 41
Tab. 4:	Auflistung der für die Genexpressionsanalyse verwendeten Primer.	S. 45
Tab. 5:	Auflistung der zur Transformation von Bakterien verwendeten Vektoren.	S. 46
Tab. 6:	Auflistung der zur Amplifikation von DNA-Stücken für anschließende Klonierung verwendeten PCR-Primer.	S. 48
Tab. 7:	Auflistung der für Sequenzierungen verwendeten Primer.	S. 49
Tab. 8:	Auflistung der zur Transformation von Hefen verwendeten Vektoren.	S. 51
Tab. 9:	Auflistung der verwendeten Hefe-Kontrollstämme.	S. 52
Tab. 10:	Auflistung der verwendeten Fliegenstämme.	S. 56
Tab. 11:	Ergebnisse der durchgeführten Two Hybrid Screens.	S. 76
Tab. A1:	Statistische Auswertung der Ergebnisse aus dem Phototaxis-Versuch (zu Abb. 15).	S. 129

DANKSAGUNG...

... an Stephan Schneuwly, der es mir ermöglichte, an seinem Lehrstuhl diese Dissertation zu erstellen.

... an José Botella, der die Betreuung der Arbeit übernahm.

... an Charlotte Förster und ihre Mitarbeiter, vor allem auch für die Unterstützung bei den (leider nicht gelungenen) Western Blots.

... an Jürgen Stolz, der meinen Hefen eine Heimat gab.

... an die Stanewsky-Gruppe, die stets weiterhalf.

... an alle Mitglieder des Lehrstuhls Schneuwly – Ihr seid eine feine Truppe! Ein besonderes Dankeschön geht an Uschi für die Semi- und Ultradünnschnitte, an Renate für die Hilfe bei den Keimbahntransformationen und an Evi für die materielle und seelische Nahrung für Tier und Mensch; außerdem an Alois, Corinna, Susi und Juan für die immer wieder notwendigen aufbauenden Worte.

... an Beibs, den Meister der konfokalen Mikroskopie von dopaminergen Neuronen in Fliegenhirnen – die mir leider nicht glückte.

... an Christoph, der mir aus nah und fern jederzeit zur Seite stand, sowohl in fachlichen wie auch persönlichen Krisenzeiten.

... an Elke und Kerstin, die mit mir die Sorgen und Nöte einer Promotion teilten.

... an meine Eltern und meine Schwestern – ich bleib immer Eure Kleinstel!

... an Erhard, der immer da ist.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Daten und Abbildungen sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder einer Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

Regensburg, im September 2008

Monika Mügschl