

**Immunhistochemische und funktionelle Charakterisierung der
Serin/Arginin-Proteinkinase SRPK79D mit Identifizierung von
Interaktionspartnern in *Drosophila melanogaster***



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

vorgelegt von
Alice Schubert,
geb. Bloch

aus
Mudau

Würzburg, 2010

Eingereicht am: 08.12.2010

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. T. Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 18.01.2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus	6
1.2 Die elektrische und chemische Synapse	8
1.3 Die Aktive Zone der Synapse	12
1.4 Das Aktive Zone-Protein Bruchpilot in <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.5 Konstitutives und alternatives Spleißen	19
1.6 Struktur und Funktion von SR-Proteinen	24
1.7 Struktur und Funktion von Serin/Arginin-Proteinkinasen	26
1.8 Die Serin/Arginin-Proteinkinase 79D (SRPK79D) in <i>Drosophila melanogaster</i>	29
1.9 Ziele der Arbeit	32

2. Material und Methoden

2.1 Fliegenstämme	33
2.2 <i>Drosophila melanogaster</i> Aufzucht und Haltung	34
2.3 Chemikalien	35
2.4 Nukleotide	35
2.5 Antikörper	36
2.6 Enzyme	38
2.7 Vektoren	38
2.8 Bakterienstämme	38
2.9 Hefestämme	38
2.10 Antibiotika	38
2.11 Methoden auf DNA-Ebene	39
2.11.1 DNA-Extraktion aus einer adulten <i>Drosophila</i> Fliege	39
2.11.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.11.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung	40
2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese	40
2.11.5 Aufreinigung von PCR-Produkten	41
2.11.6 DNA-Sequenzierung	41
2.11.7 Restriktionsanalyse	41
2.11.8 Ligation	42
2.12 Methoden auf RNA-Ebene	42

2.12.1 Isolierung der Gesamt-RNA	42
2.12.2 Reverse Transkription der mRNA	43
2.12.3 Semiquantitative RT-PCR	43
2.12.4 Real Time-PCR	44
2.13 Proteinbiochemische Methoden	45
2.13.1 Proteinisolierung aus adulten Fliegenköpfen	45
2.13.2 Proteinisolierung mittels Immunpräzipitation	45
2.13.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.13.4 Gelfärbung mit Coomassie und Konservierung von Gelen	46
2.13.5 Silberfärbung	47
2.13.6 Western Blot und ECL-Detektionssystem (Enhanced Chemilumiscence)	47
2.13.7 Zweidimensionale-Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese)	48
2.13.8 Alkalische Phosphatase Versuch	49
2.14 Arbeiten mit Bakterien	49
2.14.1 Bakterienplattenkulturen	49
2.14.2 Bakterienflüssigkulturen	49
2.14.3 Glycerinstock	49
2.14.4 Herstellung hitzekompetenter Bakterien	50
2.14.5 Plasmid Midi- und Mini-Präparationen	50
2.14.6 Das pET28a-Expressionssystem zur Aufreinigung von Fusionsproteinen	50
2.14.7 Transformation von Bakterienzellen und Induktion der Proteinsynthese	50
2.14.8 Proteinisolierung und Aufreinigung	51
2.14.9 Chloroform/Methanol-Fällung	51
2.14.10 Affinitätsaufreinigung von Antiseren	52
2.15 CytoTrap-Versuch zur Identifizierung von Interaktionspartnern	52
2.15.1 Klonierung der <i>Srpk79D</i> -RC und RB-Isoform in den pSos-Vektor	53
2.15.2 Herstellung kompetenter <i>cdc25H</i> -Hefezellen	54
2.15.3 Überprüfung der Köderproteine auf Autoaktivierung	55
2.15.4 Transformation von Hefezellen	55
2.15.5 Kotransformation und Identifizierung von Interaktionspartnern	55
2.16 Immunhistochemische Methoden	56
2.16.1 Immunfluoreszenzfärbungen von Larven	56
2.16.2 Immunfluoreszenzfärbungen von Kryostatschnitten	57
2.16.3 Whole mount Präparationen von adulten <i>Drosophila</i> Köpfen	57
2.16.4 Stimulated emission depletion-Mikroskopie	57

2.17 <i>In vivo</i> Imaging	58
2.18 Verhaltensanalysen von adulten <i>Drosophila melanogaster</i> Fliegen	59
2.18.1 Bestimmung der Lebensdauer	59
2.18.2 Bestimmung der negativ geotaktischen Aktivität	59
2.18.3 Bestimmung der Flugfähigkeit nach Benzer	59

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Charakterisierung von Antiseren gegen die SRPK79D	60
3.1.1 Präadsorption der polyklonalen Antiseren gegen die SRPK79D	60
3.1.2 Affinitätsaufreinigung der Antiseren gegen die SRPK79D	65
3.2 Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten	67
3.3 Immunhistochemische Färbung larvaler Nerv-Muskel-Präparate mit Antikörpern gegen verschiedene Synapsenproteine	68
3.4 Überprüfung des axonalen Transports durch Färbungen mit dem MitoTracker [®] Green FM	71
3.5 Quantifizierungen der Anzahl von Boutons	72
3.6 Rettungsexperimente mit den Kinase-cDNAs im <i>Srpk79D^{VN}</i> -Hintergrund	73
3.6.1 Kontamination der Fliegenlinie <i>w⁻; UAS-Srpk79D-RB eGFP; Srpk79D^{VN}</i> und ihre Wiederherstellung	76
3.6.2 Rettungsexperimente mit <i>UAS-Srpk79D-RB eGFP</i> im <i>Srpk79D^{P2}</i> -Hintergrund	80
3.7 Dephosphorylierungsversuche und 2D-Gelelektrophorese-Experimenten	81
3.8 Experimente mit dem Bruchpilot-Protein in <i>Srpk79D</i> -Nullmutanten	83
3.8.1 Untersuchungen des Bruchpilot-Proteins auf RNA- und Proteinebene	83
3.8.2 Experimente mit den neuen Bruchpilot-Antiseren D2 und N-Term	87
3.8.3 Experimente mit den neuen Bruchpilot-Überexpressionslinien	88
3.8.4 Simultane Überexpression der SRPK79D-Isoformen und von Bruchpilot	91
3.8.5 Stimulated emission depletion-Mikroskopie	92
3.9 <i>In vivo</i> Imaging	93
3.10 Identifizierung von Interaktionspartnern für SRPK79D	95
3.11 Charakterisierung von RNAi-Linien gerichtet gegen SR-Proteine von <i>Drosophila</i>	97

4. Diskussion	
4.1 Immunhistochemische Charakterisierung von Antiseren gegen die SRPK79D	103
4.1.1 Präadsorption der polyklonalen Antiseren gegen die SRPK79D	103
4.1.2 Affinitätsaufreinigung der Antiseren gegen die SRPK79D	105
4.2 Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten	106
4.3 Immunhistochemische Färbung larvaler Nerv-Muskel-Präparate mit Antikörpern gegen verschiedene Synapsenproteine	106
4.4 Überprüfung des axonalen Transports durch Färbungen mit dem MitoTracker [®] Green FM	109
4.5 Quantifizierungen der Anzahl von Boutons	109
4.6 Rettungsexperimente mit den Kinase-cDNAs im <i>Srpk79D^{VN}</i> -Hintergrund	111
4.7 Dephosphorylierungsversuche und 2D-Gelelektrophorese-Experimenten	112
4.8 Experimente mit dem Bruchpilot-Protein in <i>Srpk79D</i> -Nullmutanten	113
4.9 <i>In vivo</i> Imaging	115
4.10 Identifizierung von Interaktionspartnern für SRPK79D	116
4.11 Charakterisierung von RNAi-Linien gerichtet gegen SR-Proteine von <i>Drosophila</i>	118
4.12 Mögliche Wirkmechanismen von SRPK79D	121
5. Ausblick	123
6. Zusammenfassung	125
7. Summary	128
8. Literaturverzeichnis	130
9. Abkürzungen	146
10. Anhang	
10.1 Vektoren	148
10.1.1 pET-28a-c (+)	148
10.1.2 pGEM-T easy Vektor	149
10.1.3 pSos-Vektor	150

10.1.4 pMyr-Vektor	151
10.2 Genomische Region des <i>Srpk79D</i> -Gens	152
10.3 Rohdaten	155
10.4 Sequenzierergergebnisse	156
10.5 Proteindomänen für die SMART-Vorhersage	157
11. Lebenslauf	158
12. Danksagung	160

1. Einleitung

1.1 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* stellt einen der wichtigsten Modellorganismen in der Biologie dar. Ihre Beliebtheit gründet sich auf die vielfachen Vorteile, die das Arbeiten mit ihr bieten. Als Erster führte 1901 W. E. Castle *Drosophila* als Untersuchungsobjekt ein (Snell und Reed, 1993). Die eigentliche Popularität erhielt sie jedoch durch T. H. Morgan, der 1909 beschloss *Drosophila* für seine Versuchszwecke zu verwenden. T.H. Morgan war ein Pionier der klassischen Genetik und leistete durch Rekombinationsanalysen Aufklärungsarbeit bei der Anordnung von Genen auf den Chromosomen. Ebenfalls zeigte Morgan, dass in den Kernen der Speicheldrüsenzellen von Dipterenlarven große Chromosomen vorliegen, die ein färbbares Querscheibenmuster enthalten. Diese polytären Chromosomen entstehen in nicht mehr teilungsaktiven Zellen, in denen weiterhin die Replikation der Chromatiden stattfindet. S. Benzer führte um 1950 genetische und neurophysiologische Studien über Verhaltensmutanten in der Fruchtfliege durch und konnte unzählige Mutanten identifizieren (Benzer, 1973). Trotz des relativ einfachen Aufbaus des Nervensystems der Fliege ist sie zu komplexen Verhaltensmustern wie dem Lernen und der Ausbildung eines Gedächtnisses fähig (Tully und Quinn, 1985; Dubnau et al., 1998; Heisenberg, 2003). Weitere Erfolge feierte der Modellorganismus *Drosophila* in den '90ern als C. Nüsslein-Volhard, mit E. Lewis und E. Wieschaus Erkenntnisse zur Aufklärung der grundlegenden genetischen Steuerungsmechanismen in der Embryonalentwicklung lieferten. Aufgrund von hohen Homologien von Proteinen, wie beispielsweise bei den konservierten Signalkaskaden, ermöglichten diese Befunde auch Rückschlüsse auf andere Organismen, u.a. den Menschen.

Drosophila besitzt ein Paar Geschlechtschromosomen und drei Autosomen auf denen rund 13600 Gene lokalisiert sind. Die Sequenzierung des Genoms im Jahr 2000 zeigte, dass ca. 1000 Gene, welche bereits mit humanen Krankheiten assoziiert waren, 77% homologe Gene in *Drosophila* aufweisen (Adams et al., 2000; Reiter et al., 2001). Dadurch rückte *Drosophila* in den Focus der neurobiologischen Forschung zur Analyse neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson (Feany et al., 2000) oder Alzheimer (Fossgreen et al., 1998). Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch ein neuropathologisches Absterben von Populationen von Nervenzellen aus. Hierbei ermöglichen es Tiermodelle, die generellen biologischen Vorgänge einer Krankheit detailliert zu untersuchen, um so zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen beizusteuern. Weiterhin ist von Vorteil, dass das Nervensystem der Invertebraten dem der Vertebraten ähnelt, jedoch

einfacher aufgebaut ist. Die Taufliege besitzt nur ca. 200000 Neurone im Gehirn, im Gegensatz zum Mensch mit bis zu 10^{11} Neuronen. Außerdem ermöglicht der Einsatz von transgen exprimierbaren Proteinen die gezielte Manipulation von Zellpopulationen, um Funktionen einzelnen Gehirnarealen zuordnen zu können (Sweeney et al., 1995; Baines et al., 1999; Beal et al., 2001; Keller et al., 2002).

Vorteilhaft sind die leichte und kostengünstige Zucht und Haltung von *Drosophila*, sowie die kurze Generationszeit mit einer hohen Anzahl an Nachkommen und ganzjähriger Reproduktion. Mittlerweile sind unzählige Mutanten verfügbar, gleichermaßen wie vielfältige gentechnische Methoden, wie z.B. das GAL4/UAS-System (Abbildung 1.1). Das GAL4/UAS-System stammt ursprünglich aus der Hefe und besteht aus den zwei transgenen Komponenten GAL4 und UAS, die in verschiedenen Fliegenlinien inseriert vorliegen. Dieses System ermöglicht die gezielte Expression von Reportergenen (wie z.B. LacZ, GFP; Prasher et al., 1992; Chalfie et al., 1994; Brand, 1995; Yeh et al., 1995) oder beliebigen Effektorgenen. Durch die Verwendung von unterschiedlichen GAL4-Linien kann die Expression auf bestimmte Zellpopulationen begrenzt werden (Brand und Perrimon, 1993). Die Treiberlinie steht unter der Kontrolle eines schwachen Promotors der den Transkriptionsfaktor GAL4 exprimiert. Die Effektorlinie steht unter der Kontrolle des Enhancers 'upstream activating sequence' (UAS), der vor einem beliebigen Effektorgen liegen kann. Werden beide Linien miteinander gekreuzt, erfolgt in der F1-Generation durch die Bindung des GAL4-Proteins an die UAS-Sequenz die spezifische Genexpression. Die Expression des Transgens ist zeitlich und örtlich durch die Kontrolle des endogenen Promotors im *Drosophila*-Genom begrenzt. Eine weitere Feinabstimmung kann durch den Einsatz des Inhibitors GAL80 erfolgen, der durch eine Mutation eine Temperatursensitivität besitzen kann. Durch eine Erhöhung der Temperatur kann die Repression revertiert werden, und eine zeitliche und entwicklungspezifische Regulation der Expression stattfinden (Duffy, 2002). Weitere unzählige gentechnische Methoden machen *Drosophila* zu einem idealen Modellorganismus in der Forschung und ermöglichen die Aufklärung der komplexesten Sachverhalte.

Einleitung

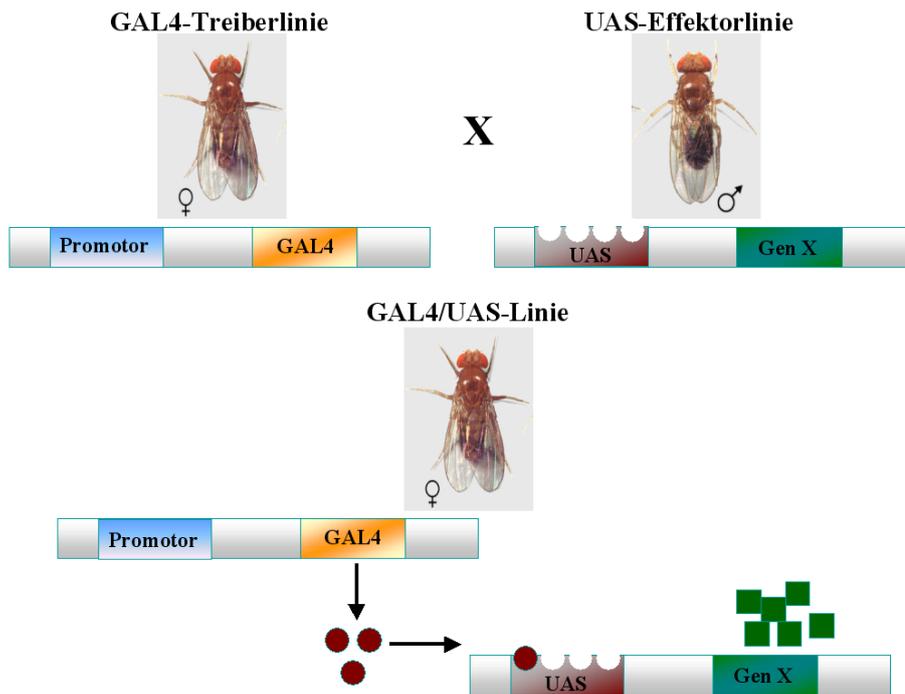


Abbildung 1.1. **Das GAL4/UAS-System:** Das binäre System besteht aus einer Treiberlinie, die unter der Kontrolle eines Promotors lokal GAL4 exprimiert und einer Effektorlinie, in der das Gen X unter der Kontrolle der 'upstream activating sequence' (UAS) steht. Die Separierung beider Transgene auf verschiedene Fliegenlinien ermöglicht nur in der F1-Generation die Bindung des Transkriptionsfaktors GAL4 an die UAS-Sequenz und führt zur Expression des Zielgens.

1.2 Die elektrische und chemische Synapse

Das komplexe Netzwerk des Nervensystems wird durch Neurone und ihre Interaktion mit den Zielzellen aufgebaut. Die hochspezialisierte Fähigkeit von Neuronen Informationen in Form von elektrischen Signalen aufnehmen, verarbeiten und weiterleiten zu können beruhen auf elektrischen und biochemischen Vorgängen. Dabei stellen Synapsen die wichtigsten Schaltstellen für die Kommunikation zwischen den Neuronen dar. Dieser Prozess kann vielfältig moduliert werden, wodurch die Plastizität des Nervensystems entsteht. Anhand von morphologischen Eigenschaften kann zwischen den elektrischen und den chemischen Synapsen unterschieden werden. Elektrische Synapsen befinden sich meist in Organen wie dem Herzen, Gehirn oder Leber, bei denen eine Synchronisierung von Signalen notwendig ist. Bei den elektrischen Synapsen erfolgt die Signalübertragung nahezu ohne Verzögerung, durch den Ionenfluss über Gap junctions direkt von der Präsynapse zur Postsynapse, und führt dort zur Depolarisation der Zelle. Die Gap junctions sind 2-3nm breit und werden von dem Transmembranprotein Connexin aufgebaut. Dabei bilden insgesamt 12 Kopien von Connexinen einen Transmembrankanal aus, der das Zytoplasma von benachbarten Zellen verbindet.

Einleitung

Der generelle Weg der Informationsweiterleitung von Neuronen zur Stimulation von anderen Neuronen, Muskelzellen oder Drüsenzellen erfolgt durch chemische Synapsen. Trifft das ankommende Aktionspotential in der chemischen Synapse ein, öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle des N- oder P/Q-Typs (Chua et al., 2010). Der Einstrom von Kalzium führt zur Freisetzung von Neurotransmittern durch Exozytose von synaptischen Vesikeln an den sog. Aktiven Zonen. Durch die Bindung des membranassoziierten Phosphoproteins Synapsin an Aktin sind die meisten synaptischen Vesikel am Zytoskelett vernetzt. Der Kalziumeinstrom löst die Phosphorylierung von Synapsin durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase aus, wodurch sich seine Affinität zu den synaptischen Vesikeln und zu Aktin verringert. Dies führt zur Loslösung der Vesikel vom Zytoskelett, so dass diese die freigesetzten Vesikel ersetzen können (Bähler et al., 1987; Benfenati et al., 1991 und 1998; Hilfiker et al., 1999). Synapsin kann durch eine Vielzahl von Kinasen phosphoryliert werden, wodurch die Verfügbarkeit von synaptischen Vesikeln reguliert wird. Aufgrund dessen werden die synaptischen Vesikel an die Aktiven Zonen rekrutiert, wobei das GTP-bindende Protein Rab3 die Zielsteuerung übernimmt. An der Aktiven Zone erfolgen dann das ATP-abhängige 'Priming' und die Kalzium-induzierte Exozytose, bei der der Neurotransmitter ausgeschüttet wird (Abbildung 1.2). Die Verzögerung, die durch diesen Mechanismus zwischen eintreffenden Aktionspotential und Transmitterfreisetzung entsteht, beläuft sich auf 0,5ms. Der freigesetzte Neurotransmitter diffundiert über den 30nm breiten synaptischen Spalt und bindet an spezifische Rezeptoren der Postsynapse. Die durch die Bindung verursachte Konformationsänderung des Rezeptors verursacht direkt an sog. ionotropen Rezeptoren die Umwandlung des chemischen Signals in ein elektrisches. Bei der Bindung der Transmitter an exzitatorische Rezeptoren, wird die Permeabilität der Plasmamembran erhöht und ein neues Aktionspotential entsteht. Wird ein inhibitorischer Rezeptor stimuliert erfolgt eine Membranhyperpolarisation und die Bildung eines Aktionspotentials wird gehemmt. Alternativ können durch Aktivierung von sog. metabotropen Rezeptoren Signalkaskaden, Stoffwechsel und Genexpression moduliert werden.

Einleitung

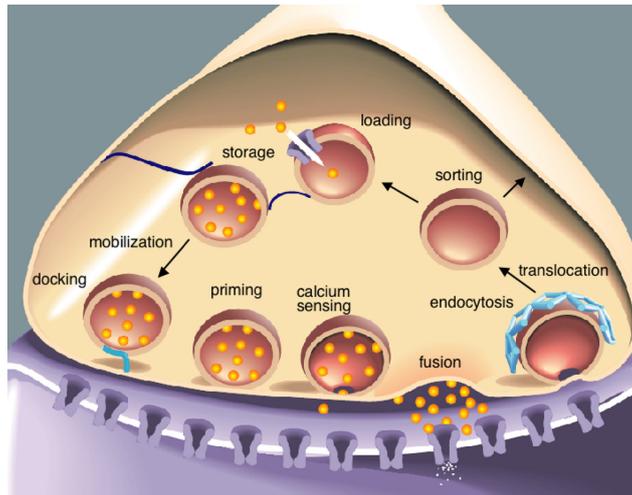


Abbildung 1.2. **Schematisch dargestellter Zyklus von synaptischen Vesikeln:** Synaptische Vesikel werden durch verschiedene Stadien wie 'Docking' und 'Priming' geschleust, bevor sie kompetent für die Exozytose sind. Die Ausschüttung der Neurotransmitter findet an der Aktiven Zone einer Synapse statt. Nach der Fusion werden die synaptischen Vesikel recycelt und durchlaufen den Zyklus erneut. Quelle: Richmond, 2007

Zur Gewährleistung einer kontinuierlichen Transmission durchlaufen synaptische Vesikel einen Zyklus (Abbildung 1.2; Südhof, 2004; Richmond, 2007). Bisher konnten neun Klassen von Transmembranproteinen identifiziert werden, die für die Beladung, Lagerung und Transport der synaptischen Vesikel verantwortlich sind (Südhof, 2004). Die Beladung der 40-50nm großen synaptischen Vesikel mit Neurotransmittern erfolgt durch eine in der Vesikelmembran lokalisierte H^+ -ATPase (vATPase), eine Protonenpumpe, die für eine Ansäuerung durch die Erniedrigung des pH-Werts in den Vesikeln sorgt und vesikulären Antiportern, die unter Anwendung des Protonengradienten Transmitter in die Vesikel transportieren. Weiterhin spielen Synaptobrevin (VAMP, 'vesicle associated protein'), Synaptotagmin, sowie Proteine mit vier charakteristischen Transmembrandomänen wie Synaptophysin und Synaptogyrin (SCAMPs), oder auch die Vesikelproteine Glycoprotein 2 (SV2) und SV2-related protein (SVOP) eine wichtige Rolle bei diesem Prozess (Abbildung 1.3; Jahn und Scheller, 2006; Chua et al., 2010). Nach der Beladung kann aufgrund der Lokalisation der synaptischen Vesikel zwischen verschiedenen Populationen differenziert werden (Rizzoli und Betz, 2005; Becherer und Rettig, 2006; Akbergova et al., 2009). Vesikel die peripher liegen bilden den 'reserve pool'. Vesikel aus diesem Reservoir werden aktiv zur Plasmamembran dirigiert, dort verankert ('Docking') und bilden den 'unprimed pool'. Verankerte Vesikel werden durch einen Reifungsprozess, das 'Priming', aktiviert, und bilden damit den 'ready releasable pool' (Augustine et al., 1999; Fenster et al., 2000; Rizzoli und Betz, 2005; Jahn und Scheller, 2006). Ashery et al. konnten 2000 bei Experimenten in Chromaffinzellen zeigen, dass die Fusion der Vesikel mit unterschiedlicher Geschwindigkeit stattfinden kann. Bei dem

Einleitung

‘slowly releasable pool’ erfolgt die Fusion mit drei Vesikeln pro Sekunde, bei dem ‘readily releasable pool’ mit 30 Vesikeln pro Sekunde (Ashery et al., 2000). Der sezernierte Neurotransmitter kann durch enzymatischen Abbau, Wiederaufnahme oder Diffusion aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Im ‘recycling pool’ erfolgt die Wiedergewinnung der synaptischen Vesikel nach der Exozytose und kann auf drei Wegen stattfinden. Bei dem ‘kiss-and-stay’-Mechanismus werden die Vesikel mit Neurotransmittern befüllt, ohne zuvor von der präsynaptischen Membran gelöst zu werden. Beim ‘kiss-and-run’-Mechanismus erfolgt die Exozytose durch eine kleine Pore und die leeren synaptischen Vesikel werden von der Plasmamembran gelöst, ortsnah befüllt und dem Zyklus wieder zugeführt. Bei dem langsameren Clathrin-vermittelten Mechanismus integriert die Vesikelmembran zunächst in die Plasmamembran und wird dann mit Hilfe des Adaptorproteins Clathrin wieder zu einem Vesikel geformt. Die Abschnürung des Vesikels erfolgt durch die GTPase Dynamin, in Zusammenarbeit mit Synaptojanin und dem Aktin-Motorprotein Myosin. Diese ‘Clathrin coated vesicles’ werden über das Endosom geschleust, durch Knospung regeneriert und wieder befüllt (Südhof, 2004; Jahn und Scheller, 2006; Rizzoli und Jahn, 2007). Das Cysteine string protein (CSP) ist ein Mitglied der DnaJ-Familie von Ko-Chaperonen und ist mit seinen Palmitylresten in der Membran synaptischer Vesikel verankert (Abbildung 1.3). Durch die Interaktion von CSP mit der ATPase Hsc70 (heat shock cognate protein 70) und den SGTs (small glutamine-rich tetratricopeptide-containing proteins) werden beschädigte Komponenten des Transmissionsapparates entsorgt (Südhof, 2004; Jahn und Scheller, 2006; Burré und Volkandt, 2007).

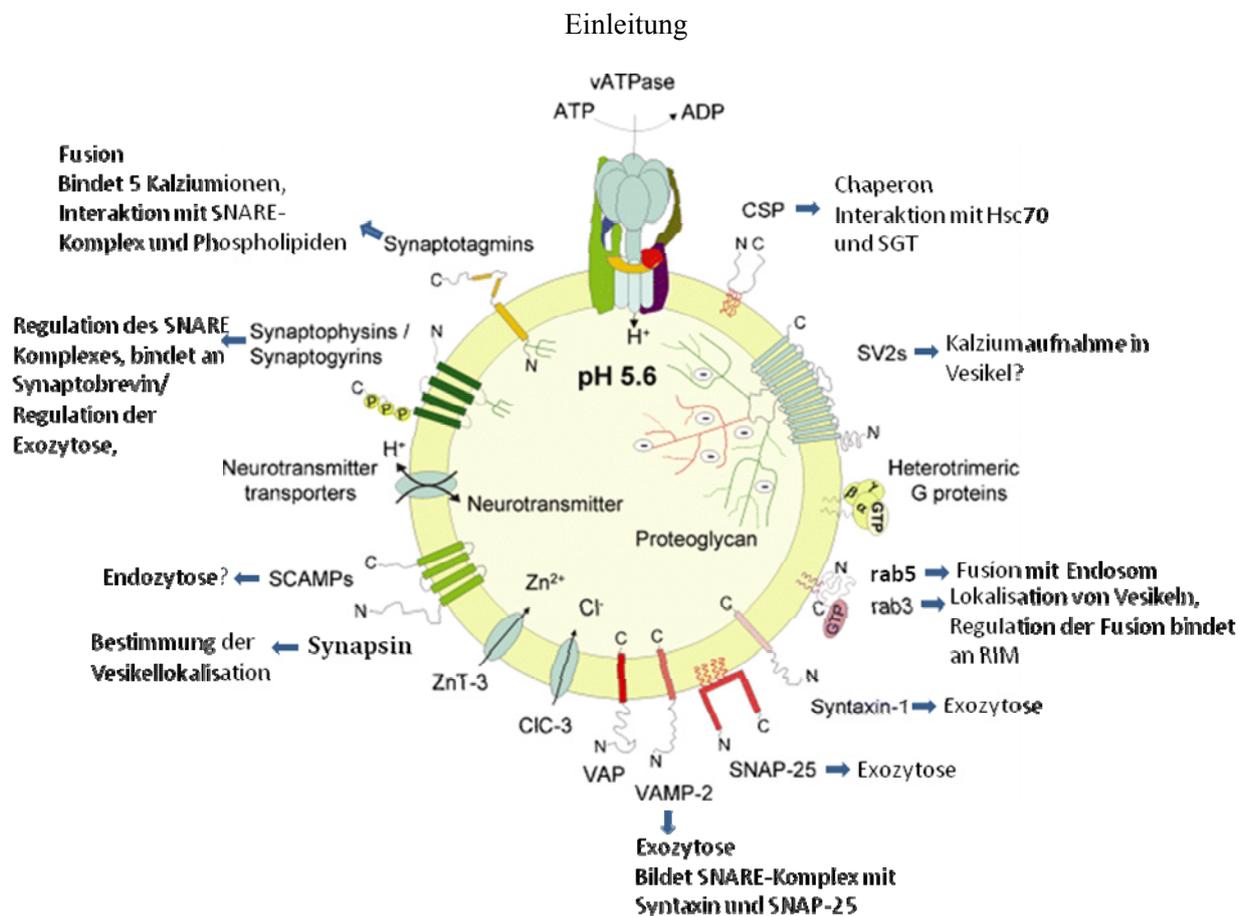


Abbildung 1.3. **Schematische Darstellung von vesikulären und Vesikel-assoziierten Proteinen:** Verschiedene Klassen von Proteinen bestimmen über die Lokalisation von synaptischen Vesikeln. Quelle: modifiziert nach Burré und Volkand, 2007, genehmigt vom Copyright Clearance Center (3123950)

1.3 Die Aktive Zone der Synapse

Die Ausschüttung der Neurotransmitter findet an einer spezialisierten elektronendichten Region der Synapse statt, der Aktiven Zone (Couteaux und Pecot-Dechavassine, 1970). Dabei ist die Aktive Zone präzise gegenüber der postsynaptischen Membran lokalisiert und ist der Ort an dem synaptische Vesikel andocken, fusionieren und den Neurotransmitter sezernieren. Die Aktive Zone kann in drei Bereiche unterteilt werden: die Plasmamembran gegenüber der postsynaptischen Membran, die netzartige Zytomatrix der Aktiven Zone (CAZ), und die elektronendichten Strukturen (Dresbach et al., 2001; Schoch und Gundelfinger, 2006). Diese Merkmale sind allen Aktiven Zonen gleich, jedoch variieren sie in Form und Größe zwischen den Spezies (vgl. Abbildung 1.4; modifiziert nach Zhai und Bellen, 2004).

Einleitung

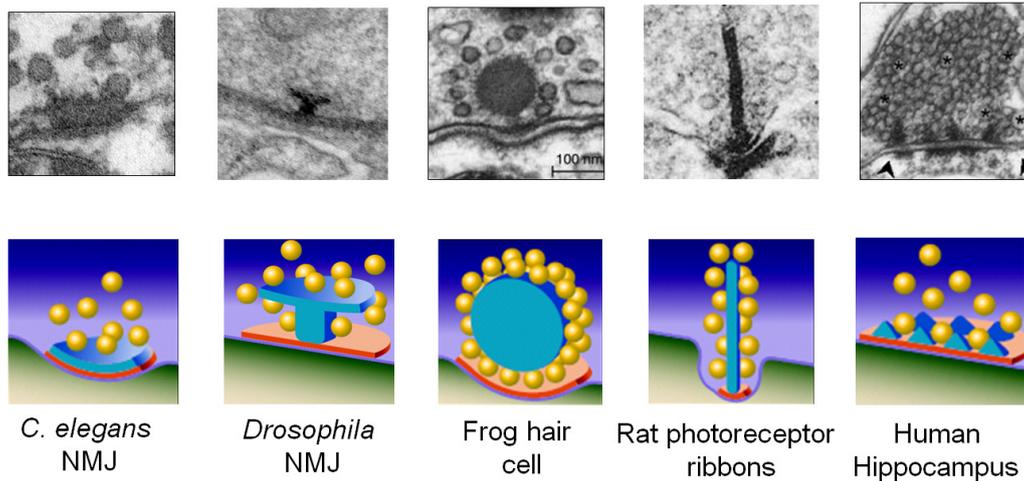


Abbildung 1.4. **Darstellung von Aktiven Zonen in verschiedenen Organismen:** Die Aktive Zone unterscheidet sich in Form und Größe in verschiedenen Spezies, jedoch ist die Funktion gleichbleibend. Quelle: Fouquet, 2009, modifiziert nach Zhai und Bellen, 2004

Komponenten der elektronendichten Region der Zytomatrix organisieren den Zusammenbau der Aktiven Zone und modulieren das 'Docking', 'Priming' und die Fusion synaptischer Vesikel (Abbildung 1.5). Hier sind Zytoskelettproteine wie Aktin und Spectrin vertreten, sowie CAZ-spezifische Proteine wie RIM, Munc-13/Unc-13, Piccolo, Bassoon, CAST/ELKS/ERC und Liprin- α . (Zhai et al., 2001; Ohtsuka et al., 2002; Wang et al., 2002; Shapira et al., 2003; Zhai und Bellen, 2004; Chua et al., 2010). Beim Verankern von Vesikeln ('Docking') wird in Säugern ein ternärer Komplex aus Munc-13/Unc-13, Rab3 und RIM (Rab3-interacting molecule) gebildet (Betz et al., 2001; Jahn und Scheller, 2006). Die CAST/ELKS/ERC-Proteine (CAZ-associated structural protein/ glutamate-, leucine-, lysine- und serine-rich protein/ ELKS-Rab6-interacting protein CAST) binden direkt an RIM, Bassoon, Piccolo und indirekt an Munc-13-1. Die Bindung zwischen CAST und RIM führt zur Rekrutierung des RIM-Rab3-Komplexes, wodurch die Verankerung der synaptischen Vesikel innerhalb der Aktiven Zone erfolgt (Ohtsuka et al., 2002; Inoue et al., 2006; Oswald et al., 2009). Als CAST/ELKS/ERC-Homolog konnte in *Drosophila melanogaster* das Aktive Zone-Protein Bruchpilot identifiziert werden (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006). Dabei zeigt der N-Terminus von Bruchpilot eine hohe Homologie zu dem humanen ERC.

Bei dem als 'Priming' bezeichneten Prozess werden in einer ATP-abhängigen Reifungsreaktion, die angedockten Vesikel für die Exozytose vorbereitet. Dabei mobilisiert das Gerüstprotein RIM die synaptischen Vesikel aus dem 'reserve pool' durch seine Interaktion mit der GTPase Rab3. Diese liegt assoziiert mit der Membran synaptischer Vesikel vor, wodurch ein Rab3-RIM-Komplex gebildet wird, der das 'Priming' reguliert. Das 'Priming' beinhaltet ebenfalls die Synthese von

Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat, den Abbau von löslichem NSF (cytoplasmic *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) und seinem Kofaktor α -SNAP (α -soluble NSF attachment protein) aus dem SNARE-Komplex (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) durch die AAA⁺-ATPase. Durch die Bindung von Munc-18-1 wird Syntaxin in seiner geschlossenen Konformation stabilisiert. Erst durch eine Konformationsänderung von Munc-13 wird Syntaxin I von einer geschlossenen in eine offene Konformation überführt und kann nun mit den anderen SNARE-Proteinen interagieren. An der Regulation des 'Primings' sind kleine GTPasen wie Rab3 und Rab5, sowie RIM, ELKS und Complexine beteiligt (Wang et al., 1997; Schoch und Gundelfinger, 2006; Xue et al., 2009; Chua et al., 2010). Das Strukturprotein Piccolo ist an der Organisation und Architektur der Aktiven Zonen sowie am Vesikelzyklus beteiligt. Piccolo kann RIM, sowie das Aktin-bindende Protein Profilin binden und interagiert mit dem Vesikel-assoziierten Protein PRA-1 (Rab3A-associated protein-1; Zhen und Jin, 2004). Zusammen mit Bassoon wird eine Matrix aufgebaut in der die Komponenten der Aktiven Zone organisiert werden können und eine Positionierung der Vesikel stattfinden kann (Cases-Langhoff et al., 1996, tom Dieck et al., 1998; Wang et al., 1999; Fenster et al., 2000). Bisher konnten keine Homologe in *D. melanogaster* oder *C. elegans* für Piccolo und Bassoon der Säuger identifiziert werden (Owald und Sigrist, 2009).

Zur Modulation der Transmission wird um die befestigten Vesikel ein Gerüstkomplex bestehend aus Bassoon, Piccolo, ELKS/CAST/ERC und CASK errichtet (Schoch und Gundelfinger, 2006). Die Fusion der Vesikel und die Ausschüttung der Neurotransmitter finden an der Plasmamembran der Aktiven Zone statt. In dieser Region lokalisieren Kalziumkanäle die durch den Kalzium-Einstrom die Exozytose durch die Wechselwirkung von Synaptotagmin mit dem SNARE-Komplex auslösen. Die präzise Positionierung und Stabilisierung der Aktiven Zone gegenüber der PSD (post synaptic density) wird über Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs) wie Cadherin, Neurexin und Neuroligin erreicht. Die elektronendichten Strukturen an die die synaptischen Vesikel befestigt werden, sind entscheidend für die Transmission. In *Drosophila* sind die elektronendichten Strukturen T-förmig aufgebaut (T-bars) und bei Vertebraten werden diese als synaptische 'ribbons' bezeichnet (Abbildung 1.4). Hier spielen vesikelbindende Proteine wie Synapsin und RIM, sowie das Motorprotein KIF3A eine wichtige Rolle (Zhai und Bellen, 2004; Zanazzi und Matthews, 2009). Liegt der Kalziumsensor Synaptotagmin als Komplex mit Neurexin und Syntaxin vor, verhindert er das Andocken von synaptischen Vesikeln an die Plasmamembran. Nach dem Kalzium-Influx verlässt Synaptotagmin den Komplex und bindet an Membranlipide, Synaptobrevin an den synaptischen Vesikeln bzw. SNAP25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) an der präsynaptischen Membran des SNARE-Komplexes und initiiert die Fusion (Jahn und Scheller,

2006; Chua et al., 2010). SNAREs bilden den Hauptteil der Transmissionsmaschinerie. Die vSNAREs in der Vesikelmembran (Synaptobrevin) sind mit den tSNAREs (Syntaxin und SNAP25) in der präsynaptischen Membran über die zytoplasmatischen NSFs und dem löslichen SNAP komplexiert. Complexine binden klammerartig an den Synaptobrevin/Syntaxin/SNAP25-Komplex in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Becherer und Rettig, 2006). Hierdurch befinden sich die synaptischen Vesikel in einem Zustand der Hemifusion, bei der nur die äußere Lipidschicht der Lipiddoppelmembranen fusioniert ist. Wird RIM von Munc-13/Unc-13 gebunden, erfolgt eine Stabilisierung des SNARE-Komplexes durch die Bindung an Synaptotagmin. (Wang et al., 1997 und 2002; Südhof, 2004). Dabei findet die Interaktion zwischen Synaptotagmin und dem SNARE-Komplex beginnend vom N-Terminus aus statt, wobei ein Reißverschlussartiger Zusammenbau von trans-Komplexen erfolgt (Sorensen et al., 2006). Die freiwerdende Energie ist ausreichend zur Überschreitung der Energiebarriere für die Fusion. Nach erfolgter Exozytose helfen SNAP und NSF bei der Dissoziation von Synaptobrevin von den tSNAREs und die Komponenten stehen für einen neuen Zyklus bereit.

In Säugern konnte gezeigt werden, dass die Komponenten der Aktiven Zone im Golgi-Apparat schon teilweise assembliert werden (Garner et al., 2006; Tao-Cheng et al., 2007; Oh et al., 2007). Dies stützt sich auf *in vitro* Experimente bei denen die Strukturproteine Piccolo und Bassoon im trans-Golgi Netzwerk detektiert wurden (Dresbach et al., 2006). Die Proteine der Aktiven Zone werden in PTVs (Piccolo-Bassoon transport vesicles) oder 'dense core'-Vesikeln verpackt. Beim Transport scheinen Proteine wie Aktin, Myosin, Dynein und Kinesin beteiligt zu sein (Zhen und Jin, 2004; Fejtova et al., 2009). Dabei enthalten die PTVs verschiedene CAZ-Mitglieder wie Piccolo, Bassoon, RIM, Munc-13, Munc-18 und Synapsin (Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003). Scheinbar ist die Fusion von zwei bis zu vier solcher Vorläufervesikel ausreichend um eine Aktive Zone bilden zu können (Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003; Dresbach et al., 2006). Dies wird durch das schon teilweise vorgefaltete Material in den Transportvesikeln ermöglicht.

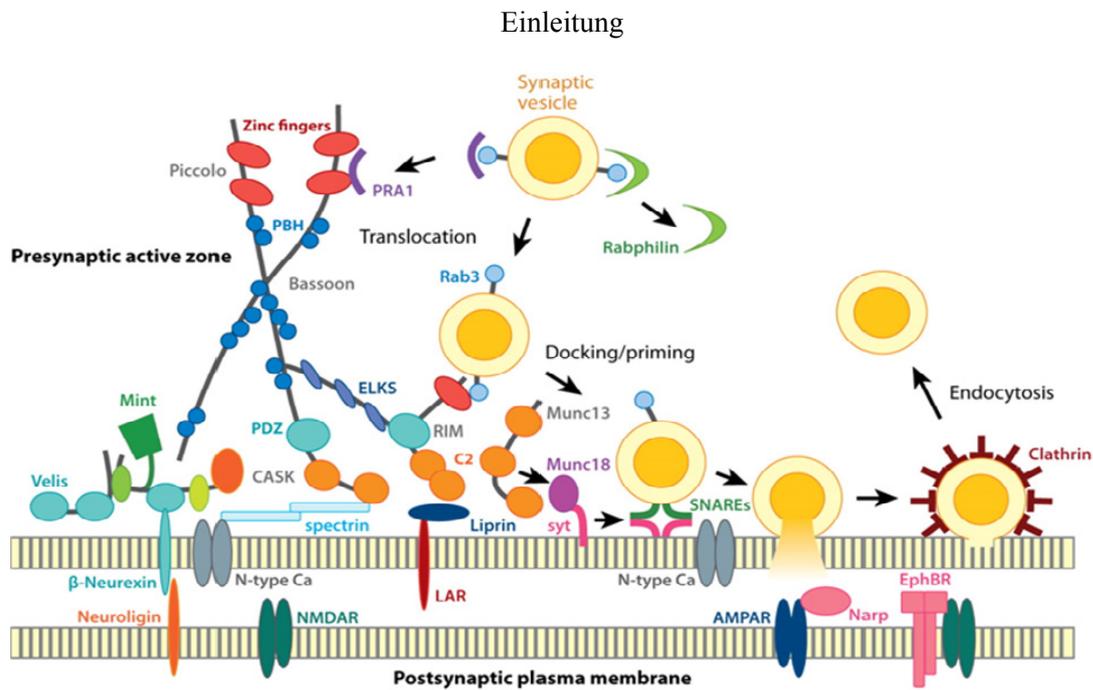


Abbildung 1.5. Schematische Darstellung von Proteinen, die die Aktive Zone der Vertebraten aufbauen und erhalten: Gerüstproteine wie Piccolo, Bassoon, RIM u.a. organisieren die Aktive Zone und verleihen ihr ihre Funktionsfähigkeit. Quelle: Jin und Garner, 2008

1.4 Das Aktive Zone-Protein Bruchpilot in *Drosophila melanogaster*

Das Protein Bruchpilot rückte in den letzten Jahren immer weiter in den Vordergrund der wissenschaftlichen Arbeiten in *Drosophila melanogaster*. Das Aktive Zone-Protein Bruchpilot ist zurzeit das erste identifizierte Gerüstprotein in Invertebraten, das die Funktion von Piccolo und Bassoon übernehmen könnte. Bruchpilot weist im N-Terminus eine bis zu 67%ige Homologie zu den Aktive Zone-Proteinen CAST/ELKS/ERC (Wagh et al., 2006) von *C. elegans* und Menschen auf. Im C-Terminus besitzt es zu den Zytoskelettproteinen wie beispielsweise Plectrin vergleichbare 'coiled-coil'-Domänen. Die Identifizierung von Bruchpilot erfolgte nach der reversen genetischen Methode, anhand des monoklonalen Antikörpers nc82 (Wagh et al., 2006; Hofbauer et al., 2009).

Dieses zentrale Protein der Aktiven Zone führt bei einer RNAi-vermittelten Reduktion (Fire et al., 1998) zu zahlreichen Defekten, wie der Reduktion der Lebenserwartung und zu ausgeprägten Verhaltensdefiziten. Auch der vollständige morphologische Verlust der charakteristischen elektronendichten T-bars, die normalerweise an der präsynaptischen Membran verankert vorliegen und wichtig für die Transmission sind, wurde festgestellt (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Kalziumkanäle in *brp*-Mutanten verstreut vorliegen (Kittel et al., 2006). Normalerweise ist die Basis eines T-bars über den Kalziumkanälen positioniert. Durch das Fehlen der T-bars in der RNAi-Linie konnte eine 50%ige Reduktion der Transmission an

der neuromuskulären Synapse gemessen werden (Wagh et al., 2006). Jedoch beeinflusst der Verlust von Bruchpilot weder die Postsynapse, noch war die Anzahl der Vesikel des 'readily releasable pools' verändert (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Bruchpilot ist demnach wichtig für den Aufbau und Erhalt der Aktiven Zone, wobei es wahrscheinlich eine Matrix um Aktive Zone-Komponenten bildet und die Proteine, insbesondere die Kalziumkanäle, verankert (Zampighi et al., 2008; Fouquet et al., 2009). Mittels immun-elektronenmikroskopischen Studien und STED-Aufnahmen konnte Bruchpilot als struktureller Bestandteil des T-bars bestätigt werden. Die Expression von mutierten oder verkürzten Bruchpilot-Proteinen führten bisher immer zu unvollständigen T-bars. Dabei weist Bruchpilot eine festgelegte Orientierung in der Aktiven Zone auf, wobei der N-Terminus zur Plasmamembran zeigt und der C-Terminus ins Zytoplasma ragt (Fouquet et al., 2009). Der Aufbau eines T-bars erfolgt aus acht Bruchpilot-Dimeren, wobei diese trichterförmig angeordnet werden. Der N-Terminus von Bruchpilot interagiert mit dem spannungsabhängigen Kalziumkanal Cacophony (Kawasaki et al., 2004; Fouquet et al., 2009). Dabei dominiert an der neuromuskulären Synapse von *Drosophila* die Kalziumkanal-Untereinheit Cacophony $\alpha 1$ die Kalzium-vermittelte Exozytose von Neurotransmittern (Atwood, 2006; Kittel et al., 2006). In elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass das gebildete T-bar von synaptischen Vesikeln umgeben wird, wobei einige wenige angedockte Vesikel an der Plasmamembran vorliegen. Daher wird vermutet, dass Bruchpilot wichtig für die Anheftung der Vesikel und ihre Hinführung zur Exozytose ist (Zhai und Bellen, 2004; Prokop und Meinertzhagen, 2006). *In situ* Hybridisierungen konnten zeigen, dass Bruchpilot während der Entwicklung des Nervensystems exprimiert wird (Wagh et al., 2006). Infolgedessen führt der vollkommene Ausfall des Proteins zur Letalität im späten Larvenstadium (Kittel et al., 2006).

Anhand von STED-Aufnahmen und *in vivo* Imaging-Versuchen konnte der zeitliche Aufbau der Aktiven Zonen untersucht werden (Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010). Liprin- α und Syd-1 erreichen die sich entwickelnde Aktive Zone vor Bruchpilot und dirigieren Bruchpilot dann an die richtige Position. Bruchpilot wiederum instruiert den Zusammenbau von T-bars, die dann für die Zusammenlagerung der Kalziumkanäle zuständig sind.

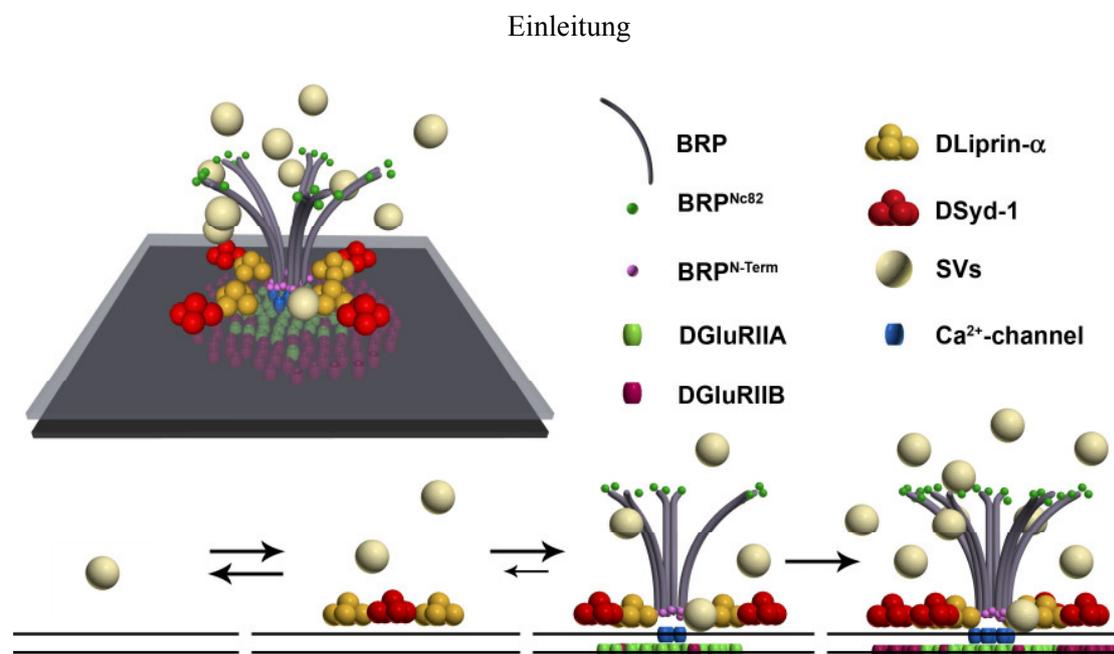


Abbildung 1.6. **Zeitlicher Aufbau der Aktiven Zone von *Drosophila melanogaster***: Proteine wie Liprin- α und Syd-1 (synapse defective-1) organisieren die Aktive Zone. Bruchpilot ist ein direkter Bestandteil der T-bars und zeigt einen trichterförmigen Aufbau aus acht Bruchpilot-Dimeren. Dabei befindet sich der N-Terminus von Bruchpilot an der Plasmamembran, der C-Terminus ragt ins Zytoplasma. Die Kalziumkanäle werden exakt unterhalb von Bruchpilot verankert. Quelle: Fouquet, 2009

Es konnten einige Mutanten identifiziert werden, die eine Fehlverteilung von Bruchpilot bewirken. So wird beispielsweise eine Störung des Bruchpilot-Transports und die resultierende Akkumulation von Bruchpilot im Axon durch eine Mutation im Kinesin *imac* (immaculate connections) verursacht (Pack-Chung et al., 2007). Weiterhin bewirkt die Mutation eine fehlende Differenzierung der synaptischen Boutons, sodass nur wenige Aktive Zone gebildet werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Motorproteins des BMP Typ-II Faktors 'Wishful thinking' in der retrograden Signalkaskade 'glass bottom boat' sog. 'floating T-bodies' im Zytoplasma entstehen lässt (Aberle et al., 2002; Marqués et al., 2002). Ähnliches wurde bei Bassoon-Mutanten in *Xenopus* beobachtet. Hier befinden sich die elektronendichten 'ribbons' ebenfalls im Zytoplasma, wodurch sich die Zahl der gedockten Vesikel verringert und es zu einem gestörten Kalziumeinstrom kommt (Khimich et al., 2005). Der Verlust der GTPase Rab3 führt zur Ausbildung von Super-Aktiven Zonen, durch eine Aufkonzentrierung von Aktive Zone-Komponenten (Graf et al., 2009). Die GTPase Rab3 scheint die Verteilung von präsynaptischen Komponenten an der Aktiven Zone zu regulieren. Das Wiedereinbringen von Rab3 revertiert den Phänotyp und führt zu einer Rekrutierung von Bruchpilot an die Aktive Zone. Bei Mutationen des RhoGAP-Proteins Syd-1 werden vergrößerte Aktive Zonen gebildet und Bruchpilot akkumuliert in Boutons und im Axon. Somit steuert Syd-1 die Lokalisation von Bruchpilot. Eine Mutation der Serin/Threoninkinase

Unc51 hingegen führt zu einer Störung des axonalen Transports und dadurch zur Agglomeration von Bruchpilot in larvalen Nerven (Wairkar et al., 2009). Unc-51 ist für die Lokalisation von Bruchpilot gegenüber den Glutamatrezeptorfeldern der postsynptischen Membran notwendig, indem es die Aktivität der MAP-Kinase ERC reguliert. Auch bei Mutation oder RNAi-vermittelter Reduktion der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Serin/Arginin-Proteinkinase SRPK79D entstehen Bruchpilot-Agglomerate in den larvalen Axonen. Dies wird in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert.

1.5 Konstitutives und alternatives Spleißen

Die proteinkodierenden Gene von Eukaryoten sind als Mosaik aufgebaut mit Exons, die die kodierenden Sequenzen enthalten, und den dazwischen liegenden nicht kodierenden Introns. Zunächst wird das Gen gemeinsam mit Introns und Exons in einer primären mRNA (prä-mRNA) transkribiert. Erst durch die Prozessierung der prä-mRNA entsteht eine reife mRNA. Die Prozessierung beinhaltet das Capping am 5'-Terminus mit 2,2,7-Trimethylguanosin und die am 3'-Terminus erfolgende Poly-Adenylierung. Durch das Spleißen werden die kodierenden Bereiche von den nicht-kodierenden Introns getrennt, sodass nur die Exons translatiert werden. Dieser Vorgang wird durch einen dynamischen Multiproteinkomplex, genannt Spleißosom, ausgeführt. Die reife mRNA wird aus dem Kern ins Zytoplasma, den Ort der Proteinbiosynthese, transportiert. Werden alle Exons eines Gens in der Reihenfolge ihres genomischen Auftretens aneinander gefügt, wird der Vorgang als konstitutives Spleißen bezeichnet. Beim alternativen Spleißen können aus einem Transkript verschiedene mRNA-Moleküle gebildet werden. Dadurch erhöht sich die Informationsdichte der DNA. Hauptbestandteile des Spleißosoms sind die Uracil-reichen U snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles; Krämer, 1996; Will und Lührmann, 2001; Graveley, 2000), die das eigentliche Spleißen katalysieren. Die U1, U2 und U5 snRNPs enthalten je eine RNA-Komponente (small nuclear RNA), wohingegen U4/U6 zwei RNA-Komponenten, die durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind, besitzen. Dabei haben U1, U2, U4 und U5 charakteristische N,N,7-Trimethylguanin-Kappen an den 5'-Enden, wohingegen die U6 snRNA Methyltriphosphat am 5'-Ende besitzt. An diese konservierten Oligo(U)-Bindestellen können die sieben Sm-Proteine (B/B', D1-3, E, F, G) bzw. LSM (like SM)-Proteine binden. Die Sm-Proteine sind als heptamerer Ring um die snRNAs gebunden und bilden den Sm-core, das strukturelle Grundgerüst der snRNPs, aus (Will und Lührmann, 2001; Raker et al., 1996). Die snRNAs U1, U2, U4 und U5 werden im Zellkern durch RNA Polymerase II transkribiert und zur Reifung ins Zytoplasma exportiert. Durch Wechselwirkungen und Oligomerisierung mit dem SMN-Komplex

erfolgt die Ausbildung der Haupt-RNP-Struktur der Sm-Proteine (Pellizzoni, 2007). Der SMN-Komplex katalysiert die Zusammenlagerung der U snRNPs und ihre Prozessierung. Nach dem Reimport in den Zellkern werden sie in Cajal bodies akkumuliert, weiter modifiziert und zusammengebaut. Die reifen U snRNPs werden in den nukleären 'Speckles' gespeichert und bei Gebrauch rekrutiert. Die Reifung von U6 snRNA erfolgt ausschließlich im Zellkern und erfordert die sieben LSM-Proteine. Neben den snRNAs sind ca. 200 - 300 zusätzliche spezifische und assoziierte Proteine am Spleißvorgang beteiligt. Der präzise Spleißprozess erfolgt an konservierten Bereichen, der 5'-Spleißstelle, der 3'-Spleißstelle und einem intronischen Adenosin als Verzweigungsstelle. Die Verzweigungsstelle ist von der Konsensussequenz YNCURAC umgeben und befindet sich in der Regel etwa 20–40 Nukleotide stromaufwärts vor der 3'-Spleißstelle. Die Introns höherer Eukaryoten enthalten in dieser Region häufig pyrimidinreiche Sequenzen (Polypyrimidintrakt). Das komplexe Spleißosom sorgt für die korrekte Erkennung der Spleißstellen, die durch Konsensus-Sequenzen markiert sind. Die GT-AG-Regel besagt, dass Introns als Erkennungsstelle am 5'-Terminus ein GU-Dinukleotid (5'-Spleißstelle) und am 3'-Terminus ein AG-Dinukleotid (3'-Spleißstelle) besitzen. Weiterhin dienen regulatorische Sequenzelemente in Introns und Exons, die Purin- oder CA-reiche Sequenzen beinhalten, als Spleiß-Enhancer (ESE/ISE) oder Silencer (ESS/ISS). Die Regulation des Spleißprozesses erfolgt durch hnRNPs, Kinasen, Phosphatasen, SR-Proteinen, Cyclophiline und durch die Ausbildung sekundärer Strukturen der RNA, die die Effizienz oder die Benutzung bestimmter Spleißstellen bestimmen (Blencowe, 2000; Black, 2003; Stamm, 2008). Zusätzlich besitzen Proteine im Spleißprozess RNA-Helikase-Aktivität, wie die humane RNA-Helikase I (Krämer, 1996).

Abbildung 1.7 zeigt den etappenweisen Zusammenbau des Spleißosoms (Will und Lührmann, 2001; Graveley, 2000; Krämer, 1996). Im ersten Schritt erfolgt die Energie-unabhängige Bindung von U1 snRNP an die 5'-Spleißstelle, die durch Spleißfaktoren, sog. SR-Proteine, vermittelt wird. Dabei geht die U1 snRNA Basenpaarungen mit der prä-mRNA ein. Danach erfolgt die Bindung des Protein-Heterodimers U2AF (U2 auxiliary factor, bestehend aus U2AF35 und U2AF65) an den Polypyrimidintrakt (Bildung des E-Komplexes, 'early presplicing complex'). Die RS-Domäne von U2AF65 führt zu einer Neutralisierung der negativ geladenen Phosphate der prä-mRNA, wodurch die Ausbildung von Basenpaarungen der U2 snRNA mit der Verzweigungsstelle erleichtert wird. In einem ATP-abhängigen Schritt lagert sich das U2 snRNP an den Bereich der Verzweigungsstelle im Intron an und die Stabilisierung des Komplexes wird durch die Bindung verschiedener U2 snRNP Untereinheiten an den Polypyrimidintrakt erreicht. Daraus resultiert der Zusammenbau des Spleißosoms. Dieser A-Komplex beinhaltet SR-Spleißfaktoren, die U1 snRNP und U2AF in räumliche Nähe zueinander bringen. Der vorerst inaktive B-Komplex wird durch den

Spleißfaktoren-vermittelten Eintritt des trimeren snRNPs bestehend aus U4/U6·U5 snRNP gebildet (Rosigno und Garcia-Blanco, 1995). Danach werden die Komponenten neu arrangiert wodurch es zu Destabilisierungen bzw. Umstrukturierungen kommt. Im nächsten Schritt ersetzt das U6 snRNP das U1 snRNP an der 5'-Spleißstelle und verdrängt den Inhibitor U4 snRNP. Durch diesen ATP-abhängigen Schritt verlassen U1, U4 und weitere Proteine die Struktur. U5 snRNP bindet an die prä-mRNA und überbrückt die zwei Spleißstellen, wodurch alles in räumliche Nähe zueinander gebracht wird. Dies führt dazu, dass das katalytische Zentrum aus je einer Helix aus U2 snRNP und U6 snRNP durch Basenpaarungen ausgebildet wird. Man spricht von einem aktivierten Spleißosom bzw. vom C-Komplex. Nun erfolgt die erste Transferreaktion, die von dem Dimer U6/U2 katalysiert wird. Durch den nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxygruppe an der Adenosin-Verzweigungsstelle wird eine Phosphodiester-Bindung an der 5'-Spleißstelle gelöst. Das 5'-terminale Nukleotid des Introns klappt zur Verzweigungsstelle und wird über eine 2'5'-Phosphodiesterbindung kovalent mit dem Verzweigungsnukleotid verknüpft. Es entsteht ein freies 3'-Ende des ersten Exons und die typische Lariat-Zwischenform wird gebildet. Infolgedessen befindet sich nun U5 snRNP an der 3'-Spleißstelle. Die zweite Transferreaktion erfolgt durch nukleophilen Angriff der freigewordenen 3'-Hydroxygruppe des ersten Exons auf die 3'5'-Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle vor dem zweiten Exon. Die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung verursacht die Freisetzung der gespleißten mRNA, die in hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoprotein particles) verpackt wird. Es verbleibt ein post-spleißosomaler Intron-Komplex. Das Spleißosom zerfällt und die U snRNPs werden freigesetzt und für einen neuen Spleißzyklus bereitgestellt (Krämer, 1996; Graveley, 2000; Li et al., 2007; Long und Cáceres, 2009).

Einleitung

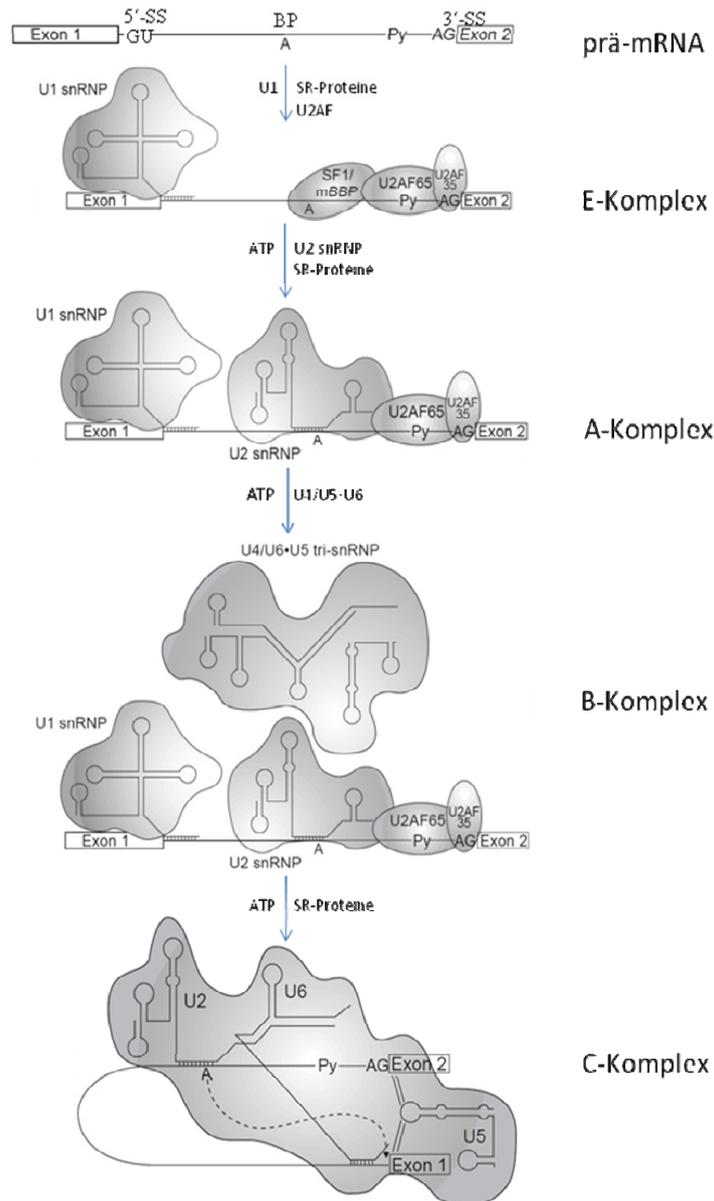


Abbildung 1.7. **Schematische Darstellung des Spleißvorgangs:** Die Bindung von U1 snRNP initiiert die Spleißreaktion. U2 snRNP bindet an die Verzweigungsstelle durch komplementäre Basenpaarungen. Durch die Bindung des U4/U6·U5 snRNP-Komplexes erfolgt die erste Transesterreaktion, wobei das 5'-Ende des Introns mit dem Adenosin in der Verzweigungsstelle durch eine 2'5'-Phosphodiesterbindung verknüpft wird. Beide Exons werden durch eine zweite Umesterung miteinander verbunden und das Intron als Lariat freigesetzt. Quelle: modifiziert nach Graveley, 2000, mit Genehmigung vom Copyright Clearance Center (3110250)

Der evolutionäre Sinn des alternativen Spleißens liegt nicht nur darin, neue Proteine durch das Rearrangieren der Elemente zu generieren, sondern es ermöglicht auch die Produktion einer Serie von verwandten Proteinen. Diese können dann zell- oder entwicklungspezifisch exprimiert werden. Damit stellt das alternative Spleißen einen wichtigen Schritt bei der Regulation der Genexpression dar (Xiao und Lee, 2010). Beispielsweise werden durch das alternative Spleißen der 22000-24000

menschlichen Gene bis zu einer Million verschiedene Proteine generiert. Dies wird durch verschiedene Formen des alternativen Spleißens ermöglicht (Abbildung 1.8). So können beispielsweise Exons übersprungen werden, wohingegen in Pflanzen und Pilzen oft Introns beibehalten werden. Durch die alternative Wahl von Spleißstellen, Verwendung verschiedener Promotoren und Terminationsstellen kann aus einem Gen eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs entstehen (Li et al., 2007).

Als Beispiel für das alternative Spleißen ist bei *Drosophila* das Membranprotein dSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule) zu nennen. dSCAM ist wichtig für die Entwicklung des Nervensystems und die neuronale Vernetzung. Durch alternatives Spleißen der vier Genkassetten können bis zu 38016 dSCAM-Isoformen entstehen (Soba et al., 2007). Auch die Komponenten die die Geschlechtsdetermination der Fliege regulieren, werden alternativ gespleißt. Dabei wird das geschlechtsspezifische *doublesex* prä-mRNA-Spleißen von *transformer* reguliert, das seinerseits von *sex-lethal* kontrolliert wird (Black, 2003). Dabei entscheidet das Vorhandensein bzw. die Menge eines Proteins über das geschlechtsspezifische Spleißresultat.

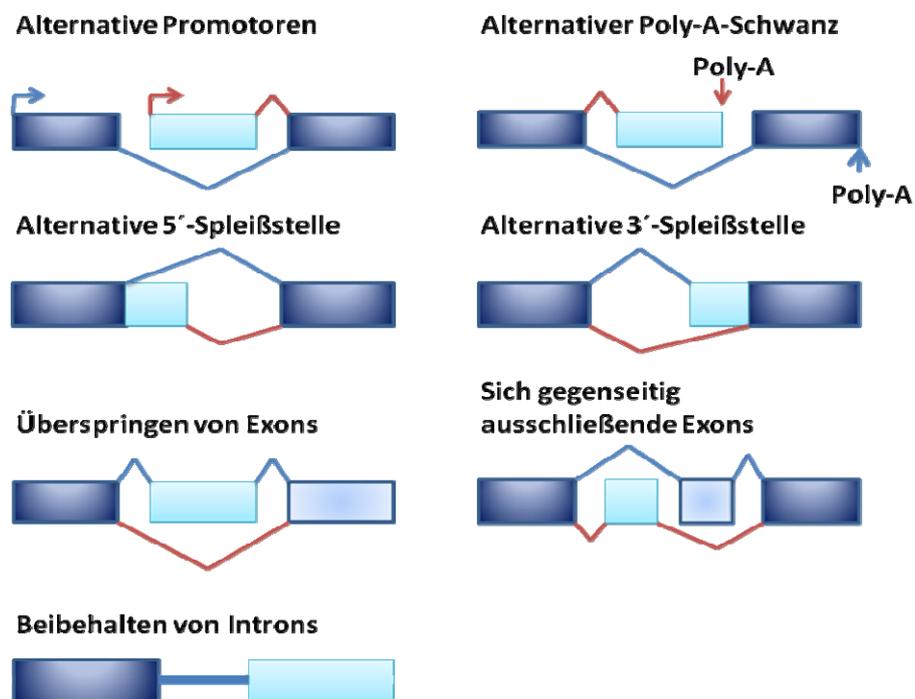


Abbildung 1.8. **Formen des alternativen Spleißens:** Durch verschiedene Möglichkeiten bei der Auswahl von Elementen wird die Proteindiversität erhöht.

1.6 Struktur und Funktion von SR-Proteinen

Die Mitglieder der Serin/Arginin-reichen Proteinfamilie (SR-Proteine) und SR-verwandte Proteine (SR protein related polypeptides) sind ebenfalls in den Spleißprozess involviert. SR-Proteine üben multiple Funktionen bei Spleißvorgängen aus, wie die Regulation des konstitutiven und alternativen Spleißens durch die Rekrutierung von Spleißfaktoren während des Zusammenbaus des Spleißosoms (Ge und Manley, 1990; Krainer et al., 1990; Zahler et al., 1992; Fu, 1995; Manley und Tacke, 1996; Will und Lührmann, 1997; Graveley, 2000; Bourgeois et al., 2004). Die hochkonservierte Proteinfamilie der SR-Proteine besitzt eine charakteristische strukturelle Organisation. N-Terminal besitzen sie eine oder zwei RNA-Bindungsdomänen (RNA recognition motif), die ihnen eine Interaktion mit der prä-mRNA ermöglichen. Dabei sind die RNA-Erkennungsmotive aus vier antiparallelen β -Faltblattstrukturen und zwei α -Helices aufgebaut (Cáceres und Krainer, 1993). C-Terminal besitzen SR-Proteine eine RS-Domäne mit unterschiedlicher Anzahl an Arginin/Serin-Dipeptiden, wobei die Serine extensiv phosphoryliert werden können. Durch Phosphorylierung erfolgt beispielsweise eine Konformationsänderung, die die Protein-Protein-Interaktion moduliert. Dabei entscheidet der Grad der Phosphorylierung über ihre zelluläre Lokalisation (Abbildung 1.9 und Abbildung 1.10) und letztlich stellt dies eine Regulationsmöglichkeit der Spleißreaktion dar (Gui et al., 1994; Colwill et al., 1996; Krämer, 1996; Manley und Tacke, 1996; Xiao und Manley, 1997; Graveley, 2000; Bourgeois et al., 2004). Werden SR-Proteine im Zytoplasma phosphoryliert, erfolgt der Import in den Zellkern wo sie in nukleären Speicherorten ('Speckles') gelagert, oder gleich für Spleißreaktionen rekrutiert werden (Misteli et al., 1998; Yeakley et al., 1999). Nach dem Spleißvorgang können sie wieder ins Zytoplasma exportiert (shuttling Proteine: h9G8, hSRp20 und hSF2/ASF, dRBP1), oder wieder in 'Speckles' gelagert werden (kein shuttling Protein: dSF2; Roth et al., 1991; Gui et al., 1994; Colwill et al., 1996; Cáceres et al., 1998; Misteli et al., 1998; Yeakley et al., 1999; Allemand et al., 2001). Es wurden verschiedene Klassen von Kinasen beschrieben, die in der Lage sind die RS-Domänen von SR-Proteinen zu phosphorylieren: die SR-Proteinkinasen (Gui et al., 1994; Wang et al., 1998), Kinasen der Clk/Sty-Familie (cdc2 like kinases; Colwill et al., 1996; Aubol et al., 2003), CDC2-Kinase 2, GSK3 (Glycogen synthase kinase 3; Tazi et al., 2008), und die DNA Topoisomerase I (Rossi et al., 1996; Graveley, 2000). Die Phosphorylierung durch die oben genannten Kinasen bewirkt eine Regulation von Protein-Protein- bzw. Protein-RNA-Interaktionen von SR-Proteinen.

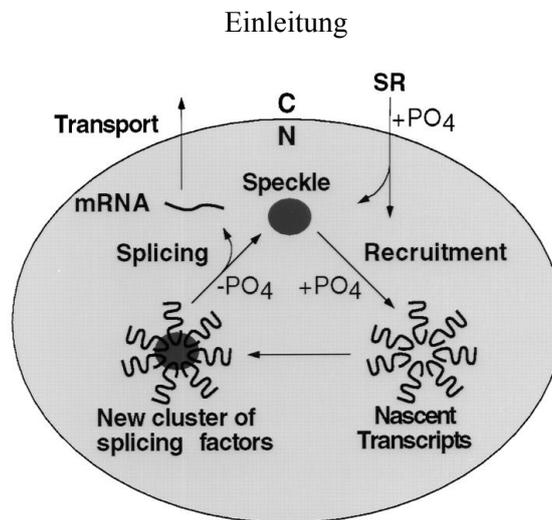


Abbildung 1.9. **Phosphorylierungsabhängige Lokalisation von SR-Proteinen:** Durch Phosphorylierungsereignisse können SR-Proteine vom Zytoplasma in den Kern importiert und in 'Speckles' gespeichert werden. Die Phosphorylierung von SR-Proteinen bewirkt eine Rekrutierung zu Orten aktiver Transkription. Quelle: Yeakley et al., 1999

Im Menschen sind bisher zehn SR-Proteine identifiziert worden: SRp20, SC35, SRp46, SRp54, SRp30c, SRp40, SRp55, SRp75, SF2/AFS und 9G8 (Krämer, 1996; Graveley, 2000). Weiterhin gibt es die SR-verwandten Proteine wie die beiden Untereinheiten des U2AFs, die 70K-Untereinheit von U1 snRNP, Spleißregulatoren, Spleiß-Coaktivatoren, RNA-Helikasen und weitere. In *Drosophila* wurden bisher acht SR-Proteine beschrieben: SC35, ASF/SF2, B52, 9G8/ x16, RBP1, RBP1-like und SRp54, die alle homolog zu den SR-Proteinen der Säuger sind (Mount und Salz, 2000; Wan et al., 2008).

Die Identifizierung der SR-Proteine erfolgte bei *in vitro* Spleißexperimenten mit S100-Extrakten aus HeLa-Zellen. Dabei enthält der S100-Zellextrakt alle Komponenten der Spleißmaschinerie, ausgenommen den SR-Proteinen. Hier konnte gezeigt werden, dass SR-Proteine essentiell für das Spleißen sind, sich aber auch in ihrer Funktion in gewissem Grad gegenseitig komplementieren können (Krainer et al., 1990; Zahler et al., 1992; Zahler et al., 1993). SR Proteine binden ko-transkriptionell an die prä-mRNA und sind an allen Schritten des Spleißosom-Zusammenbaus beteiligt (Zahler et al., 1992; Manley und Tacke, 1996; Will und Lührmann, 1997; Yeakley et al., 1999). Bei der Bildung des E-Komplexes bewirken ASF/SF2 (alternative splicing factor/ splicing factor 2) und SC35 (spliceosome component of 35kDa) die Erkennung der 5'-Spleißstelle (Wu und Maniatis, 1993; Fu, 1995). Sie vermitteln daraufhin die Bindung von U1-70K an die 5'-Spleißstelle und die Rekrutierung von U2AF35 und U2AF65 an den Polypyrimidintrakt (Graveley, 2000; Hastings und Krainer, 2001). Liegen hohe Konzentrationen von ASF2/SF2 vor, kann die Spleißreaktion sogar ohne U1 snRNP stattfinden, wobei eine Bevorzugung der proximalen 5'-

Spleißstelle erfolgt (Kohtz et al., 1994; Tarn und Steitz, 1994). Im nächsten Schritt fördert SC35 die Bindung von U2 snRNP an die Verzweigungsstelle (Hastings und Krainer, 2001). Nun kann es zu einer Brückenbildung zwischen der 5'- und 3'-Spleißstelle kommen, indem das U1 snRNP an der 5'-Spleißstelle und U2 snRNP an 3'-Spleißstelle über den Spleißfaktor U2AF verbunden werden. Mittels dieser Überbrückung werden die Spleißstellen in räumliche Nähe zueinander gebracht (Wu und Maniatis, 1993). Dieser Komplex wird durch die Rekrutierung weiterer SR-Proteine stabilisiert (Kohtz et al., 1994; Jamison et al., 1995; Xiao and Manley, 1997). Auch die Anlagerung des trimeren snRNPs U4/U6·U5 am Spleißosom wird durch SR-Proteine vermittelt (Roscigno und Garcia-Blanco, 1995, Krämer, 1996). Dabei interagieren wahrscheinlich U4/U6·U5-27K und U5-100K u.a. mit SC35 und stabilisieren den Komplex (Graveley, 2000). Auch für die Lariatbildung sind SR-Proteine bedeutend (Krämer, 1996).

Das Zusammenspiel von SR-Proteinen und Spleißfaktoren gewährleistet die Proteinvielfalt eines Organismus. Anhand von Kombinationen von SR-Proteinen und ihrer Verfügbarkeit im Zellkern können prä-mRNAs verschiedenartig gespleißt werden (Fu, 1993 und 1995; Zahler et al., 1993). Dabei steuern SR-Proteine die Wahl der alternativen 5'- bzw. 3'-Spleißstellen (Ge und Manley, 1990; Krainer et al., 1990; Fu et al., 1992; Eperon et al., 1993; Zahler et al., 1993; Zahler und Roth, 1995). SR-Proteine binden bevorzugt an Spleiß-Enhancer im Exon oder Intron und stimulieren das Spleißen. Erfolgt die Bindung an Spleiß-Silencer im Exon oder Intron wird eine Hemmung der Transkription bewirkt (Schaal und Maniatis, 1999; Blencowe, 2000; Xiao und Lee, 2010). SR-Proteine können mit hnRNPs um RNA-Bindungsstellen konkurrieren und dabei antagonistisch wirken (Hastings und Krainer, 2001). Weiterhin können SR-Proteine durch die Interaktion mit dem nukleären Rezeptor TAP/NXF1 den Export von mRNA ins Zytoplasma steuern. Liegt ASF/SF2 am Spleiß-Enhancer gebunden vor, initiiert es die 5'-Cap-abhängige Translation (Long und Cáceres, 2009).

1.7 Struktur und Funktion von Serin/Arginin-Proteinkinasen

Es konnten verschiedene Klassen von Proteinkinasen identifiziert werden, die SR-Proteine phosphorylieren können. Die SR-Proteinkinasen (SRPKs) und die Clk/Sty-Kinasen stellen die Wichtigsten dar (Colwill et al., 1996). Sie übernehmen eine regulatorische Funktion, indem sie durch die Phosphorylierung die Lokalisation und damit die Substratbindung von SR-Proteinen bestimmen (Xiao und Manley, 1997). In Abbildung 1.10 wird der phosphorylierungsabhängige Zyklus des SR-Proteins ASF/SF2 dargestellt (Stamm, 2008). Im ersten Schritt werden die SR-Protein durch SR-Proteinkinasen wie SRPK1 bzw. SRPK2 phosphoryliert (Gui et al., 1994; Colwill

et al., 1996; Kuroyanagi et al., 1998; Aubol et al., 2003). Bei der Interaktion zwischen der Bindungsfurche von SRPK1 und dem Bindungssignal von SF2 findet die Phosphorylierung der RS-Domäne von SF2 ausgehend vom C-Terminus statt. Dabei bleibt der Spleißfaktor mit der Kinase verbunden und wird anschließend freigelassen (Aubol et al., 2003; Huynh et al., 2009; Ma et al., 2009). Das hypophosphorylierte SR-Protein wird durch Transportine in den Zellkern importiert, wobei die RS-Domäne als Kernlokalisierungssignal dient, und in nukleären Speicherorten gelagert (Yeakley et al., 1999; Misteli et al., 1998; Allemand et al., 2002; Long und Cáceres, 2009). Die Hyperphosphorylierung von SR-Proteinen durch Clk/Sty-Kinasen führt zur Dissoziation aus den 'Speckles' (Gui et al., 1994; Colwill et al., 1996). Die SR-Proteine werden nun zu Orten aktiver Transkription rekrutiert und regulieren Spleißvorgänge. Die Dephosphorylierung von SR-Proteinen durch die Proteinphosphatase 1 veranlasst den Export ins Zytoplasma.

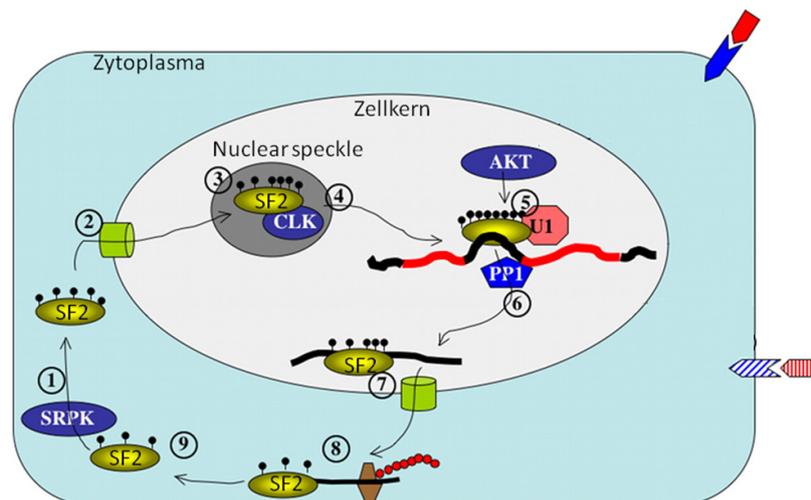


Abbildung 1.10. **Schematische Darstellung der phosphorylierungsabhängigen Lokalisation von ASF/SF2:** Die Phosphorylierung von ASF/SF2 durch SRPK1 oder SRPK2 bewirkt den Import durch Transportine in den Nucleus (1 und 2). Im Nucleus werden Spleißfaktoren in 'nuclear speckles' gelagert (3). Die Phosphorylierung durch Clk/Sty-Kinasen rekrutiert ASF/SF2 (4) zum Ort aktiver Transkription (5). In Zusammenarbeit mit dem Spleißosom beeinflusst es das konstitutive und alternative Spleißen. Dieser Schritt ist ebenfalls von Phosphorylierungsereignissen abhängig. Nach der Spleißreaktion wird ASF/SF2 durch Proteinphosphatase 1 dephosphoryliert (6) und aus dem Kern exportiert (7). Weiterhin kann ASF/SF2 durch seine Assoziation mit der mRNA die Translation positiv beeinflussen (8). Durch die erneute Phosphorylierung von SF2 beginnt der Zyklus von neuem (9). Quelle: modifiziert nach Stamm, 2008

Die zwei Kinasefamilien der Clk/Sty-Kinasen und SR-Proteinkinasen unterscheiden sich strukturell, genauso wie in ihrer Substratspezifität und in ihrer Lokalisation in der Zelle: SR-Proteinkinasen wurden im Zytoplasma und Zellkern gefunden (Wang et al., 1998), wohingegen Clk/Sty-Kinasen

nur im Zellkern lokalisieren (Colwill et al., 1996). Die hochkonservierte Familie der Clk/Sty-Kinasen oder auch LAMMER-Kinasen (aufgrund des EHLAMMERILG-Motivs in der Kinase-Subdomäne X) ist in der Lage Serine/Threonine oder auch Tyrosine zu phosphorylieren (Colwill et al., 1996). Die Clk/Sty Kinasen besitzen selbst N-Terminal eine RS-Domäne, die wichtig für ihre Interaktion mit den SR-Spleißfaktoren ist. Bei der Expression der inaktiven Form der Clk/Sty-Kinasen erfolgt die Deponierung in die nukleären 'Speckles', wohingegen die aktive Form die SR-Proteinverteilung im Zytoplasma reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass Clk/Sty-Kinasen *in vitro* Serin-Arginin, Serin-Prolin oder Serin-Lysin-Reste phosphorylieren können, wohingegen die SR-Proteinkinasen Serin-Arginin-Reste bevorzugen (Colwill et al., 1996).

SR-Proteinkinasen sind von der *Saccharomyces cerevisiae* bis zum Menschen konserviert (Gui et al., 1994; Kuroyanagi et al., 1998; Tang et al., 1998; Wang et al., 1998; Siebel et al., 1999; Adams et al., 2000; Mount und Salz, 2000; Tang et al., 2000; Lukasiewicz et al., 2007; Stojdl und Bell, 1999). Dies zeigte sich bei Komplementierungsversuchen zwischen verschiedenen Organismen. Beispielsweise kann die humane SRPK1 die Funktion der Dsk1-Kinase in *Schizosaccharomyces pombe* übernehmen (Tang et al., 2000). Weiterhin zeichnen sich die Mitglieder der SR-Proteinkinasen durch eine charakteristische zweigeteilte Kinasedomäne aus. Dabei ist der dazwischenliegende nicht-konservierte Spacer für die Lokalisation der Kinasen im Zytoplasma ausschlaggebend (Ding et al., 2006). Dies konnte bei Experimenten gezeigt werden, bei denen die Deletion des Spacers von SRPK1 eine Translokation der Kinase in den Zellkern bewirkte (Ding et al., 2006). Für SRPK1 konnte gezeigt werden, dass es durch die Phosphorylierung des SR-Proteins Acinus Cyclin A1 reguliert. Eine Überexpression von SRPK1 oder Acinus fördert die Proliferation und kann in einigen Leukämiepatienten gefunden werden. Somit sind die SR-Proteinkinasen auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Jang et al., 2008).

In Säugern gibt es drei Gene die für SR-Proteinkinasen (*Srpkl-3*). SRPK1 und SRPK2 zeigen ein breites Expressionsmuster, wohingegen SRPK3 im Herz, in Somiten und der Skelettmuskulatur exprimiert wird und oft als muskelspezifische Proteinkinase bezeichnet wird (Nakagawa et al., 2005). Die Mutation von SRPK3 verursacht eine Form der Myopathie bei der Maus (Nakagawa et al., 2005). Die meisten SR-Proteinkinasen lokalisieren hauptsächlich im Zytoplasma, jedoch wurde beispielsweise SRPK2 auch im Nukleus gefunden (Wang et al., 1998; Kuroyanagi et al., 1998; Papoutsopoulou et al., 1999; Koizumi et al., 1999; Ding et al., 2006; Mathew et al., 2008). Bei Studien in HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass SRPK1 mit dem U1 snRNP und SRPK2 mit dem U4/U5·U6 snRNP assoziiert vorliegen und dadurch Spleißprozesse mitregulieren können (Mathew et al., 2008).

Werden die Kinasen SRPK1 und Clk/Sty1 in HeLa-Zellen überexprimiert, kommt es zur einer Auflösung der nukleären Speicherorten und die SR-Proteine verteilen sich homogen im Zellkern (Kuroyanagi et al., 1998; Koizumi et al., 1999). Die Dephosphorylierung von SR-Proteinen führt zu einem gegenteiligen Effekt. Die Infektion von HeLa-Zellen mit dem Adenovirus bewirkt eine Anhäufung der SR-Proteine in den nukleären 'Speckles' und damit zu einer Hemmung von Spleißreaktionen (Kanopka et al., 1998). Auch eine Inhibierung von Phosphatasen beeinflusst das Spleißen negativ, da keine Umesterungen mehr stattfinden können (Stamm, 2008).

In *Drosophila* konnten vier Gene für SR-Proteinkinasen identifiziert werden, CG8565 (*Srpk2*), CG9085, CG8174 (*Srpk1*) und die CG11489 (*Srpk79D*), die im nächsten Kapitel beschrieben wird, und eine Clk/Sty-Kinase CG1658 (*Doa*; Mount und Salz, 2000; Morrison et al., 2000). *Doa* (darkener of apricot) wurde zunächst als Suppressor des copia-Retrotransposons beschrieben (Rabinow et al., 1993). Mutationen dieser Kinase sind meist rezessiv letal. Heterozygote Tiere zeigen jedoch verschiedene pleiotrophe Phänotypen in der Retina, im embryonalen Nervensystem, Segmentierungsstörungen und eine Beeinträchtigung bei der Geschlechtsdifferenzierung (Kpebe und Rabinow, 2007). Mutierte *Doa*-Allele verursachen eine Hypophosphorylierung und falsch lokalisierte SR- und SRlike-Proteine.

1.8. Die Serin/Arginin-Proteinkinase 79D (SRPK79D) in *Drosophila melanogaster*

Auf der Suche nach Mutanten, die eine Fehlverteilung des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot aufweisen, wurde eine bis dahin noch nicht charakterisierte Serin/Arginin-Proteinkinase identifiziert (Johnson et al., 2009; Nieratschker et al., 2009). Eine Mutation oder die durch RNAi-vermittelte Reduktion von SRPK79D führen zu charakteristischen Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen segmentalen und intersegmentalen Nerven. Im Wildtyp ist das Aktive Zone-Protein dagegen gleichmäßig in larvalen Nerven verteilt (Abbildung 1.11). Die Lokalisation von Bruchpilot an der Aktiven Zone wird durch das Fehlen der SRPK79D nur unwesentlich beeinträchtigt (Johnson et al., 2009; Nieratschker et al., 2009). Das Gen CG11489 liegt auf dem linken Arm des dritten Chromosoms im Abschnitt 79D. Durch die Verwendung alternativer Transkriptionsstartpunkte und einem alternativ gespleißten Exon können mindestens vier Transkripte generiert werden (Abbildung 1.12). Die SRPK79D-Transkripte RC und RF beginnen mit dem ersten Exon, und RB und RE mit dem dritten Exon. Dabei besitzen die Transkripte RF und RE das alternative Exon sieben. Wie bei allen SR-Proteinkinasen wird die Kinasedomäne von SRPK79D durch einen Spacer unterbrochen,

der bei RB und RC 155 bzw. bei RE und RF 314 Aminosäuren enthält (Abbildung 1.12). Weiterhin ist die Kinasedomäne der SRPK79D zu 65% identisch zur humanen SR-Proteinkinase SRPK3 (Grunau et al., 2000) und zu 54% zur SRPK2 (Wang et al., 1999; Koizumi et al., 1999). In einem Phosphorylierungsassay konnte gezeigt werden, dass beide SRPK79D-Isoformgruppen im Stande sind das synthetische Peptid SRPK1tide, welches zu den Aminosäuren 204 bis 218 des humanen Spleißfaktors ASF/SF2 korrespondiert, zu phosphorylieren (Nieratschker, 2008).

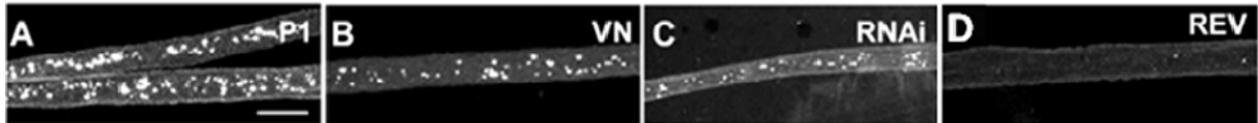


Abbildung 1.11. **Mutation oder Reduktion der SRPK79D verursacht eine Agglomeration von Bruchpilot in larvalen Motoneuronaxonen:** Die Revertante zeigt eine diffuse Verteilung des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot in den larvalen Nerven. Die *Srpk79D^{PI}*-, *Srpk79D^{VN}*- und die RNAi-Linien zeigen eine auffällige Agglomeration des Bruchpilot-Proteins. Quelle: Nieratschker et al., 2009

In der hypomorphen Mutante *Srpk79D^{PI}* wird das offene Leseraster der *Srpk79D*-RC/RF-Transkriptgruppe durch eine Insertion des P{LacW}-Elements unterbrochen (Nieratschker, 2008). Mithilfe dieser Linie konnte durch eine Jump out-Mutagenese die Nullmutante *Srpk79D^{VN}* generiert werden (Bloch, 2007; Nieratschker, 2008). Die durch das Herausspringen des P-Elements verursachte Deletion umfasst 3861 Basenpaare, wobei 23 Basenpaare des P-Elements im Genom verbleiben. Durch die Mutation werden die Transkriptions- und Translationsstartpunkte der RB/RE-Gruppe, sowie 85 Basenpaare der Kinasedomäne deletiert (Abbildung 1.12).

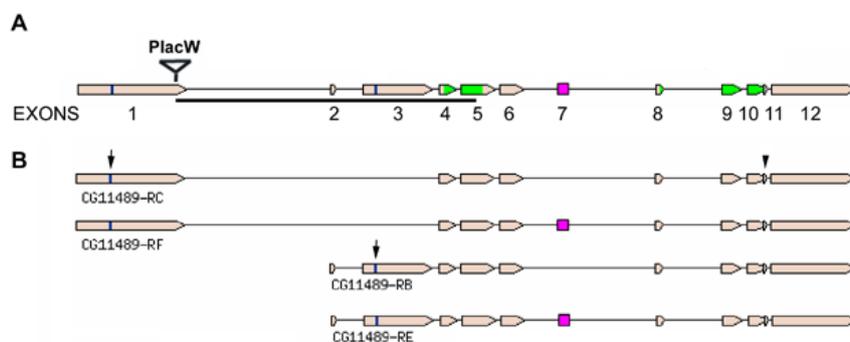


Abbildung 1.12. **Schematische Organisation des *Srpk79D*-Genlocus:** Die Transkriptionsstartpunkte sind blau, das alternativ gespleißte Exon in magenta und die Kinasedomäne in grün markiert. Der Insertionsort des P-Elements, sowie der deletierte Bereich in der *Srpk79D^{VN}*-Mutante sind eingezeichnet. Durch die Verwendung unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte können die Isoformgruppen RC/RF und RB/RE entstehen. Ab dem vierten Exon sind die Transkripte gleich. Quelle: Nieratschker et al., 2009

Die Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten aufgrund eines axonalen Transportdefekts konnte durch die immunhistochemische Färbung gegen das Cysteine string protein weitgehend ausgeschlossen werden (Nieratschker et al., 2009). Eine Überexpression von Bruchpilot führt ebenfalls zu einer Aggregation des Proteins in larvalen und adulten Nerven (Nieratschker, 2008). In Western Blot-Analysen unterschied sich die Proteinmenge von Bruchpilot zwischen Wildtyp und *Srpk79D^{P1}*-Mutante in adulten und larvalen Homogenaten nicht signifikant (Johnson et al., 2009; Nieratschker et al., 2009).

Weiterhin zeigen die *Srpk79D*-Mutanten Verhaltensdefizite, die denen der Bruchpilot-RNAi-Fliegen ähneln. Die *Srpk79D*-Mutanten besitzen eine reduzierte Lebenserwartung, eine signifikante Flugunfähigkeit, sowie Lokomotionsdefizite (Bock, 2006; Bloch, 2007). Dabei konnten in Rettungsexperimenten die Defekte in der negativen Geotaxis, in der Flugfähigkeit und in der Laufaktivität vollständig gerettet werden, die Lebensdauer der *Srpk79D*-Mutante und die Verteilung von Bruchpilot in den larvalen Nerven konnte teilweise wiederhergestellt werden (Bock, 2006; Bloch, 2007; Nieratschker, 2008). Elektronenmikroskopische Aufnahmen deckten elektronendichte Strukturen in larvalen Motoneuronaxonen auf. Diese Strukturen scheinen aus miteinander verbundenen T-bars zu bestehen, die mit klaren Vesikeln umgeben sind, integriert in einer filamentösen Matrix. In einer Immun-Elektronenmikroskopie konnte bewiesen werden, dass die Agglomerate der *Srpk79D^{VN}*-Mutante Bruchpilot enthalten (Abbildung 1.13; Jauch, in Vorbereitung). Aufgrund der Kolokalisation der SRPK79D-PC-GFP-Isoform mit Bruchpilot an der Aktiven Zone der larvalen neuromuskulären Synapse ist eine Interaktion beider Proteine denkbar, auch wenn Ko-Immunpräzipitationen keine direkte Interaktion detektieren konnten (Nieratschker, 2008; Nieratschker et al., 2009).

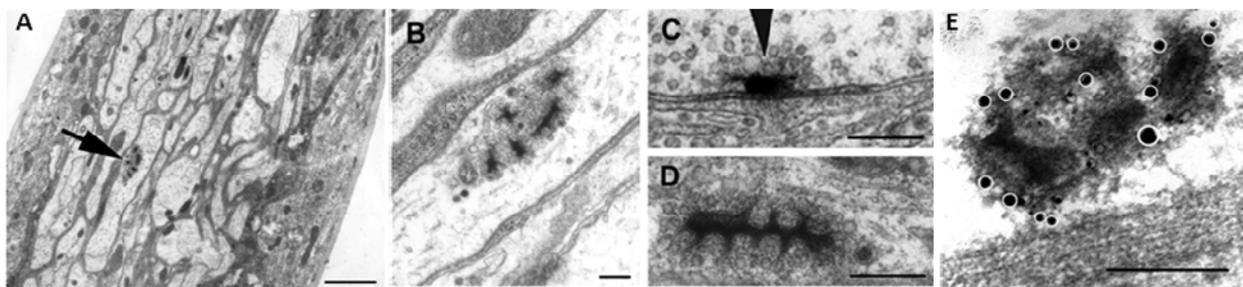


Abbildung 1.13 **Die Mutation im *Srpk79D*-Genlocus führt zu elektronendichten T-bar ähnlichen Strukturen in larvalen Nerven:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von larvalen Motoneuronaxonen zeigen elektronendichte Strukturen, die wie Ketten fusionierter T-bars aussehen und von einer filamentösen Matrix umgeben sind. Quelle: Nieratschker et al., 2009

1.9 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte die in der Arbeitsgruppe identifizierte Serin/Arginin-Proteinkinase SRPK79D näher charakterisiert werden. Die Mutation oder die durch RNAi-
verursachte Reduktion der Kinase führen zu einer Agglomeration des Aktive Zone-Proteins
Bruchpilot in larvalen segmentalen und intersegmentalen Nerven (Nieratschker, 2004; Bloch, 2007;
Nieratschker, 2008). Das Bruchpilot-Protein ist ein struktureller Bestandteil der T-bars in der
präsynaptischen Endigung, die für eine intakte Ausschüttung von Neurotransmittern notwendig sind
(Wagh et al., 2006; Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010). Die Mutation im *Srpk79D*-Gen
verursacht Verhaltensdefekte und eine verkürzte Lebensdauer, die stärker ausgeprägt auch bei der
RNAi-vermittelten Reduktion von Bruchpilot beobachtet wurden (Wagh et al., 2006; Bock, 2006;
Bloch, 2007). Zunächst sollte eine spezifische Färbung der SRPK79D mit den von V. Nieratschker
generierten Antiseren erreicht werden (Nieratschker, 2008). Dabei sollte die Minimierung des
Hintergrundsignals durch eine Präadsorption oder durch eine Affinitätsaufreinigung erfolgen.
Anhand von immunhistochemischen Färbungen sollten das Expressionsmuster und die Lokalisation
der SRPK79D in larvalen und adulten Fliegen bestimmt werden. Ebenfalls sollten die transgen
exprimierten Isoformen bei sog. Rettungsexperimenten klären, ob die beobachteten Phänotypen
aufgrund der mutierten SRPK79D verursacht werden. Die durchgeführten Rettungsexperimente im
Nullmutanten-Hintergrund sollten dann Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Isoformen
liefern. In einem weiteren Teilprojekt sollten die bei der Agglomeratbildung des Bruchpilot-
Proteins zugrunde liegenden Mechanismen untersucht werden. Anhand von verschiedenen
Experimenten auf RNA- und Proteinebene sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die
Überexpression von Bruchpilot oder ein genereller Defekt des axonalen Transports mögliche
Erklärungen für den Agglomerat-Phänotyp liefern könnten. Die Analyse des axonalen Transports
sollte durch immunhistochemische Methoden und durch die Visualisierung der Mitochondrien
erfolgen. Da SR-Proteinkinasen SR-Proteine phosphorylieren, sollten RNAi-Linien gegen die SR-
Proteine von *Drosophila* näher untersucht werden. Die Identifizierung von Interaktionspartnern
eines Proteins ermöglichen meist Rückschlüsse auf dessen Funktion. Daher sollte in dieser Arbeit
ein modifizierter Hefe-Zwei-Hybrid-Versuch durchgeführt werden, um mögliche
Interaktionspartner der SRPK79D zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Fliegenstämme

$w^{\bar{}};+;SrpK79D^{P1}$	Eberle, 1995
$w^{\bar{}};+;SrpK79D^{P2}$	DGRC
$w^{\bar{}};+;SrpK79D^{P1}$ (outcrossed)	Nieratschker V.
$w^{\bar{}};UAS-SrpK79D-RF103;SrpK79D^{P1}$	Nieratschker V.
$w^{\bar{}};UAS-SrpK79D-RF103;SrpK79D^{VN}$	Nieratschker V.
$w^{\bar{}},elav-GAL4;+;SrpK79D^{VN}$	Nieratschker V.
$w^{\bar{}},elav-GAL4;SrpK79D^{P1}$	Nieratschker V.
$w^{\bar{}};UAS-SrpK79D-RC;SrpK79D^{VN}$	Nieratschker V.
$w^{\bar{}};UAS-SrpK79D-RB;SrpK79D^{VN}$	Nieratschker V.
$UAS-SrpK79D\ RNAi$	VDRC
$UAS-Rbp1\ RNAi$	VDRC
$UAS-SF2\ RNAi$	VDRC
$UAS-Rbp1\ like\ RNAi$	VDRC
$w^{\bar{}},elav-GAL4;+;+$	Sigrist S.
$w^{\bar{}};+;nSyb\ GAL4$	Simpson J.
$w^{\bar{}};+;nSyb\ GAL4,SrpK79D^{VN}$	Schubert A.
w^{1118}	Wildtyp Kontrollstamm
$w^{\bar{}};Sp/CyO;TM2/TM6$	Balancer Stamm
$w^{\bar{}};Actin-GAL4/CyO;+$	Bloomington
$w^{\bar{}};+;UAS-SrpK79D-RC\ eGFP$	Nieratschker V.
$w^{\bar{}};+;UAS-SrpK79D-RB\ eGFP$	Nieratschker V.
$w^{\bar{}};+;UAS-SrpK79D-RC\ eGFP;UAS-GFP\ BRP$	Schubert A.
$w^{\bar{}};UAS-SrpK79D-RB\ eGFP;UAS-GFP\ BRP$	Schubert A.

<i>w⁻;UAS-Sap47 eGFP</i>	Funk N.
<i>w⁻;UAS-Syn PKA1 und 2 mutiert</i>	Michels B.
<i>w⁻;UAS-eGFP Srpk79D-RF</i>	Nieratschker V.
<i>w⁻;UAS-GFP BRP</i>	Wagh et al., 2006
<i>w⁻;+;TM3/TM6</i>	Balancer Stamm
<i>w⁻;+;Srpk79D^{VN}</i>	Nieratschker V.
<i>w⁻;+;Srpk79D^{VN284}</i>	Nieratschker V.
<i>w⁻;UAS-Brp-D3 Strawberry GAL4 OK6/CyO;+</i>	Andlauer T.
<i>w⁻;UAS-Brp-D3 Strawberry GAL4 OK6/CyO;Srpk79D^{VN}</i>	Schubert A.
<i>w⁻;UAS-Brp D1-3 Cterm GFP</i>	Sigrist S.
<i>w⁻;UAS-Brp D2-4 GFP</i>	Sigrist S.
<i>w⁻;UAS-brp-C8</i>	Sigrist S.
<i>w⁻;Dicer;+;elav-GAL4</i>	Sigrist S.
<i>w⁻;+;UAS-GFP dASF</i>	Tazi J.
<i>w⁻;Caper^{P1};+/- GSV6(GS9012)</i>	Kyoto
<i>w⁻;Caper^{P2};+/- (f05171)</i>	Exelixis
Defizienz-2L	Bloomington
<i>w⁻; UAS-Srpk79D-RB;Srpk79D^{P2}</i>	Schubert A.
Defizienz-SF2 Df(1) C246/FM6	Bloomington

2.2 *Drosophila melanogaster* Aufzucht und Haltung

Die *Drosophila* Haltung erfolgt in Plexigläsern, die mit Hefe-Nährmedium befüllt werden. Für den Futterbrei werden 212g Maismehl in 750ml Wasser aufgekocht und über Nacht quellen gelassen. Danach werden je 40g Malz und Zuckerrübensirup untergemengt und wieder aufgekocht. Anschließend wird eine Mischung aus 18,5g Trockenhefe, 7g Agar und 10g Sojamehl in 150ml Wasser angesetzt und aufgekocht. Wenn der Brei auf 80°C abgekühlt ist, wird ein Teelöffel des Fungizids Methyl-4-hydrobenzoat zugegeben. Nun kann der Brei in die Plexigläser gefüllt und mit Hefe bestreut werden. Die fertigen Gläser werden bei 4°C gelagert.

Die Fliegen werden in Klimaräumen mit 25°C oder 18°C untergebracht, die einen Tag/Nachtrhythmus von 12 Stunden und eine kontrollierte Luftfeuchtigkeit von 60% aufweisen. Das Umsetzen erfolgt alle drei Wochen. Für Verhaltensversuche werden die Versuchstiere in der 18°C Klimakammer gehalten.

2.3 Chemikalien

Alle Chemikalien werden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Merck, Serva, Sigma oder AppliChem bezogen.

2.4 Nukleotide

Alle Oligonukleotide werden von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH, Ebersberg synthetisiert.

BglI sense	5'AGCACAGCCTGTTTGGC3'
ClaI anti	5'AAAATCGATTTAGACGAACTCCT3'
P487 sense	5'CGGCCGGCATATGTAGTAGT3'
P487 anti	5'TACAGACTGACGAATGGGC3'
Screen Jo 1. Exon klein anti	5'GCGGATTATGTTACGCACCT3'
Screen Jo 1. Exon klein sense	5'CACAGCCATCCCCTGTTACT3'
1. Intron n. P anti	5'TGTGTCACTCAGAAATGGAACC3'
1. Intron n. P sense	5'CGATATCGTTGTCCCTATTTGG3'
Intron 1 left	5'GCCAAAGACTGCGACCTAAC3'
Intron 1 right	5'GGCGACCTTGACTTTCGTAG3'
RB sense	5'GAAATGGATGAACTTTGGCTCG3'
RB anti	5'CGGGATTATGTTACGGCACCT3'
6PP anti	5'GCGGATTATGTTACGCACCT3'
Sos 5' Primer	5'CCAAGACCAGGTACCATG3'
Sos 3' Primer	5'GCCAGGTTTTCCAGT3'

Material und Methoden

Myr 5' Primer	5'ACTACTAGCAGCTGTAATAC3'
Myr 3' Primer	5'CGTGAATGTAAGCGTGACAT3'
M13 Primer forward	5'GTTTTCCCAGTCACGAC3'
M13 Primer reverse	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'
BRP 100bp sense	5'CACCATCTGCCATACTCGAA3'
BRP 100bp anti	5'GGATAGCGTGTCTACGTCA3'
BRP hinten 100bp sense	5'ACGCTCATGGAAGTGGAGA3'
BRP hinten 100bp anti	5'GCACCTCCATCTCGATCTT3'
BRP 500bp RT	5'TCCATACTACCGCGACATGG3'
BRP 500bp RT	5'GACTGTACTTGGCGCTCTCC3'
SRPK79D-VN100rev	5'GCGGATTATGTTACGCACCT3'
SRPK79D-ex3-fwd	5'CTGGACCACTGGTTGGATCT3'
G6PD sense	5'ATGACGGACGCACTGGCTTCGAGCTGC3'
G6PD anti	5'AGCTTCTGCACCATCTCCTTGCCCAGG3'
RpLP0 sense	5'CAGCGTGGAAGGCTCAGTA3'
RpLP0 anti	5'AGAACATCCGTACCAGCCTG3'
SF2 SacI	5'GAGCTCTTAATAGTTAGAACGTGAGC3'
SF2 XhoI	5'CTCGAGTATGGGATCACGC3'

2.5 Antikörper

nc82	1:100	Hofbauer A.
3c11	1:50	Hofbauer A.
nc46	1:200	Hofbauer A.
ab49	1:100	Hofbauer A.
Alexa488 Fluor-goat α -mouse	1:1000	Invitrogen
Alexa488 Fluor-goat α -rabbit	1:1000	Invitrogen
Alexa488 Fluor-goat α -guinea pig	1:1000	Invitrogen

Material und Methoden

Alexa488 Fluor-goat- α -rat	1:1000	Invitrogen
Cy3-goat α -rabbit	1:1000	Invitrogen
Cy3-goat α -mouse	1:1000	Invitrogen
Cy3-goat α -guinea pig	1:1000	Invitrogen
HRP-Conjugate α -rabbit	1:1000	Invitrogen
HRP-Conjugate α -mouse	1:1000	Invitrogen
HRP-Conjugate α -guinea pig	1:1000	Invitrogen
α GFP α -rabbit	1:1000	Invitrogen
Peptidantikörper 16, 17, 18, 19	1:100-1:1000	Nieratschker V.
SF2	1:1000	Tazi J.
Rab3	1:1000	DiAntonio A.
Liprin- α	1:1000	Sigrist S.
SUK	1:100	DSHB
SV	1:100	DSHB
Penta-His-Antikörper	1:1000	QIAGEN
Synaptotagmin	1:1000	Invitrogen
vGlut	1:1000	Aberle H.
GluIIR	1:5000	DiAntonio A.
Syntaxin	1:1000	Invitrogen
Phalloidin	1:200	Invitrogen
BRP D2	1:1000	Sigrist S.
BRP Nterm	1:1000	Sigrist S.
G-Antiserum	1:1000	Nieratschker V.
K-Antiserum	1:1000	Nieratschker V.
MioTracker [®] Green FM		Invitrogen
Rbp1/Rbp1-like	1:200	Lopez J.
B52	1:500	Tazi J.

Material und Methoden

Dlg	1:500	Sigrist S.
Syd-1	1:1000	Sigrist S.
GluRII	1:1000	Sigrist S.

2.6 Enzyme

Enzyme werden von Fermentas, Roche und Invitrogen bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.7 Vektoren

pET28a (+)	Novagen
pSos	Stratagene
pMyr	Stratagene
CytoTrap XR Adult <i>Drosophila</i> cDNA Bibliothek	Stratagene
pGEM	Promega

2.8 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1 blue	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21	BIOLINE

2.9 Hefestämme

<i>S. cerevisiae</i> cdc25Ha	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i> cdc25Ha	Stratagene

2.10 Antibiotika

Ampicillin	50mg/ml in ddH ₂ O
------------	-------------------------------

Chloramphenicol	50mg/ml in Ethanol
Kanamycin	10mg/ml in ddH ₂ O
IPTG	100mM in ddH ₂ O

2.11 Methoden auf DNA-Ebene

2.11.1 DNA-Extraktion aus einer adulten *Drosophila* Fliege

Eine adulte Fliege wird in 50µl Single Fly-Homogenisierungspuffer (10mM Tris (pH 8,2), 1mM EDTA, 25mM NaCl in ddH₂O, bei 4°C lagern), der 0,5µl Proteinase K (1:100, Roche) enthält, homogenisiert. Der Proteinverdau erfolgt in der 30-minütigen Inkubationszeit bei 37°C. Zur Deaktivierung der Proteinase K wird das Homogenat für zwei Minuten auf 96°C erhitzt. Nach der Zentrifugation befindet sich die DNA im Überstand.

2.11.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren mit dem Nukleinsäureabschnitte amplifiziert werden können. Ebenfalls ist es möglich mit Hilfe einer PCR Restriktionsschnittstellen an eine Sequenz anzufügen. Es werden zwei Primer benötigt, die komplementär zum 5' bzw. 3'-Ende des zu synthetisierenden Fragments sind. Ausgangspunkt der DNA-Synthese ist eine DNA-Matrize. Die DNA-Synthese setzt sich aus drei verschiedenen Phasen mit unterschiedlichen Temperaturen zusammen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA denaturiert (95°C), sodass nun einzelsträngige DNA vorliegt (Denaturierungsphase). Nun wird die Temperatur gesenkt und das im Überschuss vorliegende Primerpaar kann mit der Ziel-DNA hybridisieren (Anlagerungsphase). Anschließend wird die Temperatur auf 72°C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen DNA-Polymerase erhöht, sodass die Polymerase die Primer erkennt und einen komplementären Strang synthetisieren kann (Elongationsphase). Die Vermehrung der Amplifikate erfolgt bei dieser Methode exponentiell, wobei die Zyklen bis zu 35 Mal wiederholt werden können. Nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgt eine finale zehnmütige Synthesephase, in der die Matrizen in doppelsträngige Produkte überführt werden. Aufgrund der vorhandenen Fähigkeit zur Korrektur wird die PhusionTM High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet.

Der verwendete PCR-Ansatz ist wie folgt:

- 2µl Primer sense (10µM, Eurofins MWG Operon)
- 2µl Primer anti (10µM, Eurofins MWG Operon)
- 3-5µl ddH₂O
- 3-5µl DNA
- 0,5µl DMSO (Finnzymes)
- 38µl High Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes)

50µl Gesamtvolumen

2.11.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren, sowie die optische Dichte von Suspensionen werden mit Hilfe des Spektralphotometers (Eppendorf) gemessen. Bei Nukleinsäuren liegt das Absorptionsmaximum bei 260nm. Als Referenzwert dient bei Nukleinsäuren doppelt-destilliertes Wasser, bei Suspensionen das verwendete Medium. Nachdem der Referenzwert gemessen wurde, wird die Probe in eine Küvette pipettiert und die Konzentration oder die optische Dichte der Probe kann bestimmt werden. Zur Messung von Verunreinigungen der DNA mit Proteinen wird die Absorption bei 280nm gemessen. Das Verhältnis von 260nm zu 280nm sollte für reine DNA bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, Restriktionsverdauung usw.) wird die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Für die Herstellung des Agarosegels (1% bzw. 2% Agarose) wird die Agarose in 1x TBE Puffer (500mM Tris/ HCl, 500mM Borsäure, 25mM EDTA, in 1l dH₂O; pH 8,0) aufgekocht. Ist das Gel auf 60-70°C abgekühlt wird Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert während der Elektrophorese in die DNA, sodass diese im Anschluss unter UV-Licht sichtbar wird. Diese Mischung wird dann in den dafür vorgesehenen Gelschlitten gegossen. Das ausgekühlte Gel wird in eine Gelkammer gelegt und mit 1x TBE Puffer überschichtet. Die DNA-Proben werden mit Beladungspuffer (GelPilot[®] DNA Loading Dye, QIAGEN) versetzt und in die Geltasche pipettiert. Der Beladungspuffer erhöht die Dichte der Probe, wodurch sie in die Geltasche absinkt. Eine Abschätzung des Elektrophoresevorgangs

ermöglichen die Farbstoffe im Beladungspuffer, die proportional zur Proben-DNA laufen. Ebenfalls wird ein Größenmarker (1kb DNA ladder, Fermentas) in eine Tasche pipettiert. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 180V wandert die DNA, welche aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen ist, proportional ihres Molekulargewichts zur Anode. Die Agarosegele werden nach Beendigung der Gelelektrophorese unter UV-Licht ausgewertet.

2.11.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte werden direkt nach der PCR entsprechend dem Protokoll des QIAquick[®] PCR-Purification Kits von QIAGEN aufgereinigt. Gelextraktionen erfolgen entsprechend den Herstellerangaben des QIAEXII Gel Extraction Kits (QIAGEN).

2.11.6 DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktionen werden von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH durchgeführt. Die Probe wird entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet.

2.11.7 Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung von Plasmidkonstrukten werden diese mit Restriktionsenzymen geschnitten. Restriktionsenzyme schneiden an definierten Palindromsequenzen, diese invertierten Wiederholungen sind auf den komplementären Strängen sowohl in 3'→5' als auch 5'→3' gleich.

Restriktionsansatz:

- Plasmid-DNA
- 1x Reaktionspuffer
- maximal 10% Restriktionsenzym
- ddH₂O

Gesamtvolumen 20µl

Dieser Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe des Beladungspuffers (GelPilot[®] DNA Loading Dye, QIAGEN) beendet.

Wenn eine Probe mit zwei verschiedenen Enzymen verdaut werden muss, bei einem sogenannten Doppelverdau, und die eingesetzten Enzyme unter verschiedenen Pufferbedingungen aktiv sind, wird die Probe dazwischen umgepuffert:

- 1:1 Verhältnis von Probe zu Isopropanol
- 15-minütige Zentrifugation bei 13000rpm
- 70µl 70%iges Ethanol
- 10-minütige Zentrifugation bei 13000rpm
- Pellet trocknen, in ddH₂O lösen

Im Anschluss daran können anhand einer Agarose-Gelelektrophorese die Fragmente analysiert werden. Restriktionsverdauten Vektoren werden vor einer Ligation mit CIAP (calf intestine alkaline phosphatase, Fermentas) dephosphoryliert, womit eine Religation des leeren Vektors verhindert wird. Das zu ligierende Insert stellt später die erforderliche 5'-Phosphatgruppe für die Verknüpfung zur Verfügung. Die alkalische Phosphatase wird durch 15-minütiges Erhitzen auf 65°C deaktiviert.

2.11.8 Ligation

Die Ligation eines Inserts mit einem linearisierten, dephosphorylierten Vektor wird mit der T4 DNA Ligase von Fermentas durchgeführt. Dabei wird die Reaktion nach Herstellerangaben angesetzt und bei 18°C über Nacht oder bei 22°C zwei Stunden lang inkubiert. Es wird meist ein 3:1 Verhältnis von Insert zu Vektor eingesetzt. Zur Deaktivierung der T4 Ligase wird die Reaktion abschließend für zehn Minuten auf 65°C erhitzt.

2.12 Methoden auf RNA-Ebene

2.12.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt mittels des RNeasy Mini-Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Alle Arbeitsschritte erfolgen, soweit nicht anders angegeben, auf Eis. Nach der Isolierung der RNA wird die genomische DNA durch Zugabe von 1µl DNase (DNase, RNase free, Roche) für eine Stunde bei 37°C verdaut. Abgestoppt wird der Verdau durch zehnminütiges Erhitzen auf 95°C. Die RNA wird mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

2.12.2 Reverse Transkription der mRNA

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA erfolgt mit dem SuperScript™ II Verfahren von Fermentas. Um eine Primer-Bindung zu erhalten, werden 16µl mRNA mit je 1µl Oligo-dT Primer (Fermentas) und dNTPs (Fermentas) für fünf Minuten bei 65°C inkubiert, danach auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Anschließend werden 4µl 5x First Standard Puffer und 2µl DTT hinzu gegeben und der Ansatz wird für zwei Minuten bei 42°C vorinkubiert. Für die reverse Transkription wird 1µl reverse Transkriptase in das Reaktionsgefäß pipettiert und der Reaktionsansatz wird für 90 Minuten bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit erkennt die reverse Transkriptase den an die poly-A RNA hybridisierten Oligo dT-Primer, bindet an ihn und synthetisiert ausgehend davon den komplementären Strang. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch zehninütiges Erhitzen auf 70°C. Die enthaltene RNA wird durch Zugabe von 1µl RNase (RNase, DNase free, Roche) bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C verdaut.

2.12.3 Semiquantitative RT-PCR

Um Transkriptionsunterschiede eines Gens auf RNA-Ebene detektieren zu können, wird eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die nach der RNA-Isolierung erhaltene RNA wird in cDNA umgeschrieben. Durch Verwendung unterschiedlicher Zyklenzahlen kann ein Unterschied in der Expressionsstärke eines Gens detektieren werden. Dabei lässt sich der Unterschied am besten während der linearen Phase der Amplifikation feststellen, daher werden 25, 28, 31 und 34 Zyklen analysiert.

Es wird folgender PCR-Ansatz eingesetzt:

- 5µl cDNA
- 1µl Primer sense
- 1µl Primer anti
- 8µl ddH₂O
- 34µl Thermo-Start Mastermix (ABgene)
- 1µl DMSO

50µl Gesamtvolumen

Das Thermocycler Programm lautet wie folgt:

Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	1 min	} 25, 28, 31 und 34 Zyklen
Primer-Annealing	55-58°C	1 min	
Elongation	72°C	1-3 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Danach werden die Proben mit dem GelPilot® DNA Loading Dye (QIAGEN) versetzt und mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet.

2.12.4 Real Time-PCR

Die Real Time-PCR dient zur Vervielfältigung von cDNA mit gleichzeitiger Quantifizierung. Die PCR wird in Anwesenheit des SYBR Green Fluoreszenzfarbstoffs (Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit, QIAGEN) durchgeführt, der in die doppelsträngige DNA interkaliert. Am Ende jedes Zyklus wird die Fluoreszenz der gebildeten doppelsträngigen DNA gemessen, wodurch sich eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung ergibt. Dabei erfolgt eine Zunahme der Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte. Während der Denaturierungsphase wird der Farbstoff wieder freigesetzt und ein neuer Zyklus kann beginnen. Die Spezifität des PCR-Produkts wird durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Dabei wird die DNA bei einer Temperatur ansteigend von 60°C auf 95°C aufgeschmolzen, der Farbstoff wird freigesetzt und die Fluoreszenz wird registriert. Bei einem spezifischen Signal ergibt sich nur ein Schmelzpunkt. Als Referenzwert zum Zielgen dient standardmäßig ein Haushaltsgen, bei diesem Versuch wird das ribosomale Protein LP0 verwendet. Somit können die relativen Werte für Mutante und Wildtyp relativ miteinander verglichen werden.

Die Fluoreszenzmessung für die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgt zu Beginn der exponentiellen Phase. Hier wird ein Schwellenwert festgelegt, der so genannte C_T -Wert (cycle threshold), der das Erreichen des Schwellenwerts in einem Zyklus anzeigt. Die Auswertung erfolgt nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Pfaffl et al., 2009). Der ΔC_T -Wert zeigt die Transkriptionsmenge des Zielgens normiert auf die Transkriptmenge des Referenzgens an. Für Mutante und Kontrolle werden folgende Werte bestimmt: ΔC_{T1} bzw. $\Delta C_{T2} = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$

Der $\Delta\Delta C_T$ Wert wird durch $\Delta C_{T1} - \Delta C_{T2}$ berechnet. Die relative Quantität berechnet sich aus $2^{-\Delta\Delta C_T}$ und gibt die Menge relativ zur Kontrolle an. Die Auswertung und die Statistik wird mit dem REST Programm (Relative Expression Software tool, www.gene-quantification.de/Rest.html) und Excel durchgeführt.

- 5 μ l cDNA
- 12,5 μ l PCR Reaktionsmix (10x Reaktionspuffer, dNTPs, HotStar Taq Plus DNA Polymerase, SYBR Green I, RNase freies dH₂O)
- 1,5 μ l Primer sense
- 1,5 μ l Primer anti
- 4,5 μ l dH₂O

Gesamtvolumen: 25 μ l

2.13 Proteinbiochemische Methoden

2.13.1 Proteinisolierung aus adulten Fliegenköpfen

Die mit CO₂ betäubten Fliegen werden mit einer Rasierklinge dekapitiert, in NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (Invitrogen) versetzt mit 1 μ l DTT, welches die Disulfidbrücken von Proteinen reduziert, homogenisiert. Danach werden die Proteine bei 70°C für zehn Minuten denaturiert und anhand eines Western Blots analysiert.

2.13.2 Proteinisolierung mittels Immunpräzipitation

Um Fliegen auf Proteinebene untersuchen zu können, wird eine Proteinanreicherung mittels Immunpräzipitation durchgeführt. Es werden 500 μ l Larven bzw. Puppen und bis zu 15ml Fliegen gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die adulten Fliegen werden durch feinmaschige Siebe dekapitiert. Die Fliegenköpfe werden in 800 μ l gekühltem Lysispuffer (25mM Tris, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 10% Glycerol, 0,1% NP-40; pH 7,5, auf 4°C lagern) homogenisiert, in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert. Larven bzw. Puppen werden in 500 μ l Puffer homogenisiert und abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 40 Minuten bei 4°C auf dem Nutator lysiert. Nach einer 30-

minütigen Zentrifugation bei 4°C wird der Überstand in ein neues, gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Ansatz werden 500µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (5ml IP-Puffer, 5µl Antipain, 50µl Aprotinin, 5µl Leupeptin, 5µl Pepstatin, 10µl PMSF, auf 4°C lagern) und einer complete Mini Tablette (Roche) pipettiert. Der Antikörper wird zugegeben und für eine Stunde auf dem Nutator inkubiert. Anschließend werden 100µl Protein G-Agarose in das Reaktionsgefäß pipettiert und über Nacht auf dem Nutator rotiert. Die Protein G-Agarose bindet unspezifisch Immunglobuline, an denen das Antigen gebunden vorliegt. Am nächsten Tag werden die Agarose-Beads dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Zum Schluss wird das Pellet in 40µl NuPAGE® LDS Sample Buffer der mit 4µl DTT versetzt ist, aufgenommen. Zur Proteindenaturierung wird der Ansatz zehn Minuten bei 70°C aufgekocht und ein Western Blot kann durchgeführt werden.

2.13.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins wird auf die SDS-PAGE zurückgegriffen. Die Auftrennung erfolgt nach einem diskontinuierlichen, denaturierenden Verfahren. Das im Gel enthaltene Natriumdodecylsulfat, ein negatives Detergenz, überlagert die vorherrschende Proteinladung, wodurch die Proteinauftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgt. Es werden Fertiggele (NuPAGE® Bis-Tris Gel, Invitrogen) mit 10% bzw. 12% SDS verwendet. Nachdem die Proben mit NuPAGE® LDS Sample Buffer versetzt wurden, werden die Proteine für zehn Minuten auf 70°C denaturiert. Jetzt werden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Kammer wird mit 1x MOPS Puffer (Invitrogen, 209g MOPS, 121,2g Tris, 20g SDS, 6g EDTA, in 1l ddH₂O lösen; pH 7,7; 500µl NuPAGE® Antioxidant) gefüllt und eine Spannung von 125mA pro Gel wird angelegt. Nach der Gelelektrophorese kann das Gel entweder mit Coomassie bzw. Silbernitrat angefärbt werden oder es kann ein Western Blot durchgeführt werden.

2.13.4 Gelfärbung mit Coomassie und Konservierung von Gelen

Coomassie ist ein anionischer Farbstoff, der an die kationischen und unpolar hydrophoben Seitenketten von Proteinen bindet. Diese Färbemethode eignet sich zur Überprüfung der Reinheit oder Menge von Proteinen. Nach der Gelelektrophorese wird das Gel für 30 Minuten in der Färbelösung (0,5% Coomassie Brilliant Blue, 50% Methanol, 7% Essigsäure) inkubiert. Danach wird der Farbstoff kurz mit Wasser abgespült und das Gel wird über Nacht auf dem Schüttler in Entfärbelösung (30% Methanol, 10% Essigsäure) teilweise entfärbt. Am nächsten Tag wird die Entfärbelösung gegen Trocknungslösung (20% Methanol, 3% Glycerin) ausgetauscht, und das Gel

wird über Nacht entwässert. Zur Konservierung wird das Gel in Geliertglasfolie eingebettet und unter Anlegen eines Vakuums und Wärme getrocknet.

2.13.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sensitive Methode, um Proteine nach einer SDS-PAGE nachzuweisen. Das Gel wird auf dem Schüttler über Nacht bei 4°C in Fixierlösung (40ml Ethanol, 5ml Essigsäure, 50ml H₂O) inkubiert. Am nächsten Tag wird das Gel zweimal für je 20 Minuten in Waschlösung (30ml Ethanol, 70ml H₂O) inkubiert. Danach erfolgt ein Waschschrift mit Wasser für 20 Minuten. Zur Minimierung des Hintergrundsignals wird das Gel mit Natriumthiosulfat vorbehandelt (0,02g Na₂S₂O₃ in 100ml H₂O). Es wird dreimal 20 Sekunden gewaschen. Das Gel wird anschließend für 20 Minuten bei 4°C in einer Silbernitratlösung (0,2g AgNO₃, 20µl Formalin, 100ml H₂O) inkubiert. Anschließend wird das Gel für dreimal 20 Sekunden und einmal eine Minute mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung findet durch Zugabe der Entwicklungslösung (3g Na₂CO₃, 50µl Formalin, 100ml H₂O) statt. Ist die gewünschte Farbintensität erreicht, wird die Lösung durch die Terminierungslösung (5ml Essigsäure, 95ml dH₂O) beendet. Danach kann das Gel in Geliertglasfolie gelegt werden und unter Anlegen von Vakuum und Wärme getrocknet werden.

2.13.6 Western Blot und ECL-Detektionssystem (Enhanced Chemiluminescence)

Bei einem Western Blot werden Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und durch eine Immundetektion visualisiert. Dadurch kann das Molekulargewicht und die Expressionsstärke eines bestimmten Proteins untersucht werden. Der Western Blot erfolgt nach Herstellerangaben in der Mini Trans-Blot Cell (BioRad) nach dem Wet-Blot Verfahren. Der Blot-Vorgang findet in Transferpuffer (25mM Tris, 150mM Glycin, 10% Methanol, in 1l H₂O; pH 8,3) statt. Dabei wird für 1-1,5 Stunden eine Spannung von 100V angelegt, wodurch die Proteine von der Kathode zur Anode wandern und somit aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran[®], Whatman GmbH) übertragen werden. Eine anschließende Färbung mit PonceauS (Roche) zeigt den Erfolg des Blottens an. PonceauS bindet reversibel an Proteine und kann leicht mit Wasser abgewaschen werden. Nach dem Blotten wird die Membran über Nacht bei 4°C in einer Milchpulverlösung (5% Milchpulver in TBST (100mM Tris, 1,5M NaCl, 0,5% Tween 20, in 1l dH₂O; pH 7,6) inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Am nächsten Tag wird die Membran einmal 20 Minuten und zweimal fünf Minuten mit 1x TBST gewaschen. Die Membran wird mit dem ersten Antikörper für eine Stunde inkubiert. Die Antiseren gegen die SRPK79D wurden meist präabsorbiert (10µl

1xTBST, 10µl Antiserum, 10 adulte *Drosophila* Köpfe; Homogenat über Nacht auf 4°C; Überstand verwendet). Die unspezifisch gebundenen oder überschüssigen Antikörper werden durch die Waschschriffe mit 1x TBST entfernt. Es erfolgt die Inkubation mit dem zweiten HRP-gekoppelten Antikörper, der gegen die Fc-Domäne des ersten Antikörpers gerichtet ist. Der Proteinnachweis auf der Nitrocellulosemembran erfolgt mittels des Enhanced Chemiluminescence Detektionssystems. Die ECL-Lösungen (ImmobilonTM Western, Millipore oder AmershamTM ECL WB Detection Reagent, GE Healthcare) werden im Verhältnis 1:1 zusammen pipettiert, und auf der Membran verteilt. An dem zweiten Antikörper ist das Enzym HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt, welches unter alkalischen Bedingungen die Umsetzung von energiereichem zyklischen Luminol in die oxidierte Form katalysiert. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches den aufgelegten Röntgenfilm schwärzt (Contratyp, Medical X-ray film, Raymed Imaging AG).

2.13.7 Zweidimensionale-Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese)

Anhand einer Zweidimensionalen-Gelelektrophorese können Proteine durch eine isoelektrische Fokussierung und anschließender SDS-PAGE aufgetrennt werden. Hier wird das Zoom[®] IPG Runner System von Invitrogen verwendet. Die isoelektrische Fokussierung erfolgt anhand der Zusammensetzung des Proteins aus sauren und basischen Aminosäuren, wobei ein immobilierter pH-Gradient verwendet wird. Die Fliegen werden gesammelt, in Stickstoff eingefroren und dekapitiert. Die Köpfe werden dann in 316µl Homogenisierungsmix (303µl Solubilizer 1 oder 2, 1µl 1M Tris, 3µl Proteaseinhibitor-Mix, 3µl 2M DTT, 6µl dH₂O) homogenisiert. Danach erfolgt eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Es wird 1,6µl DMA zugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachfolgend werden 3,5µl 2M DTT zugegeben und für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach werden 140µl des Überstandes mit 15µl Solubilizer 1 oder 2, 1µl 2M DTT, 1,6µl Ampholyte, 1µl Bromphenolblau und 1,4µl H₂O vermischt. 200µl dieses Gemisches werden zu den Gelstreifen (ZOOM[®] Strips, pH 3-10L) gegeben und diese werden über Nacht rehydriert. Am nächsten Tag werden die Gelstreifen für 20 Minuten in der Reduktionslösung (4,5ml NuPAGE[®] LDS Sample Buffer, 500µl 0,5M DTT) inkubiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation des Gelstreifens für 20 Minuten in der Alkylierungslösung (5ml NuPAGE[®] LDS Sample Buffer, 28µl DMA) und abschließend in der Quenchinglösung (4ml NuPAGE[®] LDS Sample Buffer, 1ml Ethanol und 50µl 0,5M DTT) für 20 Minuten. Danach werden die Streifen in die Fertigele (NuPAGE[®] Bis-Tris Gel, Invitrogen) positioniert und eine SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot durchgeführt.

2.13.8 Alkalische Phosphatase Versuch

Köpfe adulter *Drosophila* Fliegen werden in Homogenisierungspuffer (25mM Tris, 150mM NaCl, 10% Glycerol, 0,1% NP-40) homogenisiert. Dieser Ansatz wird auf drei Reaktionsgefäße verteilt. In den ersten Ansatz werden alkalische Phosphatase und 1x Reaktionspuffer (Promega) zugegeben. In den zweiten Ansatz wird nur der Probenpuffer pipettiert und dient als Temperaturkontrolle. Beide Proben werden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Der dritte Ansatz wird auf Eis belassen und dient als Negativkontrolle. Danach wird die Reaktion mit NuPAGE® LDS Sample Buffer abgestoppt und ein Western Blot wird durchgeführt.

2.14 Arbeiten mit Bakterien

2.14.1 Bakterienplattenkulturen

Um Einzelkolonien zu erhalten, wird eine Bakteriensuspension auf eine Agarplatte (Luria Bertani-Medium: 10g NaCl, 10g Select Peptone 140, 5g Select Yeast extract, in 1l ddH₂O lösen; pH 7,0; 1,5% Agar, autoklavieren, Antibiotika zugeben) mit einem Trigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ist die gewünschte Koloniegröße erreicht, kann die Platte bei 4°C aufbewahrt werden.

2.14.2 Bakterienflüssigkulturen

Zur Vermehrung von Bakterien für eine DNA-Präparation oder zur Proteinsynthese werden Bakterienflüssigkulturen angesetzt. Es werden mittels einer Kolonie, die mit einer 200µl Pipette gepickt wurde, 50-100ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Horizontalschüttler vermehrt.

2.14.3 Glycerinstock

Um Bakteriensuspensionen längere Zeit aufzubewahren, werden Glycerinstocks angelegt indem 500µl der Bakteriensuspension mit 500µl Glycerin vermischt werden. Dies ermöglicht eine Lagerung bei -80°C.

2.14.4 Herstellung hitzekompetenter Bakterien

Für die Herstellung eines hitzekompetenten Bakterienstamms werden 20µl einer Zellsuspension in 100ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterienkultur wird bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 auf einem Horizontalschüttler bei 37°C vermehrt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4200rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 33ml RF1-Puffer (100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM KoAc, 100mM CaCl₂, 15% Glycerin; pH 5,8, steril filtriert) resuspendiert. Anschließend werden die Zellen für 15 Minuten auf Eis gekühlt und danach für 15 Minuten bei 3000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 8ml RF2-Puffer (10mM Mops, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% Glycerin; pH 6,8, steril filtriert) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis belassen. Danach werden die 0,2ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.14.5 Plasmid Midi- und Mini-Präparation

Die Plasmid Mini- und Midi-Präparation aus *E. coli* erfolgt entsprechend den Herstellerangaben des Plasmid Mini- und Midi-Kits (QIAGEN).

2.14.6 Das pET-28a-Expressionssystem zur Aufreinigung von Fusionsproteinen

Das pET-28a-Expressionssystem kodiert für ein Fusionsprotein mit einem His-tag, eine Abfolge von sechs Histidinen. Anhand der 'multiple cloning site' wird die Fremdsequenz der RB- bzw. RC Isoform einkloniert. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG. Die Aufreinigung des Fusionsproteins wird dann unter Verwendung einer Nickel-Agarose-Säule vorgenommen.

2.14.7 Transformation von Bakterienzellen und Induktion der Proteinsynthese

Um ein Expressionsplasmid zur Vermehrung eines Konstrukts in Bakterien einzuschleusen, werden die hitzekompetenten Bakterienzellen mit 1-5µl Plasmid-DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C, bei dem die Zellwände der Bakterien destabilisiert werden und das Plasmid aufgenommen wird. Anschließend werden die Proben für fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900µl vorgewärmten SOC-Medium (Invitrogen) werden die Bakterien für 90 Minuten bei 37°C vermehrt. Nach dem Ausplattieren werden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird eine Kolonie gepickt und in 50-100ml LB-Medium, das mit Antibiotika versetzt wurde, über Nacht inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wird eine 500ml-1l Kultur angeimpft. Diese Kultur wird für 1,5-2 Stunden auf dem Horizontalschüttler bei 37°C vermehrt, um eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 zu erreichen. Die Proteininduktion wird durch Zugabe von 1mM IPTG ausgelöst. Die Bakterien werden für fünf Stunden auf dem Horizontalschüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Bakterienkultur bei 4000rpm für 30 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wird eingefroren, und der Überstand wird verworfen. Zur Überprüfung der Induktion wird jeweils 1ml der Kultur vor bzw. nach der Induktion entnommen und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wird in NuPAGE® LDS Sample Buffer gelöst und zur Proteindenaturierung aufgeköcht. Die Überprüfung der Induktion erfolgt anhand eines Western Blots, bei dem das His-getaggte Fusionsprotein mittels eines His-Antikörpers detektiert wird.

2.14.8 Proteinisolierung und Aufreinigung

Das eingefrorene Pellet wird, wie im Protokoll The QIAexpressionist (QIAGEN) angegeben, resuspendiert und mit 50% Nickel-Agarose (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) auf dem Schüttler für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Gemisch wird in eine BioRad-Säule gefüllt und dem Protokoll entsprechend mit den Puffern D (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris/ HCl, 8M Harnstoff; pH 5,9) und E (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris/ HCl, 8M Harnstoff; pH 4,5) eluiert. Aufgrund der unlöslichen Form der His-markierte Fusionsproteine werden im Versuch denaturierende Bedingungen verwendet.

2.14.9 Chloroform/Methanol-Fällung

Die Fraktionen der Eluate der Puffer D und E werden vereinigt und mit Chloroform/Methanol gefällt. Zu diesem Zweck wird zu dem einfachen Volumen der Eluate das dreifache Volumen an ddH₂O, das vierfache Volumen an Methanol und das einfache Volumen Chloroform gegeben, geschüttelt und für fünf Minuten abzentrifugiert. Das Protein befindet sich nun in der Interphase. Die obere Phase wird verworfen. Zum restlichen Gemisch wird das dreifache Volumen Methanol gegeben. Um eine Sedimentation der Proteine zu erreichen, wird die Lösung fünf Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wird in 500µl Methanol aufgenommen und eingefroren. Dieses kann anhand einer SDS-PAGE analysiert werden.

2.14.10 Affinitätsaufreinigung von Antiseren

Ein Nachteil der polyklonalen Seren gegen die SRPK79D ist die hohe unspezifische Hintergrundfärbung in einem Western Blot. Zur Aufreinigung von Antiseren (Antiseren gegen die RC/RF-Gruppe, RB/RC-Gruppe, und vier Peptidantikörper) wird eine HiTrap NHS-activated HP Säule (GE Healthcare) verwendet. 1mg des jeweiligen Proteins wird in 1ml Bindepuffer (0,2M NaHCO₃, 0,5M NaCl, 20% SDS; pH 8,3) unter Erwärmung gelöst. Eine HiTrap NHS-activated HP Säule wird mit einem Tropfen 1mM kalter Salzsäure gewaschen. Die Säule wird an eine Pumpe angeschlossen, um die Durchflussgeschwindigkeit konstant bei 1ml pro Minute zu halten. Zunächst muss das in der Säule enthaltene Isopropanol durch dreimal 2ml eiskalte 1mM Salzsäure ausgewaschen werden. Danach kann die Säule mit der Antigenlösung beladen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Säule wird dreimal mit 2ml Puffer A (500µM Ethanolamin, 500µM NaCl; pH 8,3), dreimal mit 2ml Puffer B (100µM Essigsäure, 500µM NaCl; pH 4) und nochmals dreimal mit 2ml Puffer A gewaschen. Nach einer Inkubationszeit der Säule von einer Stunde bei Raumtemperatur wird die Säule wieder dreimal mit 2ml Puffer B, dreimal mit 2ml Puffer A und dreimal mit 2ml Puffer B gewaschen. Nun ist die Säule gebrauchsfertig und die Durchführung des Versuchs erfolgt auf 4°C. Das polyklonale Serum wird 1:10 in PBS (137mM NaCl, 70mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄, 2,7mM KCl, in 1l ddH₂O; pH 7,4) verdünnt und fünf Mal über die Säule laufen gelassen. Danach wird die Säule mit 30 Volumeneinheiten PBS, 30 Volumeneinheiten 350mM NaCl und abschließend mit 10 Volumeneinheiten PBS gewaschen. Das affinitätsgereinigte Antiserum wird mit 100mM Glycerin, pH 2,5 eluiert und Fraktionen von je 1ml werden aufgefangen. Diese Fraktionen werden mit 50µl 1M Tris/ HCl (pH 8,9) versetzt. Die Eluate werden gegen PBS umgepuffert und mit Hilfe von Centriplus 50 Centrifugal Filter Units (Millipore) auf 1mg/ml konzentriert. Die Stabilisierung der affinitätsreinigten Seren erfolgt durch Zugabe von 4mg/ml BSA (Sigma) und 0,1% NaN₃. Danach kann das affinitätsgereinigte Antiserum bei -80°C gelagert werden

2.15 CytoTrap-Versuch zur Identifizierung von Interaktionspartnern

Für die Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern für die SRPK79D wird der CytoTrap-Versuch der Firma Stratagene verwendet. Im konventionellen Yeast-two-hybrid-System findet die Suche nach Interaktionspartnern im Zellkern statt, wohingegen bei dem CytoTrap die Interaktionssuche im Zytoplasma stattfindet. Bei diesem Versuch wird der temperatursensitive *S. cerevisiae* Hefestamm *cdc25H* verwendet der aufgrund einer Punktmutation im *cdc25*-Gen nicht mehr bei 37°C wachsen kann (Abbildung 2.1), sondern nur noch bei der permissiven Temperatur

von 22°C. Bei diesem Verfahren werden Fusionsproteine (sog. Köder und Beute) hergestellt. Zum einen wird die *Srpk79D*-RB bzw. -RC-Isoform in den pSos-Vektor kloniert und es entsteht ein Fusionsprotein mit dem humanen SOS-Protein (hSOS). Das *son of sevenless* Gen kodiert für einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor von RAS. Da beide Proteine so konserviert sind, wird RAS von hSOS gebunden und aktiviert, wodurch die Ras-Signalkaskade aktiviert und der Defekt im *cdc25H* Hefestamm behoben wird. Das G-Protein RAS ist wichtig für den Eintritt und Fortschritt in den Zellzyklus. Im pMyr-Vektor liegt die cDNA Bibliothek von *Drosophila* vor (Stratagene). Erfolgt nach der Kotransformation der Hefen mit beiden Vektoren Wachstum bei 37°C, so fand eine Interaktion beider Fusionsproteine statt.

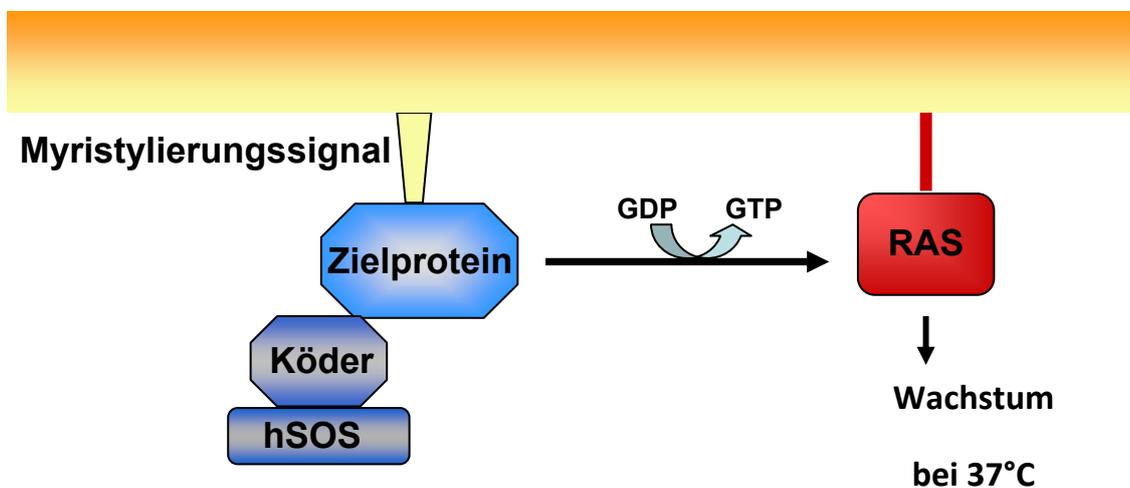


Abbildung 2.1. **Schematische Darstellung der Funktionsweise des CytoTrap-Versuchs:** Das Zielprotein wird an der Zellmembran aufgrund des Myristylierungssignals verankert. Das Köderprotein bindet das Zielprotein und dirigiert hSOS zur Zellmembran. Das hSOS katalysiert den Austausch von GDP zu GTP und initiiert die Ras-Signalkaskade.

2.15.1 Klonierung der *Srpk79D*-RC und RB-Isoform in den pSos-Vektor

Als erstes wird eine Linker-PCR vorgenommen, um spezifische Restriktionsschnittstellen an die RB bzw. RC-cDNA anzufügen. Diese Schnittstellen werden von den Nukleasen erkannt und spezifisch geschnitten. Es werden folgende Primer verwendet:

RB sense Mlu: 5'ACGCGTTATGGATGACTTTGGCTCG3'
 RB anti Sac: 5'GAGCTCTTAGACGAACTCCTCCTG3'
 RC sense Sac 5'GAGCTCTATGGCCGGCCTCACT3'

Das PCR-Produkt wird in einen pGEM-Vektor (Promega) zwischenkloniert. Dadurch erhöht man die Funktionalität der Restriktionsenzyme. Danach erfolgt die Klonierung des Inserts in den pSos-Vektor, mit anschließender Transformation von *E. coli* XL1-blue Zellen. Plasmid-Mini Präparationen werden per PCR werden mit spezifischen Primern getestet und sequenziert.

RB sense 100bp RT	5'CATCTTCTAAGCCGGCACAT3'
RB anti 100bp RT	5'GCATCAGGAAGAGGAAGAG3'
RC sense 100bp RT	5'TCCTCAGGATGCGGTCTAA3'
RC anti 100bp RT	5'AAGCTGCGACGGAAACTCAA3'

2.15.2 Herstellung kompetenter *cdc25H*-Hefezellen

Mit Hilfe einer Impföse werden aus dem gefrorenen Glycerolstock Zellen entnommen und auf einer YPAD-Agarplatte (YPAD Agar, Clontech) verteilt. Die YPAD-Platte wird für 3-4 Tage bei 22°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wird mit Hilfe einer 200µl Spitze von der Platte entnommen und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß in 1ml YPAD-Medium resuspendiert. Anschließend werden 50ml YPAD-Medium (Clontech) mit der Zellsuspension angeimpft und über Nacht bei 22°C auf dem Schüttler inkubiert. Wird eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht, kann in einem 1l Erlenmeyerkolben 300ml frisches YPAD-Medium mit so viel Ausgangskultur angeimpft, dass die neue Kultur eine OD₆₀₀ von 0,2 besitzt. Diese Kultur wird für drei Stunden bei 22°C auf dem Schüttler inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht wird. Zur Überprüfung von Temperaturrevertanten werden 75µl der Suspension auf einer YPAD-Platte ausplattiert und bei 37°C für fünf Tage inkubiert. Hier sollten nicht mehr als 30 Kolonien gewachsen sein. Die restliche Hefekultur wird auf 50ml Greinerröhrchen verteilt und bei 1000x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird mit 50ml Aqua bidest. gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000x g für zehn Minuten wird das Pellet in 50ml LiSORB (100mM LiOAc, 10mM Tris/ HCl, 1mM EDTA, 1M Sorbitol; pH 8,0, autoklavieren) gelöst. Diese Suspension wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit werden 800µl Lachssperma (10mg/ml, Sheared Salmon Sperm DNA, Eppendorf) auf 95°C für zehn Minuten aufgekocht und mit 600µl LiSORB gemischt. Nach der Inkubation werden die Hefezellen bei 1000x g für fünf Minuten sedimentiert und das Pellet in 300µl LiSORB resuspendiert. Zu der Suspension werden 800µl des Lachssperma-Gemisches zugegeben und vermischt. Danach werden 5,4ml PEG/LiOAc (10mM Tris/ HCl, 1mM EDTA, 100mM LiOAc, 40% PEG 3350, autoklavieren) und 530µl DMSO (Finnzymes) zugegeben. Der Ansatz kann aliquotiert und bei -80°C eingefroren werden.

2.15.3 Überprüfung der Köderproteine auf Autoaktivierung

Wie im CytoTrap Vector Kit Instruction Manual beschrieben, wird zunächst Autoaktivierung der *Srpk79D*-RB bzw. RC-Isoform ausgeschlossen. Die Aminosäuren, die für die Selektion erforderlich sind, werden bei Sigma-Aldrich bestellt, die Dropout-Solution bei Clontech (DO Supplement).

2.15.4 Transformation von Hefezellen

Hefen können mit einem Plasmid oder mit zwei Plasmiden (Kotransformation) transformiert werden. Dafür werden die kompetenten Hefezellen auf Eis aufgetaut, mit 2µg Plasmid-DNA 2µl 1:10 verdünntes 1,4M β-Mercaptoethanol versetzt. Die Mischung wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert mit anschließendem 20-minütigen Hitzeschock bei 42°C. Die Proben werden kurz auf Eis abgekühlt. Das Pellet wird in 500µl 1M Sorbitol resuspendiert und mittels Glasperlen auf der SD-Glukoseplatte (-Uracil, -Leucin) verteilt und 4-5 Tage bei 22°C inkubiert.

2.15.5 Kotransformation und Identifizierung von Interaktionspartnern

Für die Kotransformation werden 10ml frisch hergestellte Hefezellen mit 100µl 1:10 verdünntem 1,4M β-Mercaptoethanol, 100µg Köderplasmid und 100µg cDNA Bibliothek gemischt. Als Negativkontrollen dienen 1:10 verdünntes 1,4M β-Mercaptoethanol und 2µg des leeren pMyr- und pSos-Vektors. Der 10ml Ansatz wird auf 20 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 20-minütigen Hitzeschock bei 42°C erfolgt das Abkühlen auf Eis. Das Pellet wird in 500µl 1M Sorbitol resuspendiert. Der komplette Ansatz wird mittels Glasperlen auf einer SD/Glukose (-Ura, -Leu) Agarplatte verteilt und bei 22°C für 2-4 Tage inkubiert. Mithilfe der Kontrollplatten kann die Transformationseffizienz bestimmt werden. Nach einer Inkubationsdauer werden die Platten auf SD/Galaktose (-Ura, -Leu) Agarplatten repliziert. Hierzu werden autoklavierte Whatmanfilter auf die Platte angedrückt und dann auf die Galaktoseplatte transferiert. Die SD/Galaktoseplatten (-Ura, -Leu) werden bei 37°C inkubiert, wodurch die Anwesenheit der Galaktose die Produktion des Fusionsproteins induziert. Wenn eine Interaktion zwischen Köder und Beute stattfindet, erfolgt das Wachstum bei 37°C. Nach sieben Tagen werden die Kolonien in je 45µl Aqua bidest. resuspendiert und auf vier verschiedene Plattentypen gespottet (je 10µl, siehe Tabelle). Diese Platten werden für 5-7 Tage bei 37°C bzw. 22°C inkubiert und könne dann ausgewertet werden. Die Plasmide von Kandidatenklonen wurde durch eine Plasmidisolierung (PrepEase[®] Yeast Plasmid Isolation Kits von Clontech) gewonnen.

Nach der Plasmidisolierung aus der Hefe, werden *E. coli* JM109 Zellen transformiert und sowohl auf Ampicillin-haltige, als auch Chloramphenicol-haltige Platten ausplattiert. Mit diesen Kolonien wird eine Plasmid-Mini Präparation (QIAGEN) durchgeführt und die Plasmid-DNA wird sequenziert.

	Glukose		Galaktose		
	-Uracil, -Leucin		-Uracil, -Leucin		
	25°C	37°C	25°C	37°C	
Keine Interaktion	+	-	+	-	
Revertante	+	-	+	+	
Interaktion	+	-	+	+	positive Kolonien

Tabelle 2.1. **Selektionsmechanismus beim CytoTrap-Versuch von Stratagene.** Potentielle Interaktionspartner wachsen bei 37°C auf Galaktoseplatten, jedoch nicht auf Glukoseplatten.

2.16 Immunhistochemische Methoden

2.16.1 Immunfluoreszenzfärbungen von Larven

Zur Betäubung der *Drosophila*-Larve werden diese vor Versuchsbeginn in Ca²⁺-freier Saline (128mM NaCl, 35mM Sucrose, 2mM KCl, 4mM MgCl₂, 3mM HEPES (pH 7,2), 1mM EDTA; pH 7,0) auf Eis gehalten. Die Larve wird in ein mit Agarose gefülltes Schälchen (Hartenstein) überführt und am anterioren und posterioren Pol mit je einer Minutie (Fine Science Tools) festgesteckt, dorsal aufgeschnitten und mit vier weiteren Minutien fixiert. Die inneren Organe werden heraus präpariert. Die larvalen Proteine werden durch das im Fixativ enthaltene Paraformaldehyd (4g PFA, 80ml H₂O, 10ml 10x PBST; pH 7,2) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wird 2x 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1%igem PBST (137mM NaCl, 70mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄, 0,1% Triton X100; pH 7,4) gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgt eine einstündige Inkubation der Filets in Blocklösung (2% BSA, 5% Ziegen Serum, 0,2% Triton X100 in PBST) bei Raumtemperatur. Der erste Antikörper wird in die Blocklösung pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird 4x 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1%igem PBST gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Im Anschluss daran können die Larven mit dem zweiten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper für eine

Stunde inkubiert werden. Danach wird 4x eine Stunde mit 0,1%igem PBST gewaschen. Abschließend können die Larven in Vectashield (Linaris) eingebettet und bei 4°C aufbewahrt werden. Die Aufnahme der Präparate erfolgt am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica Mikrosystem). Die Auswertung der Bilder erfolgt mit ImageJ.

2.16.2 Immunfluoreszenzfärbungen von Kryostatschnitten

Die Fluoreszenzfärbung von Kryostatschnitten erfolgt nach dem Protokoll von Buchner et al., 1986. Die Fliegen werden drei Stunden in Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Schneiden der Fliegenköpfe am Kryotom werden die unspezifischen Bindungen der Präparate während einer zweistündigen Inkubationszeit in Ziegenserum besetzt. Anschließend werden die Gefrierschnitte über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die Kryostatschnitte werden 2x 15 Minuten mit 1x PBST gewaschen. Es erfolgt eine Inkubation mit dem zweiten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach werden die Präparate 2x 15 Minuten mit 1x PBST gewaschen. Nun können die fertigen Schnitte in Vectashield (Linaris) eingebettet und bei 4°C aufbewahrt werden.

2.16.3 Whole mount Präparationen von adulten *Drosophila* Köpfen

Gehirne adulter Fliegen werden in Ringer präpariert und in 5% Formaldehyd in PBS für 40 Minuten fixiert. Es wird 3x fünf Minuten mit 0,5% PBST gewaschen und für zwei Stunde in 10% Ziegenserum in PBT werden unspezifische Bindungen abgesättigt. Der erste Antikörper wird in die Blocklösung über Nacht bei 4°C gegeben werden. Am nächsten Tag wird 3x fünf Minuten und 3x zehn Minuten mit 0,5% PBST gewaschen. Der zweite Antikörper wird für zwei Stunden, Raumtemperatur in PBST inkubiert. Nach den 3x zehn Minuten Waschsritten werden die Gehirne für 30 Minuten in 50% Glycerol und 50% PBS entwässert. Anschließend können sie in Vectashield (Linaris) eingebettet werden.

2.16.4 Stimulated emission depletion-Mikroskopie

Das STED (stimulated emission depletion) Mikroskop ermöglicht eine bessere räumliche Auflösung von Signalen in Fluoreszenz-Präparaten. Bei diesem speziellen Konfokalmikroskop ist die Auflösung nicht beugungsbegrenzt. Im konventionellen Konfokalmikroskop entsteht durch die

Strahlenbeugung im Präparat ein Anregungsfleck mit den Abmessungen des Beugungsscheibchens. Das Beugungsscheibchen ist durch die numerische Apparatur des Objekts und die Wellenlänge des Anregungslichts vorgegeben. Im STED-Mikroskop kann die Beugungsinitiierung durch einen stimulierten Emissionabbau im Randbereich des Beugungsscheibchens umgangen werden. Hierzu wird ein zweiter Lichtstrahl einer Wellenlänge, der die Fluoreszenzanregung löscht, mit einer Intensitätsverteilung versehen, welches nur in der Mitte des Beugungsscheibchens Null ist. Nur an dieser Stelle findet daher keine stimulierte Depletion statt. Die Intensitäten des anregenden und des löschtenden Strahls werden so eingestellt, dass der Bereich, in dem noch die registrierte Fluoreszenz stattfindet, deutlich kleiner ist als das des Beugungsscheibchens. Beim Scannen der Probe wird daher die optische Auflösung des Fluoreszenzbildes wesentlich verbessert.

2.17 *In vivo* Imaging

Das *in vivo* Imaging ist eine neue Methode zur Detektion und Verfolgung von fluoreszenzmarkierten Proteinen bei lebenden und intakten *Drosophila* Larven. Anhand des aus der Hefe stammenden GAL4/UAS-Systems ist es möglich die Translation der fluoreszenzmarkierten Proteine in den Tieren zu erreichen. Eine Larve im dritten Lavenstadium wird in der Imaging-Kammer in einem kleinen Tropfen Mineralöl eingespannt, wodurch die Kutikula nun durchsichtig erscheint. Die Larve wird mit einem Deckgläschen bedeckt und positioniert, sodass die dorsale Seite nach oben zeigt (vgl. Abbildung 2.2). Nach dem Zusammenbau der Kammer wird die Larve mit Desfluran anästhesiert, sodass sie immobil ist. Desfluran verhindert Muskelkontraktionen, wodurch eine Aufnahme unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop gewährleistet wird. Die Auswertung erfolgt mit Image J MBF.

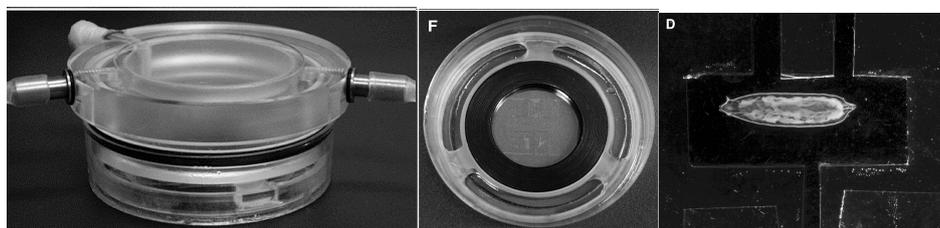


Abbildung 2.2. Einspannvorrichtung beim *in vivo* Imaging Versuch zum Fixieren der Larve (Andlauer et al., 2010).

2.18 Verhaltensanalysen von adulten *Drosophila melanogaster* Fliegen

2.18.1 Bestimmung der Lebensdauer

Um die Lebensdauer eines Fliegenstammes ermitteln zu können werden jeweils 50 bzw. 100 frisch geschlüpfte männliche Fliegen eines Genotyps gesammelt und in ein frisches Futterglas gesetzt. Insgesamt werden 500 männliche Fliegen getestet. Der w^{1118} -Stamm dient als Kontrolle. Die Versuchstiere werden zweimal pro Woche auf frische Gläser transferiert und die Anzahl der toten Fliegen wird in einer Excel-Tabelle festgehalten. Anhand der Daten kann die Lebensdauer berechnet und graphisch dargestellt werden. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgt mit dem Student'schen T-Test mit Bonferroni-Korrektur.

2.18.2 Bestimmung der negativ geotaktischen Aktivität

Um die negative Geotaxis der Fliegen zu ermitteln werden 25 Fliegen jedes Genotyps getestet. Die Fliegen sind zum Zeitpunkt des Tests vier Tage alt. Nach Betäubung der Fliegen auf Eis werden die Flügel gestutzt. Eine einzelne Fliege wird in ein leeres Futterglas gesetzt und die in 3x 30 Sekunden maximal erreichte Höhe wird notiert. Die Ergebnisse werden anhand einer Excel-Tabelle ausgewertet und die Signifikanzen mit dem Student'schen T-Test mit Bonferroni-Korrektur bestimmt.

2.18.3 Bestimmung der Flugfähigkeit nach Benzer

Um die Flugfähigkeit eines Fliegenstamms untersuchen zu können wird der Versuchsaufbau nach Benzer (Benzer, 1973) gewählt. Hierbei dient ein mit Paraffinöl beschichteter 500ml Zylinder als Flugarena. Pro Genotyp werden jeweils 10x 100 männliche Fliegen getestet. Die zu testenden Fliegen sind maximal vier Tage alt. Jeweils 100 Fliegen werden mit Hilfe eines Trichters in den Zylinder geklopft und bleiben, sobald zu fliegen beginnen, an den beschichteten Wänden kleben. Fliegen zwischen 0-50ml gelten als flugunfähig. Anschließend wird anhand einer Excel-Tabelle die Flugfähigkeit bzw. Flugunfähigkeit eines Fliegenstamms bestimmt. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgt mit dem Student'schen T-Test mit Bonferroni-Korrektur.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Charakterisierung von Antiseren gegen die SRPK79D

3.1.1 Präadsorption der polyklonalen Antiseren gegen die SRPK79D

Von V. Nieratschker wurden im Zuge ihrer Dissertation Antiseren gegen die SRPK79D hergestellt (Nieratschker, 2008). Hierbei wurden Meerschweinchen mit den rekombinanten Proteinen immunisiert, die jeweils eine spezifische Domäne der SRPK79D-PB/PE-Isoformen bzw. der SRPK79D-PC/PF-Isoformen enthielten. Die daraus resultierenden Seren zeigten eine hohe Hintergrundfärbung im Western Blot und an larvalen Nerv-Muskel-Präparaten, weshalb die immunhistochemischen Färbungen mit den präadsorbierten Seren wiederholt wurden. Die Präadsorption erfolgte für zwei Stunden bzw. über Nacht bei 4°C in einem Homogenat aus adulten Köpfen der *Srpk79D*-Nullmutante. Die Überexpression der SRPK79D-GFP wurde mit dem panneuralen Treiber *elav-GAL4* erreicht, womit eine Expression im nahezu gesamten Nervensystem stattfindet (Campos et al., 1985 und 1987; Robinow und White, 1988). In Abbildung 3.1 ist ein Western Blot mit dem präadsorbierten α PC- bzw. α PB-Serum dargestellt. Durch die Präadsorption konnte die Hintergrundfärbung minimiert werden. Beide Seren detektieren nur die überexprimierten GFP-markierten SRPK79D-Isoformen, PC bei 110kDa und PB bei 105kDa. Die endogene Kinase, SRPK79D-PB bei 80kDa und -PC bei 85kDa, wurde nicht von den Antiseren erkannt.

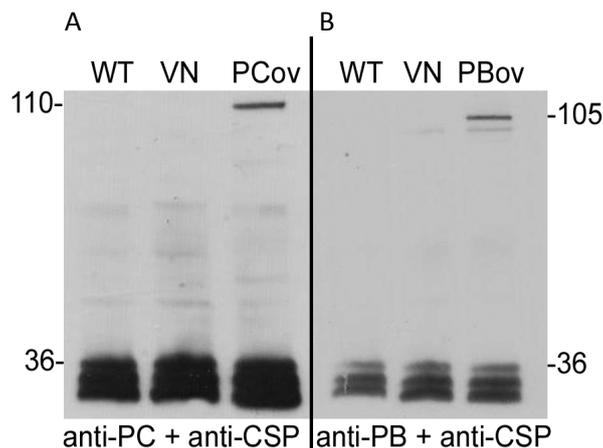


Abbildung 3.1. **Beide Antiseren erkennen nur die überexprimierte SRPK79D:** Western Blot mit dem präadsorbierten α PC- bzw. α PB-Serum. Als Beladungskontrolle diente das Cysteine string protein (CSP) bei 34kDa. Pro Tasche wurde ein Homogenat aus zehn adulten *Drosophila*-Köpfen der Genotypen: w^{1118} , *Srpk79D*^{VN} und der jeweiligen Kinase-Überexpressionslinie geladen. Die Überexpression wurde mit dem panneuralen Treiber *elav-GAL4* erreicht. Die Seren können die endogene SRPK79D, PC bei 85kDa und PB bei 80kDa, nicht detektieren, sondern nur die überexprimierten Isoformen, SRPK79D-PC-GFP bei 110kDa und SRPK79D-PB-GFP bei 105kDa.

Ergebnisse

Wie in der Diplomarbeit (Bloch, 2007) schon dargelegt, ist es möglich aus einem Homogenat aus adulten wildtypischen *Drosophila*-Köpfen die endogenen SRPK79D-PC/PF-Isoformen mittels einer Immunpräzipitation mit anschließendem Western Blot nachzuweisen (Abbildung 3.2 A). Die endogenen SRPK79D-PB/PE-Isoformen sollten ebenfalls isoliert werden. Wie man in Abbildung 3.2 B sehen kann, konnte selbst aus sehr großen Proteinmengen (ca. 5000 Fliegen) die endogene SRPK79D-PB-Isoform nicht angereichert werden. Bei beiden Versuchen diente die *Srpk79D*-Nullmutante als Negativkontrolle.

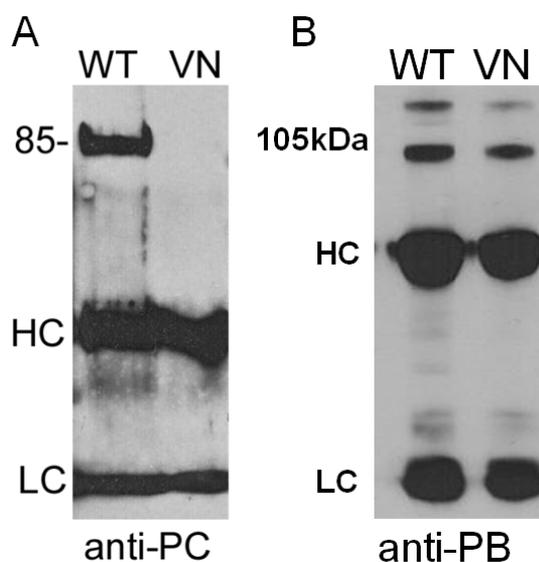


Abbildung 3.2. Anhand einer Immunpräzipitation ist es möglich die endogene SRPK79D-PC/PF-Isoformen anzureichern, nicht jedoch die SRPK79D-PB/PE-Isoformen: Western Blot nach einer Immunpräzipitation mit Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante mit dem α PC-Serum (A) bzw. α PB-Serum (B). Die Kinase-Nullmutante diente als Negativkontrolle. HC und LC bezeichnen die schwere und leichte Kette des Antikörpers. A: In der durchgeführten Immunpräzipitation liegen große Mengen des Proteins vor, dadurch wurde es möglich die SRPK79D-PC-Isoform bei 85kDa anzureichern (Bloch, 2007). B: Die endogene SRPK79D-PB-Proteinisoform bei 80kDa konnte auch aus sehr großen Proteinmengen nicht angereichert werden.

Zusätzlich wurden die immunhistochemischen Färbungen von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten mit den präadsorbierten Antiseren wiederholt. V. Nieratschker konnte in ihrer Dissertation keinen Unterschied in der Färbung zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante verzeichnen (Nieratschker, 2008). Mit den präadsorbierten Seren, war es möglich die Hintergrundfärbung zu reduzieren und ein spezifisches Signal in den Überexpressionslinien zu erhalten. Wie zuvor im Western Blot, konnte auch in larvalen Nerv-Muskel-Präparaten kein Unterschied in der Färbung zwischen *Srpk79D*-Nullmutante und Wildtyp detektiert werden. Der monoklonale Antikörper nc82

Ergebnisse

markiert alle Aktiven Zonen, wobei das präsynaptische Protein Bruchpilot, das wichtig für den Aufbau und Erhalt der Aktiven Zone ist, detektiert wird (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Die spezifische Färbung der panneural überexprimierten SRPK79D-PC-GFP-Isoform zeigte, dass das Protein an die Aktiven Zone transportiert wird. Die überexprimierte SRPK79D-PB-GFP-Isoform ist nicht an der Aktiven Zone lokalisiert (Abbildung 3.3). Die teilweise Kolo­kalisierung der überexprimierten SRPK79D-PC-GFP-Isoform und Bruchpilot an der Aktiven Zone konnte bestätigt werden (vgl. Nieratschker, 2008).

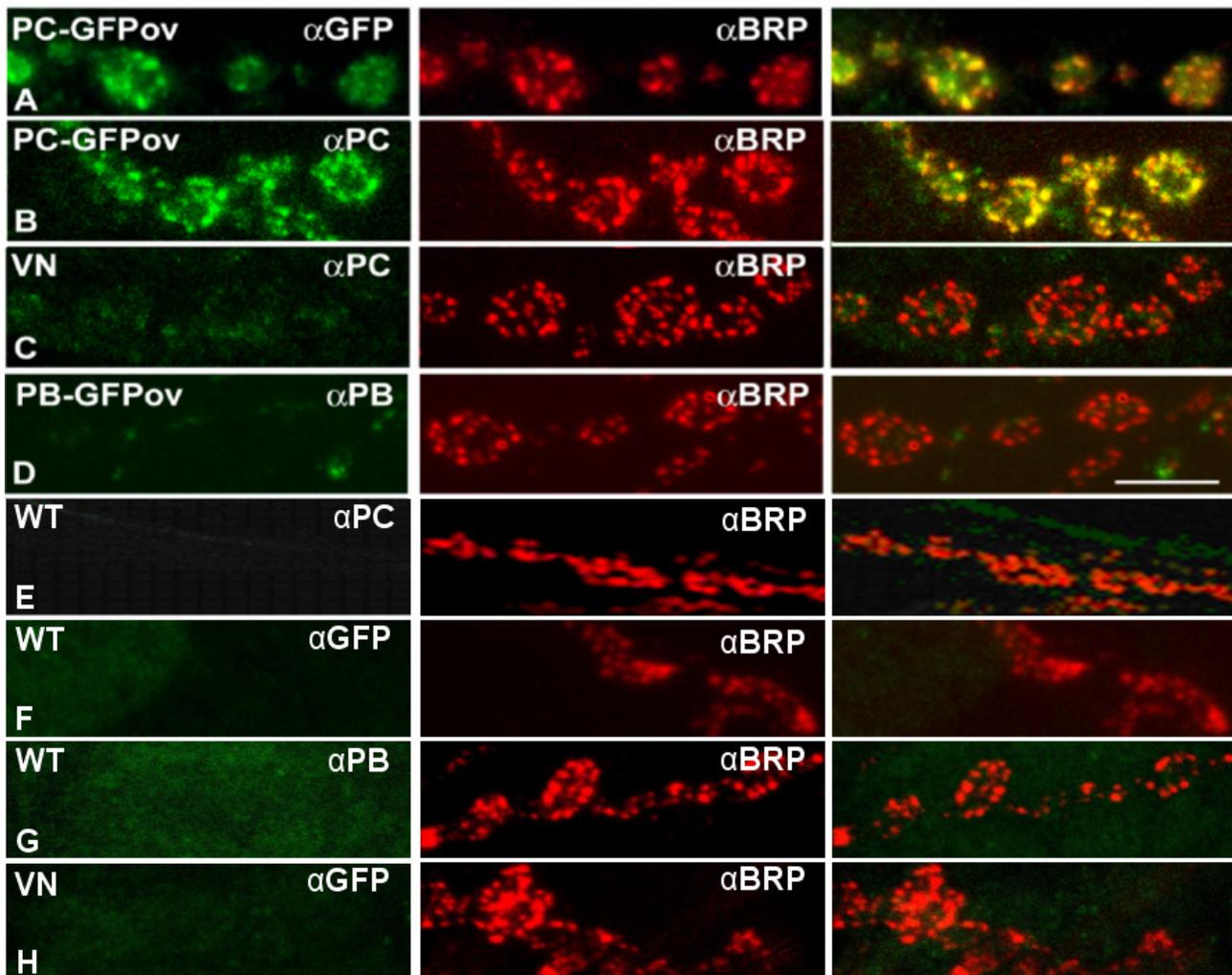


Abbildung 3.3 A-H. **Immunhistochemische Färbungen larvaler Nerv-Muskel-Präparate mit den präadsorbierten Antiseren gegen die SRPK79D:** Die immunhistochemische Färbung von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten mit den präadsorbierten Antiseren gegen die SRPK79D-PC- bzw. PB-Isoform bestätigten, dass nur die überexprimierten Kinasen detektiert werden können. Die SRPK79D-PC-GFP-Isoform ist an der Aktiven Zone lokalisiert und kolo­kalisiert teilweise mit Bruchpilot. Die SRPK79D-PB-GFP-Isoform wird nicht an die Aktive Zone transportiert. E bis H stellen Kontrollfärbungen dar und veranschaulichen, dass im Wildtyp und in der *Srpk79D*-Nullmutante keine Färbung der Aktiven Zone mit den Antiseren erfolgte. Größenskalierung: 5µm

Ergebnisse

Das Färbemuster bei SRPK79D-GFP-Überexpression im larvalen Gehirn zeigte für beide Isoformen eine Lokalisation im Perikaryon des Ventralganglions (Abbildung 3.4), dabei liegt die SRPK79D-PC-GFP-Isoform homogen verteilt im Zytoplasma der Zellkörper vor. Die SRPK79D-PB-GFP-Isoform wird lokal im Zytoplasma der Zellen akkumuliert (siehe Pfeile in Abbildung 3.4). Beide Isoformen sind nicht im Zellkern nachweisbar.

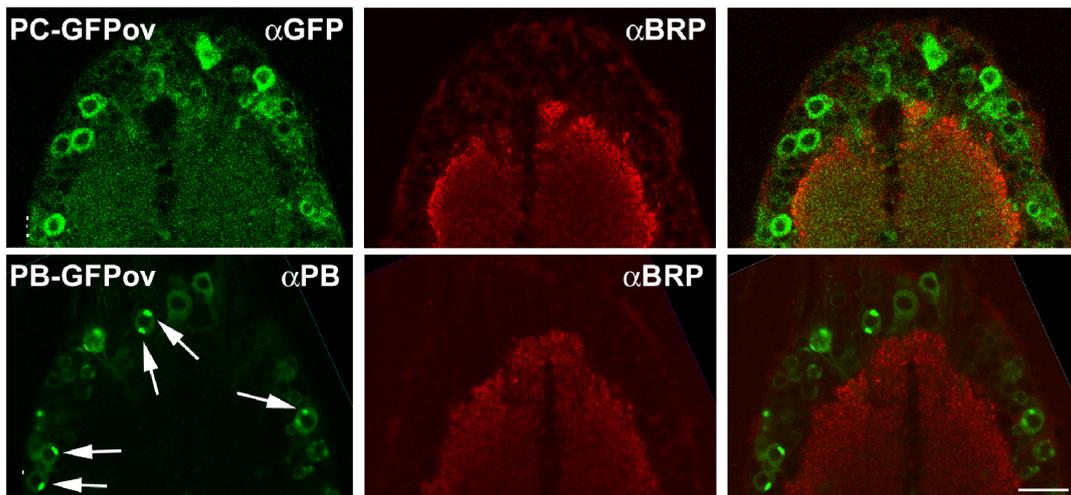


Abbildung 3.4. **Verteilungsmuster der panneural überexprimierten SRPK79D-GFP-Isoformen im larvalen Gehirn:** Immunhistochemische Färbung gegen Bruchpilot (nc82) und α GFP bzw. α PB larvaler Gehirne des dritten Larvenstadiums der Kinase-Überexpressionslinien. Beide Isoformen der SRPK79D-GFP sind im Zytoplasma lokalisiert, wobei die SRPK79D-PB-GFP-Isoform im Perikaryon des Ventralganglions lokal akkumuliert vorliegt (siehe Pfeile). Die SRPK79D-PC-GFP-Isoform ist einheitlich im Zytoplasma verteilt. Größenskalierung: 20 μ m

Um die Lokalisation des SRPK79D-Proteins im adulten Gehirn zu untersuchen, wurden Fluoreszenzfärbungen und Peroxidasefärbungen von Kryostatschnitten mit den Genotypen w^{1118} , $Srpk79D^{VN}$ und den Linien mit panneuraler Kinase-Überexpression durchgeführt. Die Präparate zeigten nur eine unspezifische Färbung (Daten nicht gezeigt; vgl. Bloch, 2007). Infolgedessen wurden Gehirne adulter Fliegen als 'whole mounts' präpariert und immunhistochemisch gefärbt. Das PC-Antiserum erkennt im adulten Fliegengehirn der Tiere mit panneuraler SRPK79D-PC-GFP-Überexpression den Ringkomplex und Bereiche des Fanshaped bodies. Ebenso werden zahlreiche neuronale Zellkörper und Teile des Pilzkörpers angefärbt. Im Wildtyp und der $Srpk79D$ -Nullmutante ist keine spezifische Färbung vorhanden (Abbildung 3.5).

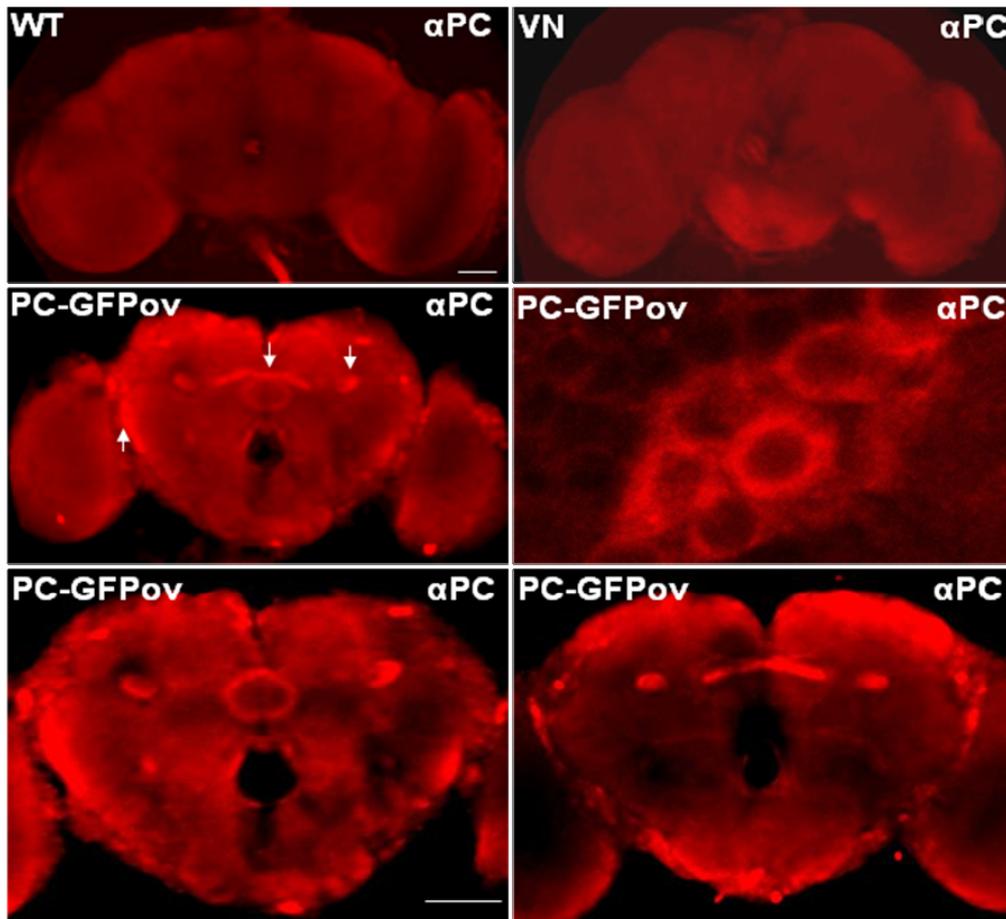


Abbildung 3.5. **Färbemuster bei panneuraler SRPK79D-PC-GFP-Überexpression im adulten Fliegengehirn:** Präparationen von Wildtyp, *Srpk79D*-Nullmutante und der PC-Überexpressionslinie wurden mit dem α PC-Serum gefärbt. In den Z-Projektionen von Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante sieht man nur eine unspezifische Färbung des Gehirns. In der SRPK79D-PC-GFP-Überexpressionslinie erkennt das PC-Antiserum den Fanshaped body, den Ringkomplex und Teile des Pilzkörpers. Ebenfalls sind neuronale Zellkörper deutlich angefärbt. Größenskalierung: 100 μ m

Die Färbung in Abbildung 3.6 mit dem α PB-Serum zeigt im adulten Fliegengehirn von Wildtyp im Vergleich zur Kinase-Nullmutante ebenfalls kein spezifisches Signal. Bei panneuraler SRPK79D-PB-GFP-Überexpression erhält man eine Färbung der Calyces der Pilzkörper und von neuronalen Zellkörpern. Auch im adulten Gehirn liegt die überexprimierte SRPK79D-PB-GFP-Isoform teilweise lokal akkumuliert im Zytoplasma der Zellen vor (siehe Pfeile in Abbildung 3.6).

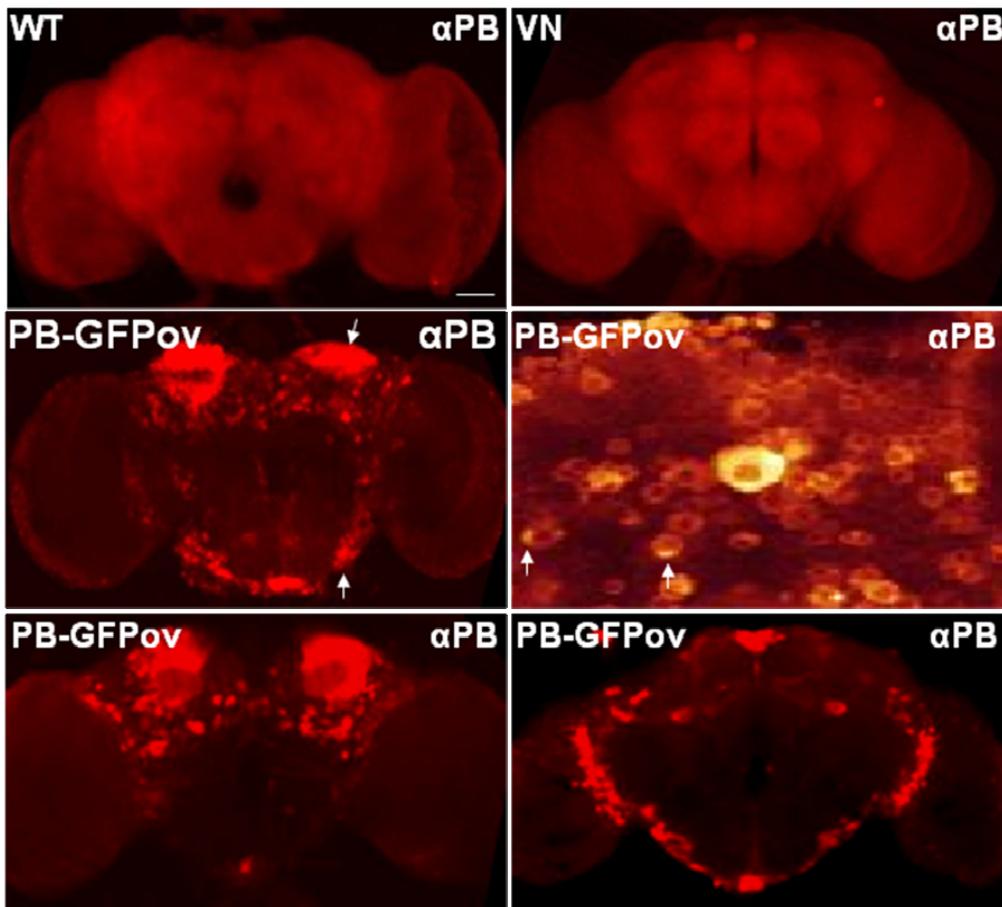


Abbildung 3.6. **Färbemuster bei panneuraler SRPK79D-PB-GFP-Überexpression im adulten Fliegenhirn:** Präparationen von Wildtyp, *Srpk79D*-Nullmutante und der SRPK79D-PB-GFP-Überexpressionslinie wurden mit dem α PB-Serum gefärbt. In der Z-Projektion von Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante kann keine spezifische Färbung des Gehirns festgestellt werden. In der SRPK79D-PB-GFP-Überexpressionslinie erkennt das PB-Antiserum lokale Akkumulationen in neuronalen Zellkörpern (siehe Pfeile) und die Calyces des Pilzkörpers. Größenskalierung: 100 μ m

3.1.2 Affinitätsaufreinigung der Antiseren gegen die SRPK79D

Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung der vorhandenen Antiseren aus Meerschweinchen und der kommerziell hergestellten Peptidantiseren gegen die SRPK79D, sollte eine Affinitätsaufreinigung vorgenommen werden. Dieser Versuch wurde schon in der Diplomarbeit begonnen und konnte damals aus Zeitmangel nicht beendet werden (Bloch, 2007). Zu Beginn wurden *E. coli* BL21-Zellen (Stratagene) mit dem pET28a-Konstrukt *SRPK79D-RB* bzw. *-RC* transformiert, wobei N-Terminal eine Abfolge von Histidinen angehängt wurde. Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen über eine Nickel-Agarose-Säule aufgereinigt, dabei erfolgte die Bindung der Nickel-Agarose an die Histidine der Fusionsproteine. Nach der Eluierung des Proteins von der Säule (Abbildung 3.7) wurden die Fraktionen mit Chloroform/Methanol gefällt.

Ergebnisse

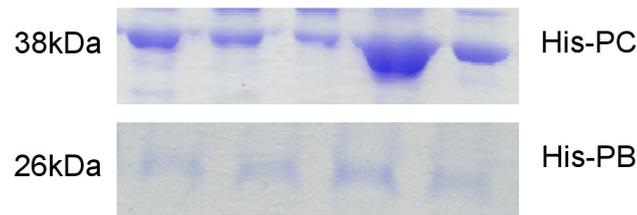


Abbildung 3.7. **Beispiel für die Proteinaufreinigung und Konzentrierung anhand einer Nickel-Agarose-Säule:** Das Fusionsprotein der SRPK79D-PB/PE-Gruppe besitzt eine Größe von 26kDa und das der SRPK79D-PC/PF-Gruppe 38kDa. Dargestellt ist eine Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels nach der Eluierung der Proteine von der Nickel-Agarose-Säule. Für beide Antiseren konnte die für die Aufreinigung notwendige Proteinmenge gewonnen werden.

Es konnte je 1mg des SRPK79D-PC/PF-Proteins und des SRPK79D-PB/PE-Proteins isoliert werden, wodurch eine Affinitätsaufreinigung der vier Peptidantiseren (16, 17, 18 und 19) und der beiden Domänen-Antiseren möglich wurde. Die affinitätsgereinigten Antiseren wurden anhand von Western Blots auf ihre Reinheit und Funktionsfähigkeit hin getestet. Wie schon die ungereinigten Seren, konnten auch die affinitätsgereinigten Seren gegen die beiden SRPK79D-Domänen die panneural überexprimierten Kinasen deutlich erkennen, jedoch waren sie nicht in der Lage, jeweils das endogene Protein zu detektieren. Das affinitätsgereinigte α PB-Serum wurde von A. Maicher im Zuge seiner Diplomarbeit getestet (Abbildung 3.8; Maicher, 2009).

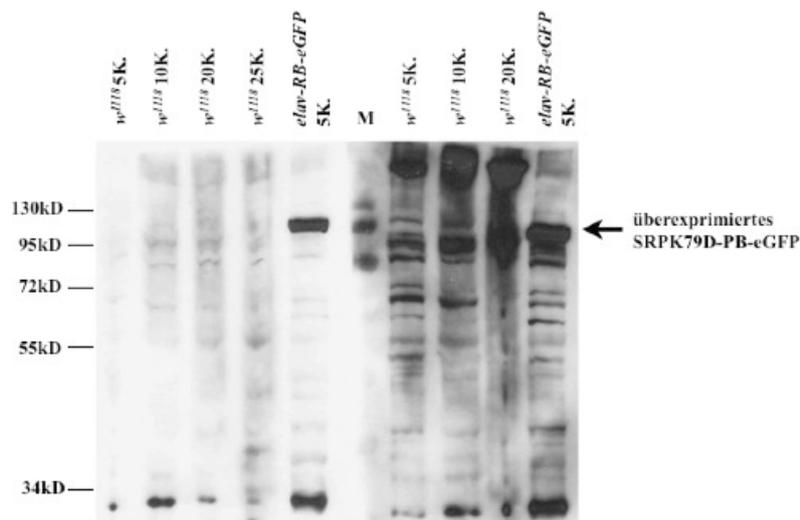


Abbildung 3.8. **Vergleich zwischen dem affinitätsgereinigten und dem ungereinigten α PB-Serum:** Western Blot nach der Affinitätsreinigung des α PB-Serums (links) im Vergleich zu dem ungereinigten Serum (rechts). Es wurde eine ansteigende Konzentration von Kopfhomogenaten verwendet. Das Serum detektierte nur die neuronal überexprimierte GFP-markierte SRPK79D-PB-Isoform bei 105kDa. Das ungereinigte α PB-Serum produzierte zahlreiche unspezifische Signale (Maicher, 2009).

Ergebnisse

Nachfolgend ist ein Western Blot mit einem der vier Peptidantiseren dargestellt. Die Peptidantiseren richten sich gegen zwei Peptide aus dem ersten Exon und somit gegen die SRPK79D-PC/PF-Isoformen. Das in Abbildung 3.9 dargestellte Peptidantiserum ist nicht in der Lage die überexprimierten Isoformen SRPK79D-PC/PF bei 110kDa zu erkennen. Dies galt auch für die anderen drei Peptidantiseren. Trotz der Aufreinigung zeigten die Antiseren im Western Blot eine hohe Hintergrundfärbung. Da die Peptidantiseren nicht in der Lage waren die Kinase zu detektieren, wurde nicht weiter mit ihnen gearbeitet.

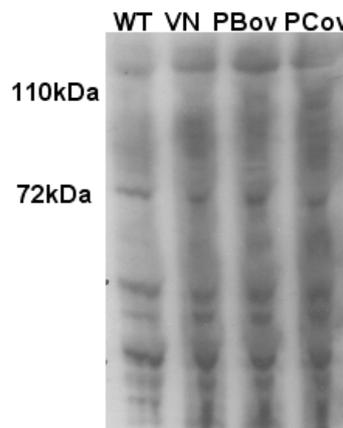


Abbildung 3.9. **Die Peptidantiseren können die SRPK79D nicht detektieren:** Western Blot mit je zehn Fliegenköpfen der Fliegenlinien: w^{1118} , $Srpk79D^{VN}$ und den zwei Kinase-Überexpressionslinien mit dem affinitätsgereinigten Peptidantiserum Nr. 18 (Verdünnung 1:1000). Das Antiserum kann weder die endogene Kinase bei 85kDa, noch die panneural überexprimierte SRPK79D-GFP-PC bei 110kDa detektieren.

3.2 Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten

Um zu überprüfen, ob neben den Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven auch Unterschiede in der Bruchpilot-Verteilung bei adulten $Srpk79D$ -Nullmutanten nachweisbar sind, wurden Kryostat-Gehirnschnitte hergestellt und gegen Bruchpilot (nc82) gefärbt. Die Abbildung 3.10 zeigt adulte $Srpk79D$ -Nullmutanten, die im Antennalnerv eine Agglomeration von Bruchpilot aufweisen. Beim Wildtyp liegt das Bruchpilot-Protein nahezu homogen verteilt vor. Auch hier sind kleine Agglomerate erkennbar, jedoch wesentlich seltener als in der $Srpk79D$ -Nullmutante (siehe Pfeile in Abbildung 3.10).

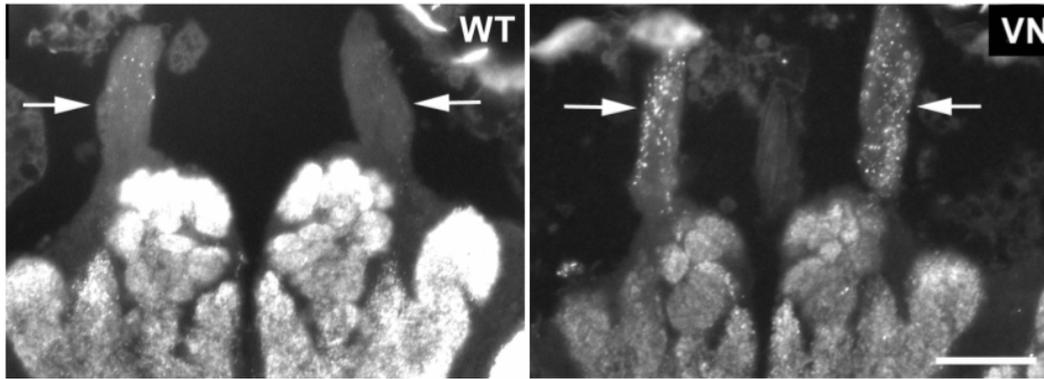


Abbildung 3.10. **Adulte *Srpk79D*-Mutanten zeigen Bruchpilot-Agglomerate im Antennalnerv:** Immunhistochemische Färbung gegen Bruchpilot (nc82) von Kryostatschnitten adulter *Drosophila*-Köpfe von Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante. Die Mutation im *Srpk79D*-Gen führt zu Agglomeraten des Bruchpilot-Proteins in Antennalnerven. Dagegen liegt im Wildtyp Bruchpilot nahezu gleichförmig im Antennalnerv verteilt vor. Größenskalierung: 50µm

3.3 Immunhistochemische Färbung larvaler Nerv-Muskel-Präparate mit Antikörpern gegen verschiedene Synapsenproteine

Die Mutation des *Srpk79D*-Gens oder die RNAi-vermittelte Reduktion der SRPK79D führen zu Bruchpilot Agglomeraten in larvalen Nervenbahnen (vgl. Bloch, 2007; Nieratschker, 2008; Johnson et al., 2009; Nieratschker et al., 2009). Dabei enthält ein typischer larvaler Nerv über 40 sensorische und motorische Axone. Um zu überprüfen, ob noch weitere Proteine akkumuliert werden, wurden larvale Nerv-Muskel-Präparate von Wildtyp und Kinase-Nullmutante hergestellt und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Es wurden Antikörper verwendet, die einen Defekt im axonalen Transport detektieren können (CSP und Synaptotagmin; Umbach et al., 1994; Zinsmaier et al., 1994; Hurd und Saxton, 1996; Eberle et al., 1998; Gindhart et al., 1998; Martin et al., 1999; Zhang et al., 2002; Gindhart et al., 2003; Miller et al., 2005; Zinsmaier et al., 2010), Antikörper, die gegen vesikuläre Proteine gerichtet sind (Synapsin, vGlut, SV und Syntaxin; Broadie et al., 1995; Mahr und Aberle, 2006; Akbergova et al., 2009; Hofbauer et al., 2009; Cesca et al., 2010) oder gegen potentielle Interaktionspartner von Bruchpilot (Liprin- α , Rab3, Syd-1 und SUK; Fouquet et al., 2009; Graf et al., 2009; Oswald et al., 2009; Hamanaka et al., 2010). Alle Färbungen zeigten, dass die Agglomeratbildung in der *Srpk79D*-Nullmutante bisher spezifisch für Bruchpilot ist (Abbildung 3.11). Der Vergleich der Proteinverteilung an Aktiven Zone zwischen Wildtyp und Nullmutante zeigte keine auffälligen Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

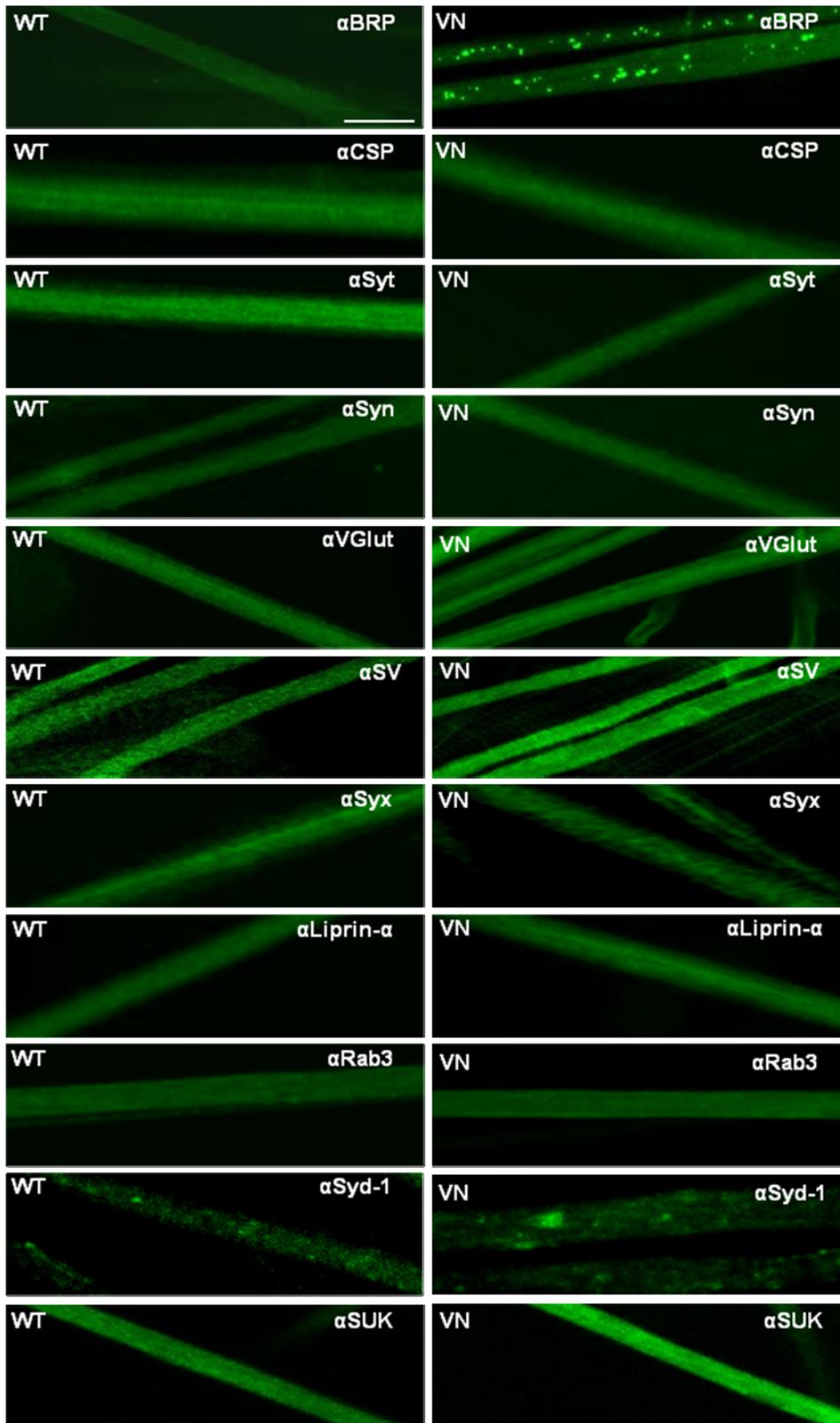


Abbildung 3.11. **Agglomerate sind in der *Srpk79D*-Nullmutante spezifisch für Bruchpilot:** Immunhistochemische Färbungen von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten wurden mit folgenden Antikörpern durchgeführt: anti-BRP (nc82), anti-CSP (ab49), anti-Synaptotagmin, anti-Synapsin (3c11), anti-vGlut, anti-SV, anti-Syntaxin, anti-Liprin- α , anti-Rab3, anti-Syd-1 und anti-SUK. Keiner der verwendeten Antikörper erkennt die Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante. Größenskalierung: 10 μ m

Ergebnisse

Zur näheren Charakterisierung der Kinase wurden Färbungen an larvalen Nerv-Muskel-Präparaten mit dem Glutamat III Rezeptor, Rab3 und Liprin- α in der SRPK79D-PC-GFP-Überexpressionslinie durchgeführt. Wie in Punkt 3.1.1 gezeigt, kolokalisieren Bruchpilot und die überexprimierte PC-Isoform der SRPK79D teilweise an den Aktiven Zonen von *Drosophila*-Larven. Das Protein Liprin- α ist wichtig für den Aufbau und Erhalt der Aktiven Zonen und für die Lokalisation von Vesikeln (Kaufmann et al., 2002; Meller et al., 2005; Fouquet et al., 2009). Die GTPase Rab3 reguliert die Verteilung von präsynaptischen Proteinen und ist für die Aufrechterhaltung der Aktiven Zone notwendig (Graf et al., 2009). Dabei zeigte sich, dass die neuronal überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform teilweise mit den Bruchpilot-Interaktionspartnern Liprin- α und Rab3 an der Aktiven Zone kolokalisiert (Abbildung 3.12). Die Färbung gegen den Glutamat III Rezeptor bestätigt die Lokalisation der SRPK79D-PC-GFP-Isoform an der Aktiven Zone.

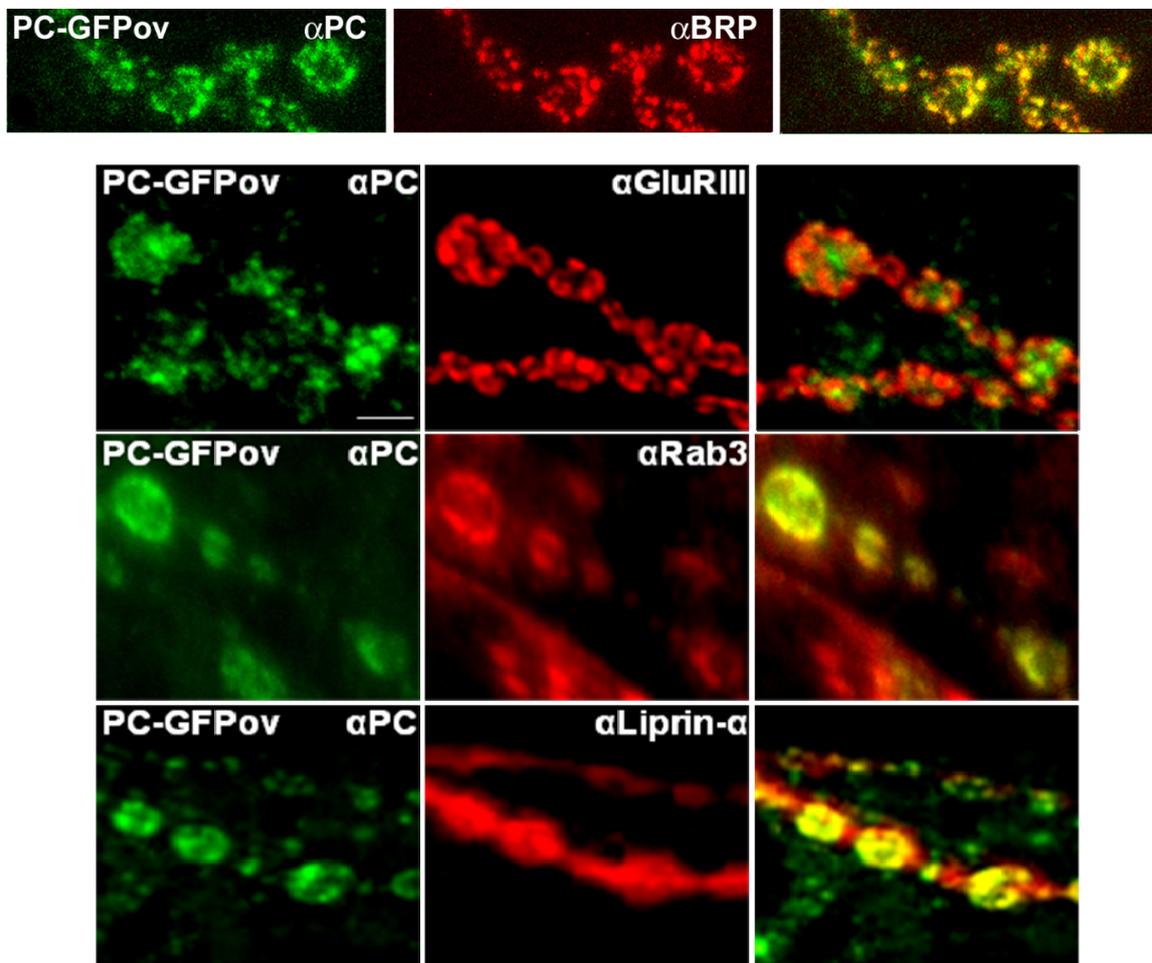


Abbildung 3.12. Die panneural überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform kolokalisiert mit Bruchpilot, Rab3 und Liprin- α an der Aktiven Zone: Immunhistochemische Färbungen von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten der Überexpressionslinie *UAS-Srpk79D-RC eGFP*, getrieben mit *elav-GAL4*. Die überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform kolokalisiert teilweise mit den Bruchpilot-Interaktionspartnern Rab3 und Liprin- α an der Aktiven Zone. Die Färbung gegen den Glutamat III Rezeptor bestätigt den Transport der SRPK79D-PC-GFP-Isoform an die Aktive Zone.

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von synaptischen Proteinen zu einer generellen Akkumulation des Bruchpilot-Proteins führt, wurden *UAS-Sap47 eGFP* (Reichmuth et al., 1995; Funk, 2003) und *UAS-Synapsin PKA 1 und 2 mutiert* (B. Michels) mit *elav-GAL4* gekreuzt und auf Bruchpilot-Agglomerate untersucht. Die Überexpression des Synapsen-assoziierten Proteins von 47kDa (Sap47) und des Synapsins führten weder zur Akkumulation des Bruchpilot-Proteins noch des eigentlichen überexprimierten Proteins (Daten nicht gezeigt).

3.4 Überprüfung des axonalen Transports durch Färbungen mit dem MitoTracker® Green FM

Eine Störung des axonalen Transports könnte die Agglomeration von Bruchpilot in den *Srpk79D^{VN}*-Larven verursachen (Hurd und Saxton, 1996; Grindhart et al., 1998; Martin et al., 1999; Zhang et al., 2002; Gindhart et al., 2003; Miller et al., 2005; vgl. auch Kapitel 3.3). Um den axonalen Transport genauer untersuchen zu können, wurden Färbungen mit dem grün-fluoreszierenden Mitochondrienfarbstoff MitoTracker® Green FM (Invitrogen) durchgeführt. Bei dieser Methode wird der verdünnte Farbstoff direkt auf die lebende, aufpräparierte Larve gegeben. Der Farbstoff diffundiert passiv durch Membranen und gelangt so in die Mitochondrien. In aktiven Mitochondrien erfolgt eine Akkumulation des Farbstoffs durch einen Oxidationsvorgang, der die Aktivierung des Fluoreszenzfarbstoffs bewirkt. Infolgedessen werden die Mitochondrien visualisiert und können unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Die Abbildungen 3.13 A und B zeigen die gefärbten und sich bidirektionell fortbewegenden Mitochondrien (Zinsmaier et al., 2009) in lebenden larvalen Nerv-Muskel-Präparaten von Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante. Diese Ergebnisse und die Färbungen gegen CSP und Synaptotagmin (vgl. Abbildung 3.11; Johnson et al., 2009) deuten darauf hin, dass der generelle axonale Transport durch die Mutation im *Srpk79D*-Gen nicht blockiert wird.

Ergebnisse

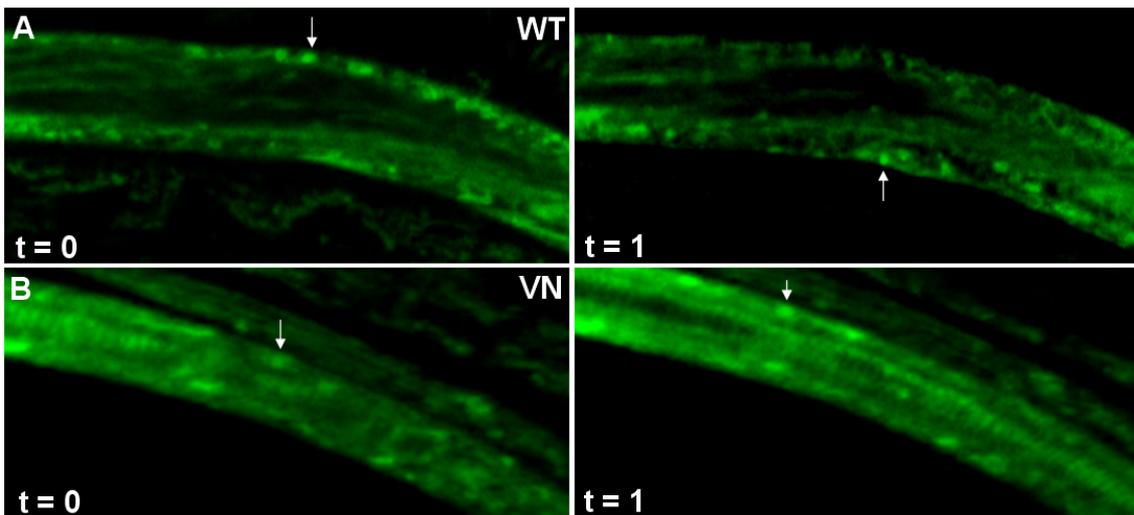


Abbildung 3.13. **Genereller axonaler Transport wird durch die Mutation im *Srpk79D*-Gen nicht blockiert:** Aufnahmen von Mitochondrien in lebenden Larven von Wildtyp und *Srpk79D^{VN}*. Der MitoTracker[®] Green FM Farbstoff diffundiert in die Mitochondrien und kann sich nach einer Oxidationsreaktion dort anreichern. In beiden Genotypen konnte die anterograde und retrograde Wanderung der Mitochondrien beobachtet werden (siehe Pfeile; t = 1 Minute).

3.5 Quantifizierungen der Anzahl von Boutons

V. Nieratschker konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass sich die Morphologie der synaptischen Boutons zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante nicht unterscheidet (Wiederholung des Versuchs in Abbildung 3.14; Nieratschker, 2008). Die Arbeitsgruppe von G. Davis war in der Lage eine 30%ige Reduktion des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot in der *Srpk79D^{P2}*-Mutante festzustellen (Johnson et al., 2009). Dies wurde in den *Srpk79D^{VN}*-Fliegen nicht quantitativ untersucht.

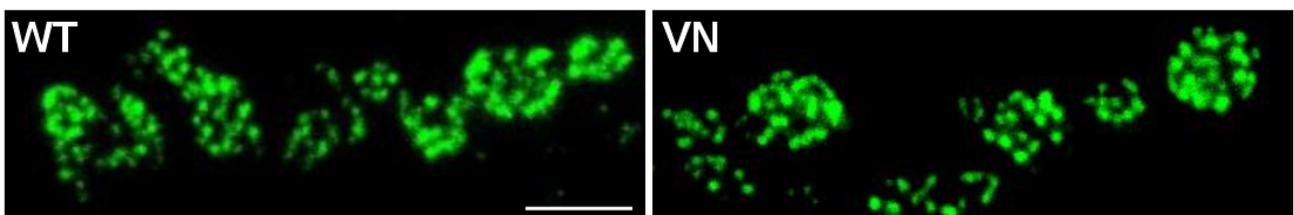


Abbildung 3.14. **Die Morphologie der synaptischen Boutons ist durch die Mutation im *Srpk79D*-Gen unbeeinflusst:** Immunhistochemische Färbungen gegen Bruchpilot (nc82) von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten. Die Morphologie der synaptischen Boutons und die Zahl Aktiven Zonen ist in der *Srpk79D*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp unverändert. In der Gruppe von G. Davis konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzstärke von Bruchpilot an der Aktiven Zone in der *Srpk79D^{P2}*-Mutante um circa 30% reduziert ist (Johnson et al., 2009). Größenskalierung: 5µm

Ergebnisse

Die quantitative Auswertung der Anzahl von Aktiven Zonen erfolgte im Muskelpaar 6/7 und 12/13 im Abdominalsegment A4 durch immunhistochemische Färbungen larvaler Nerv-Muskel-Präparate mit den monoklonalen Antikörpern nc46 gegen SAP47 bzw. nc82 gegen das Aktive Zone-Protein Bruchpilot. Mit Hilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops wurden die Präparate ausgewertet. Nc46 detektiert das Synapsen-assoziierte Protein SAP47, das in den synaptischen Boutons im Gehirn und der NMJ lokalisiert (Hofbauer et al., 2009). An der NMJ werden die Typen I, II und III Boutons sichtbar gemacht. Die NMJ von Muskelpaar 6/7 besteht aus Boutons vom Typ Ib, die vom Motoneuron RP3 gebildet werden, und aus Boutons des Typs Is, die vom Motoneuron MNSNb/d-Is her stammen (Keshishian, 1996). In der Abbildung 3.15 wurden die Ib-Boutons der Aktiven Zonen im Muskelpaar 6/7 bzw. 12/13 gezählt und ausgewertet. Die Auswertung ergab, dass die Anzahl der Ib-Boutons in der *Srpk79D*-Nullmutante nicht signifikant unterschiedlich vom Wildtyp ist. Somit beeinflusst die Mutation des *Srpk79D*-Gens nicht die Morphologie der synaptischen Boutons und die Zahl der Aktiven Zonen.

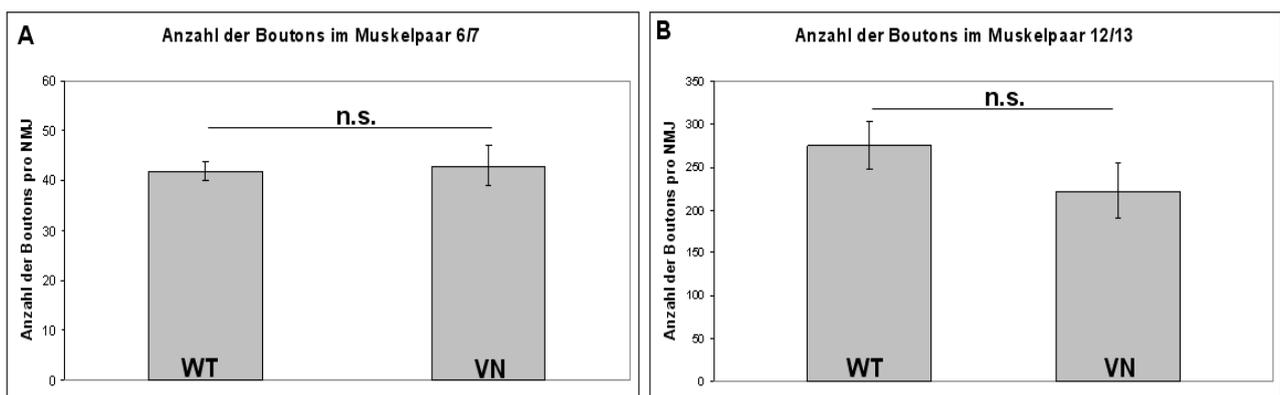


Abbildung 3.15. **Quantifizierung der Anzahl von Aktiven Zonen:** Für die Auszählung der Ib-Boutons wurden NMJs des vierten Abdominalsegments im Muskelpaar 6/7 (A) und 12/13 (B) von *Drosophila*-Larven des dritten Stadiums immunhistochemisch mit MAK nc46 (A) bzw. MAK nc82 (B) visualisiert. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Boutons nicht signifikant unterschiedlich zwischen *Srpk79D*-Nullmutante und Wildtyp ist. (N = 8; Student'scher T-Test mit Bonferroni-Korrektur; * signifikant ($p < 0,05$), ** hoch signifikant ($p < 0,01$), *** höchst signifikant ($p < 0,001$)).

3.6 Rettungsexperimente mit den Kinase-cDNAs im *Srpk79D*^{VN}-Hintergrund

In der Wissenschaft dienen sogenannte Rettungsexperimente (Rescue-Experimente) zur Bestätigung, dass ein vorhandener Phänotyp auf das mutierte Gen zurückzuführen ist. Erfolgt eine Rettung durch das Einbringen des wildtypischen cDNA-Konstrukts, kann man davon ausgehen,

dass der beobachtete Phänotyp durch den Gendefekt verursacht wird. In diesem Teilprojekt sollte untersucht werden, ob die einzelnen Isoformen der SRPK79D in der Lage sind den Agglomerat-Phänotyp der Kinase-Nullmutante zu retten (vgl. Nieratschker, 2008). Zunächst wurden larvale Nerv-Muskel-Präparate hergestellt und auf Bruchpilot-Agglomerate überprüft.

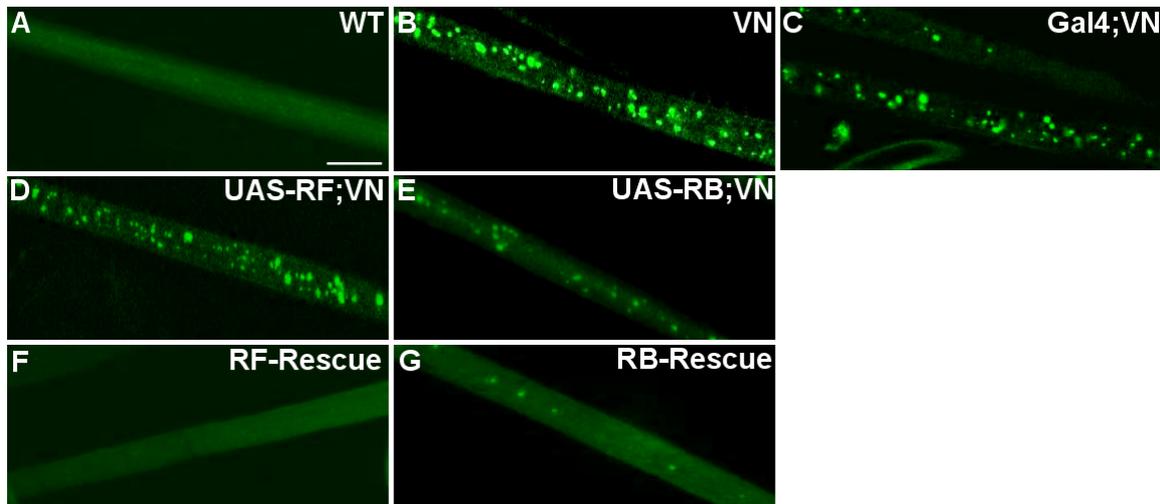


Abbildung 3.16 A-G. **Expression der SRPK79D-PF- oder PB-Isoform rettet den Agglomerat-Phänotyp:** Immunfluoreszenzfärbungen gegen Bruchpilot (nc82) von *Drosophila*-Larven des dritten Larvenstadiums. Der Wildtyp zeigt eine gleichmäßige Verteilung des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot entlang des Motoneuronaxons, wohingegen die *Srpk79D*-Nullmutante auffällige Bruchpilot-Agglomerate aufweist. Die parentalen Ausgangslinien im Nullmutanten-Hintergrund zeigen deutliche Bruchpilot-Agglomerate, vergleichbar zur Kinase-Nullmutante. Die Rettungslinien zeigen eine deutliche Rettung des Bruchpilot-Agglomerat-Phänotyps. Größenskalierung: 10µm

In Abbildung 3.16 zeigt der Wildtyp eine diffuse Verteilung des Bruchpilot-Proteins in den larvalen Motoneuronaxonen. Im Gegensatz dazu, weisen die *Srpk79D*-Nullmutante und parentalen Ausgangslinien im Nullmutanten-Hintergrund die auffälligen Bruchpilot-Agglomerate auf. In beiden Rettungslinien der F1-Generation erfolgte ein deutlicher Rettungseffekt des Agglomerat-Phänotyps. Somit scheinen beide Isoformen der SRPK79D in der Lage zu sein den Phänotyp zu retten (vgl. Nieratschker, 2008).

Wie schon in der Diplomarbeit (Bloch, 2007) gezeigt werden konnte, weisen die *Srpk79D^{VN}*-Fliegen eine reduzierte Lebensspanne und Verhaltensdefizite auf. Diese Defizite sind ähnlich zu denen in Bruchpilot-RNAi-Fliegen (Wagh et al., 2006), jedoch weniger stark ausgeprägt. Die Rettungsexperimente mit Fliegen der hypomorphen *Srpk79D^{P1}*-Mutante mit dem SRPK79D-PF-

Konstrukt zeigten, dass die Ausprägung der negativen Geotaxis, die Flugfähigkeit und die Laufaktivität vollständig wiederhergestellt werden können. Jedoch wurde die Lebenserwartung nur teilweise gerettet (Bock, 2006; Bloch, 2007; Nieratschker et al., 2009). Die Rettungsexperimente sollten mit den Fliegen im *Srpk79D*-Nullmutanten-Hintergrund wiederholt werden. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Lebensdauer der Rettungslinien und der parentalen Ausgangslinien. In der Abbildung 3.17 kann man erkennen, dass die *Srpk79D^{VN}*-Mutante eine deutlich geringere Lebenserwartung im Vergleich zum Wildtyp aufweist ($p = 4,2 \cdot 10^{-6}$). Die parentale *elav-GAL4*-Linie im *Srpk79D^{VN}*-Hintergrund besitzt eine höhere Sterblichkeitsrate als die *Srpk79D*-Nullmutante ($p = 0,006$). In beiden Rettungslinien konnte kein Rettungseffekt der Lebensdauer detektiert werden. Auch bei der Bestimmung der negativen Geotaxis konnte kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

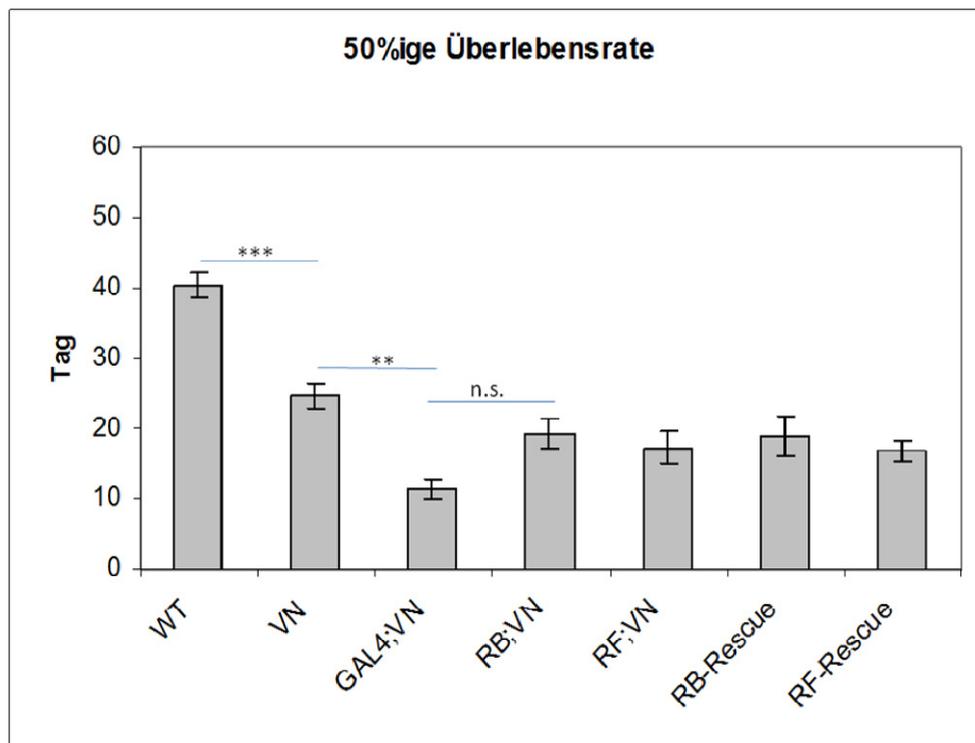


Abbildung 3.17. **Darstellung der 50%igen Überlebensrate:** Der Wildtyp lebt unter den gleichen Versuchsbedingungen durchschnittlich über 40 Tage, die *Srpk79D*-Mutante zeigt eine höchst signifikante Reduktion der Lebensdauer, ebenso wie die parentalen Linien im Nullmutanten-Hintergrund. Die Nachkommen der F1-Generation zeigen keinen signifikanten Rettungseffekt des Phänotyps (N = 10 mit je 100 Fliegen; Student'scher T-Test mit Bonferroni-Korrektur; * signifikant ($p < 0,05$), ** hoch signifikant ($p < 0,01$), *** höchst signifikant ($p < 0,001$)).

Da die Rettungsversuche mit der Treiberlinie *elav-GAL4;+;Srpk79D^{VN}* kein aussagekräftiges Ergebnis lieferten, wurden Rekombinationskreuzungen angesetzt, um eine andere panneurale GAL4-Treiberlinie, *w⁻;+;nSyb-GAL4*, in den *Srpk79D^{VN}*-Hintergrund zu bringen. Es konnte eine *w⁻;+;nSyb-GAL4, Srpk79D^{VN}*-Linie identifiziert werden (Abbildung 3.18).

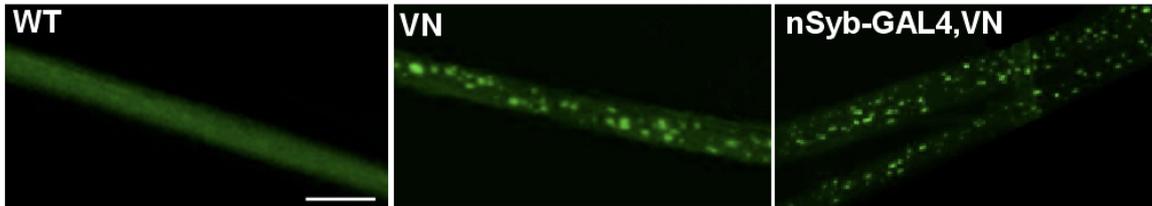


Abbildung 3.18. **Die generierte *w⁻;+;nSyb-GAL4, Srpk79D^{VN}*-Linie zeigt den Bruchpilot-Agglomerat-Phänotyp:** Immunhistochemische Färbung gegen Bruchpilot (nc82) von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten. Der Wildtyp zeigt eine diffuse Verteilung des Bruchpilot-Proteins in larvalen Motoneuronaxonen. Die Kinase-Nullmutante und die neue GAL4-Linie zeigen deutliche Bruchpilot-Agglomerate. Größenskalierung: 10µm

Mit der neuen Treiberlinie *w⁻;+;nSyb-GAL4, Srpk79D^{VN}* wurden die Verhaltensexperimente wiederholt, jedoch konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden (Maicher, 2009). Aus diesem Experiment folgt, dass die reduzierte Lebensdauer und die Verhaltensdefekte der Kinase-Nullmutante nicht durch die Expression einzelner SRPK79D-Isoformen unterdrückt werden können.

3.6.1. Kontamination der Fliegenlinie *w⁻;UAS-Srpk79D-RB eGFP;Srpk79D^{VN}* und ihre Wiederherstellung

Während der Diplomarbeit von A. Maicher wurde festgestellt, dass die *w⁻;UAS-Srpk79D-RB eGFP;Srpk79D^{VN}*-Linie eine Kontamination mit dem Wildtyp-Allel aufwies (Abbildung 3.19). Anhand einer Single Fly-PCR konnte gezeigt werden, dass die *UAS-Srpk79D-RB eGFP;Srpk79D^{VN}*-Linie heterozygot für das wildtypische Allel war, da der Primer ein Amplifikat von 775bp liefert (vgl. auch Abbildung 3.20).

Ergebnisse

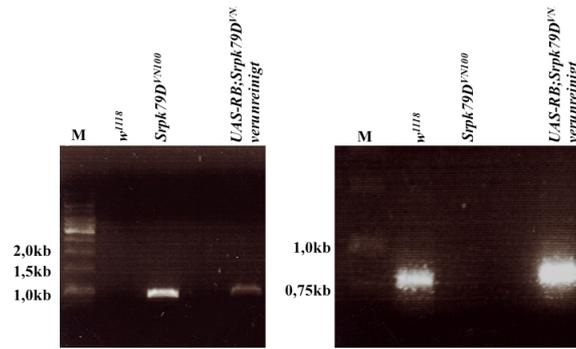
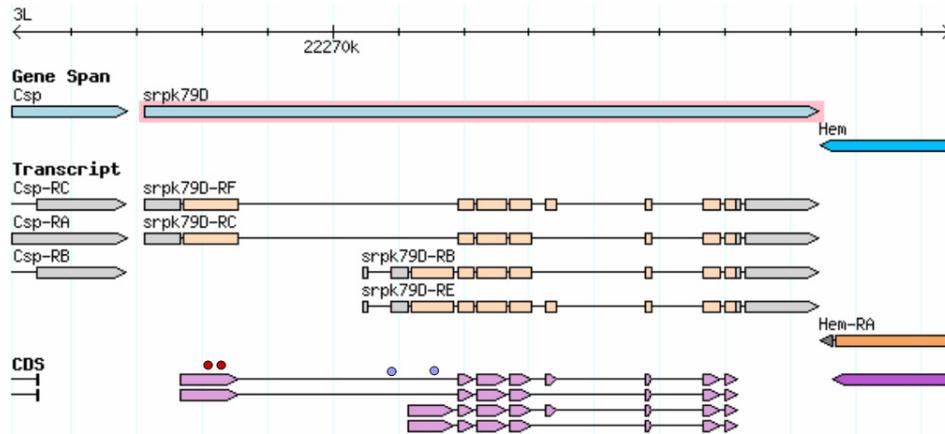


Abbildung 3.19. **Kontamination der Fliegenlinie $w;UAS-Srp79D-RB;Srp79D^{VN}$** : Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel nach einer Single Fly PCR mit dem Primerpaar P487 sense und 6PP anti (links) und $Srp79D-RBex1-fwd/ex2-rev$ (rechts). P487 sense und 6PP anti generiert nur bei vorhandenem $Srp79D^{VN}$ -Allel ein Produkt von 916bp, $Srp79D-RB-ex1-fwd/-ex2-rev$ dagegen nur ein wildtypisches Amplifikat von 775bp. Die getestete Fliege der $w;UAS-Srp79D-RB;Srp79D^{VN}$ -Linie zeigte Signale in beiden PCRs und war demnach heterozygot für den $Srp79D$ -Genlocus (Maicher, 2009).

Um diese kontaminierte Fliegenlinie wieder in den homozygot mutanten Hintergrund zu bringen, wurden 50 Single Fly-Kreuzungen angesetzt. Die Elterntiere wurden mit verschiedenen Primerkombinationen in Single Fly-PCRs getestet (siehe Tabelle in Abbildung 3.19).



Primer	Größe des Amplifikats
Intron 1 left und right	WT = 500bp
P487 sense und anti	WT = 804bp
Srp79D ex3 fw und VN rev ex5	WT = 1240bp VN = 1086bp
P487 sense und 6PP anti	WT = 4,5kb VN = 916bp

Abbildung 3.20. **Schematische Darstellung des $Srp79D$ -Genlocus und Lage der verwendeten Primer für die Single Fly-PCRs**: Farblich markiert sind die verwendeten Primerpaare für die durchgeführten Single Fly-PCRs zur Regenerierung der $UAS-Srp79D-RB eGFP$ -Linie im $Srp79D^{VN}$ -Hintergrund.

Ergebnisse

Nachfolgend werden nur zwei Abbildungen von Single Fly-PCRs mit den Nachkommen aus zwei erhaltenen Kandidaten-Linien dargestellt. Das Primerpaar P487 sense und 6PP anti generiert bei vorhandener Mutation im *Srpk79D*-Genlocus ein Amplifikat von 916bp (Abbildung 3.21). Durch die Bedingungen dieser Single Fly-PCR wurde das wildtypische PCR-Produkt von 4,5kb nicht hergestellt. Anhand dieser PCR konnte gezeigt werden, dass die Fliegenlinie *UAS-Srpk79D-RB^B eGFP* und *UAS-Srpk79D-RB^A eGFP* mindestens eine Kopie des *Srpk79D^{VN}*-Allels besitzen.

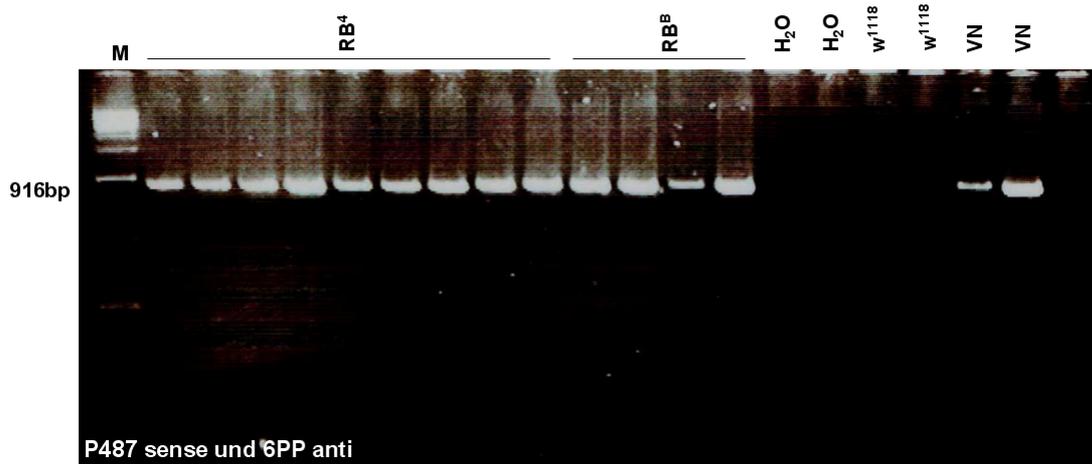


Abbildung 3.21. **Die zwei Kandidatenlinien besitzen das mutierte *Srpk79D*-Allel:** Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel nach einer Single Fly-PCR mit dem Primerpaar P487 sense und 6PP anti. Die zwei neuen Fliegenlinien *UAS-Srpk79D-RB^A eGFP* und *UAS-Srpk79D-RB^B eGFP* zeigten ein spezifisches Signal von 916bp, das dem Amplifikat der Nullmutante entspricht. Mit diesen Primern konnte gezeigt werden, dass beide Stöcke die Mutation im *Srpk79D*-Gen besitzen und sich somit im *Srpk79D^{VN}*-Hintergrund befinden. Das wildtypische Signal wäre bei 4,5kb, wird aber aufgrund der PCR-Bedingungen nicht amplifiziert.

Das Ergebnis der Single Fly-PCR in Abbildung 3.22 zeigt, dass die neuen Linien *UAS-Srpk79D-Srpk79D-RB^A eGFP* und *UAS-Srpk79D-RB^B eGFP* kein wildtypisches *Srpk79D*-Allel, sondern nur die RB-cDNA besitzen. Ein generiertes wildtypisches Amplifikat besitzt aufgrund des überspannten Introns eine Größe von 1240bp. Beide Linien befinden sich folglich wieder im *Srpk79D^{VN}*-Hintergrund und enthalten das cDNA-Konstrukt für die SRPK79D-PB-Isoform. In einer weiteren Single Fly-PCR konnte verifiziert werden, dass die Linien das cDNA-Konstrukt für die SRPK79D-PC-cDNA nicht im Genom beinhalten (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

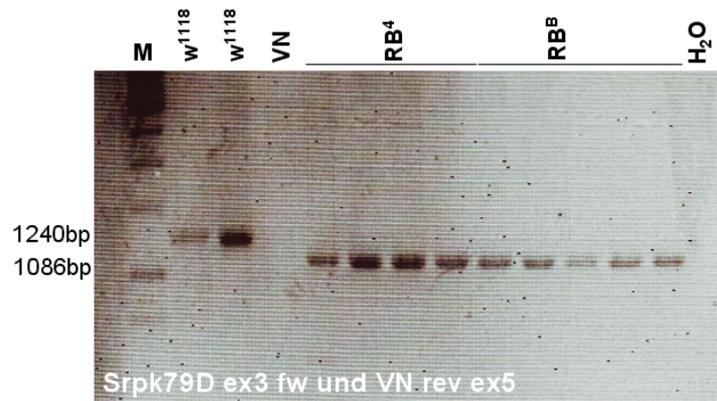


Abbildung 3.22. **Die zwei Kandidatenlinien enthalten das *Srpk79D-RB*-cDNA-Konstrukt, aber kein wildtypisches *Srpk79D*-Allel:** Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel nach einer Single Fly-PCR mit dem Primerpaar Srpk79D ex3 fw und VN rev ex5. Die zwei neu generierten Fliegenlinien zeigen ein spezifisches Signal bei 1086bp. Das wildtypische PCR-Produkt liegt bei 1240bp. Demnach besitzen beide Linien die *Srpk79D-RB*-cDNA im Nullmutanten-Hintergrund.

Die $w^-; UAS-Srpk79D-RB \ eGFP; Srpk79D^{VN}$ -Linie konnte wiederhergestellt werden. Diese Fliegen wurden anhand von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten kontrolliert und die Rescue-Kreuzung wurde mit $w^-; +; nSyb-GAL4, Srpk79D^{VN}$ wiederholt. Die $UAS-Srpk79D-RB \ eGFP; Srpk79D^{VN}$ -Linie zeigt auffällige Bruchpilot-Agglomerate, die typisch für die homozygote Mutation des *Srpk79D*-Gens sind (Abbildung 3.23). Die Larven der F1-Generation aus der Kreuzung mit der *nSyb-GAL4*-Linie zeigten einen deutlichen Rettungseffekt, somit konnte das vorherige Ergebnis bestätigt werden (vgl. Abbildung 3.16).

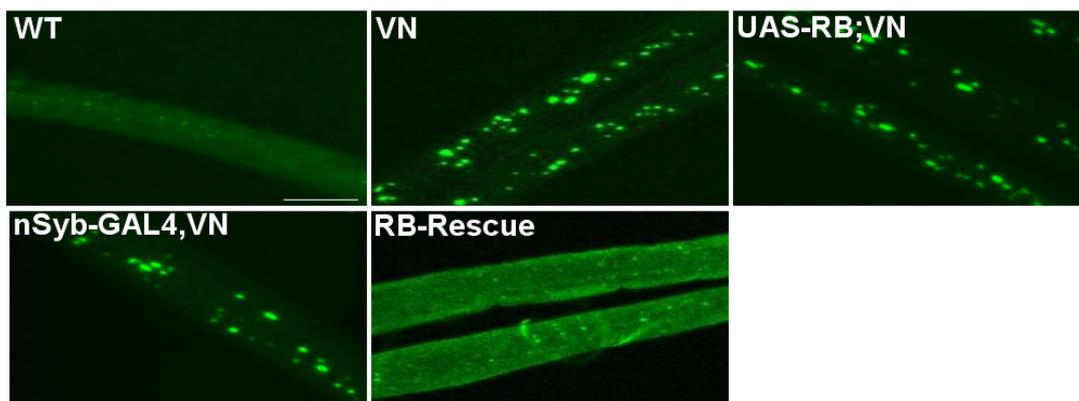


Abbildung 3.23. **Die SRPK79D-PB-Isoform rettet den Bruchpilot-Agglomerat-Phänotyp:** Immunhistochemische Färbung gegen Bruchpilot (nc82) von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten. Der Wildtyp zeigt eine gleichmäßige Verteilung von Bruchpilot in den Nerven. Die parentalen Ausgangslinien im Nullmutanten-Hintergrund zeigen zur *Srpk79D*-Nullmutante vergleichbare auffällige Bruchpilot-Agglomerate. Die RB-Rettungslinie zeigt eine deutliche Verbesserung des Phänotyps. Somit ist die *Srpk79D-PB*-cDNA in der Lage den Bruchpilot-Agglomerat-Phänotyp weitgehend zu retten. Größenskalierung: 10µm

3.6.2 Rettungsexperimente mit *UAS-Srpk79D-RB eGFP* im *Srpk79D^{P2}*-Hintergrund

In einer parallelen Studie konnte ein Rettungseffekt der Bruchpilot-Agglomeration in larvalen Nerven nur mit der *Srpk79D-RC*-cDNA erzielt werden, jedoch nicht mit der *Srpk79D-RB*-cDNA (Johnson et al., 2009). Der Rescue mit dem SRPK79D-PB-Konstrukt sollte im *Srpk79D^{P2}*-Hintergrund wiederholt werden. In der *Srpk79D^{P2}*-Linie liegt das P-Element im achten Intron und führt zum Ausfall aller Transkripte (Abbildung 3.24).

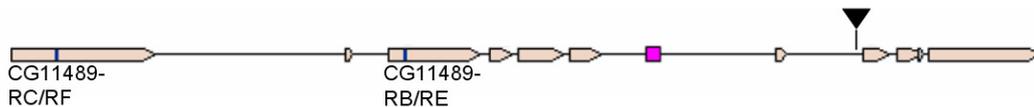


Abbildung 3.24. **Schematische Darstellung des CG11489 Genlocus:** Eingezeichnet ist die PBac-Insertion im achten Intron der *Srpk79D^{P2}*-Linie. Diese Linie wurde für den RB-Rescue im *Srpk79D^{P2}*-Hintergrund verwendet. Quelle: modifiziert nach Nieratschker et al., 2009

Die *UAS-Srpk79D-RB eGFP*-Linie wurde in den *Srpk79D^{P2}*-Hintergrund gekreuzt und die panneurale Expression wurde mit *elav-GAL4;Srpk79D^{VN}* erreicht. Die Ausgangslinien für dieses Rettungsexperiment zeigten in Abbildung 3.25 eine zur Nullmutante vergleichbare Agglomeration von Bruchpilot. Auch die Rettungslinie zeigt Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Nerven, jedoch weniger ausgeprägt als die Ausgangslinien.

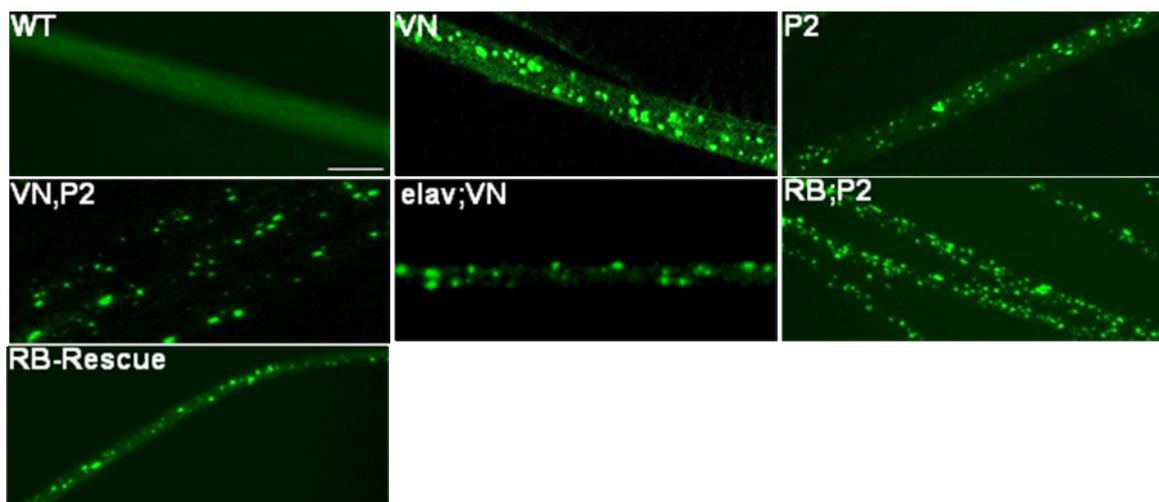


Abbildung 3.25. **Rettungsexperiment im *Srpk79D^{P2}*-Hintergrund mit der SRPK79D-PB-Isoform:** Der Wildtyp zeigt eine gleichmäßige Verteilung des Bruchpilot-Proteins, wohingegen in den *Srpk79D*-Mutanten auffällige Bruchpilot-Agglomerate in den larvalen Nerven zu sehen sind. Die Rettungslinie zeigt ebenfalls eine Agglomeration von Bruchpilot. Größenskalierung: 10µm

3.7 Dephosphorylierungsversuche und 2D-Gelelektrophorese-Experimenten

Durch die Phosphorylierung ihrer Substrate regulieren Kinasen die Funktion von Proteinen. Aber auch die Kinasen selbst werden durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung in ihrer Funktionalität beeinflusst (Yeakley et al., 1999; Stamm, 2008). Mit dem Onlinetool KinasePhos (Abbildung 3.26) konnten zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen der SRPK79D-Isoformen bestimmt werden. Daher wurde versucht, durch einen Verdau mit alkalischer Phosphatase den Phosphorylierungszustand der Kinase in der Fliege festzustellen. Da die Antiseren gegen die SRPK79D-PB- und PC-Isoform nicht in der Lage sind die endogene Kinase zu detektieren, wurden die Linien mit panneuraler Kinase-Überexpression für diesen Versuch verwendet.

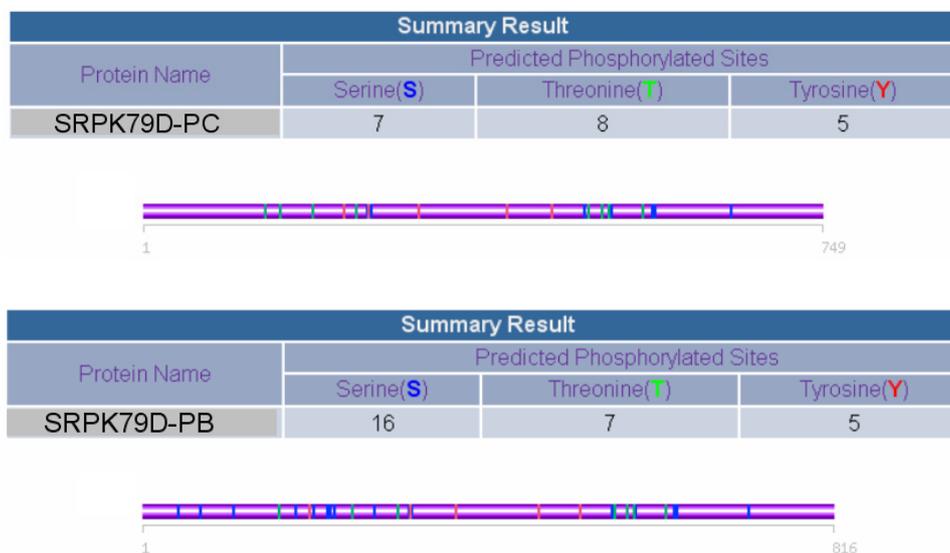


Abbildung 3.26. Vorhersage von potentiellen Phosphorylierungsstellen aufgrund der Peptidsequenz von CG11489 durch KinasePhos (farbig gekennzeichnet). SRPK79D-PC besitzt 20 und SRPK79D-PB 28 Phosphorylierungsstellen. Quelle: <http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>

Ein Homogenat aus adulten Köpfen dieser Linien wurde auf drei Ansätze verteilt. Der einen Probe wurde alkalischer Phosphatase mit Probenpuffer zugegeben. Die Negativkontrolle enthielt nur den Puffer, ohne Phosphatase. Die Dephosphorylierung der gesamten Proteine erfolgte durch eine Inkubationszeit für 15 Minuten bei 37°C. Als Temperaturkontrolle diente der dritte unbehandelte Ansatz, der auf Eis belassen wurde. Um die Ansätze vergleichen zu können, wurde anschließend ein Western Blot durchgeführt.

Ergebnisse

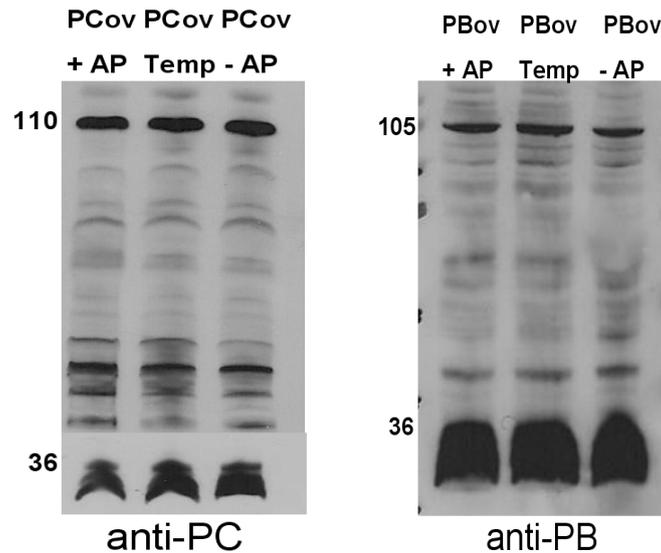


Abbildung 3.27. **Keine detektierbare Dephosphorylierung der SRPK79D nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase erkennbar:** Western Blot mit Homogenaten aus adulten *Drosophila*-Köpfen. Das Cysteine string protein (CSP, 34kDa) diente als Beladungskontrolle. Es wurden drei Ansätze getestet. Dem ersten Ansatz wurde die alkalische Phosphatase mit Puffer zugegeben und bei 37°C inkubiert. Der zweite Ansatz diente als Kontrolle für den Einfluss der Temperaturbehandlung und wurde auf Eis belassen. Der dritte Ansatz enthielt nur den Probenpuffer, ohne Phosphatase mit Inkubationszeit bei 37°C. Pro Tasche wurde ein Homogenat aus zehn adulten Fliegenköpfen geladen. Die überexprimierte SRPK79D-PB- und PC-GFP-Isoform zeigten nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase keine detektierbare Dephosphorylierung.

In einem konventionellen Western Blot konnten keine Veränderungen der SRPK79D-Isoformen nach Dephosphorylierung detektiert werden. Deswegen wurden 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt. Bei einer 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine erst nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und anschließend erfolgt eine Trennung entsprechend dem Molekulargewicht in einer SDS-PAGE. Das Homogenat vor bzw. nach einem Phosphatase-Versuch wurde anhand einer 2D-Gelelektrophorese getestet. Das 2D-Gelelektrophorese-Experiment nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase ergab keinen Hinweis auf eine mögliche Phosphorylierung der überexprimierten SRPK79D-GFP (Daten nicht gezeigt). Infolgedessen konnte nicht geklärt werden, ob die überexprimierte Kinase phosphoryliert in der Fliege vorliegt.

Das vesikuläre Phosphoprotein Synapsin spielt eine entscheidende Rolle bei der Anheftung der Vesikel an das Zytoskelett. Synapsin interagiert mit vielen Proteinen, um eine gezielte Transmission zu gewährleisten. Durch den Einstrom von Kalzium werden die Vesikel vom Zytoskelett losgelöst und sind für die Ausschüttung der Neurotransmitter bereit (Benferati, 1991; Chi et al., 2001; Südhof, 2004). Das Synapsin-Protein wurde anhand von Western Blot-Analysen und 2D-Gelelektrophorese-Experimenten untersucht. Im Western Blot konnte kein Unterschied in der

Proteinmenge zwischen Kinase-Nullmutante und Wildtyp detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Anhand von 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot konnte das spezifische Isoformmuster von Synapsin dargestellt werden. Hier zeigte sich, dass die Mutation im *Srpk79D*-Locus keinen deutlichen Effekt auf das Isoformmuster des Synapsins ausübt (Abbildung 3.28). Dieser Befund macht es unwahrscheinlich, dass Synapsin ein prominentes Substrat der SRPK79D-Kinase ist, da vermutlich zumindest einige der Isoformen mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkt auf Phosphorylierung beruhen. Der Möglichkeit, dass Bruchpilot und Synapsin miteinander interagieren könnten, wurde durch Immunpräzipitationen mit nc82 (anti-Bruchpilot) bzw. 3c11 (anti-Synapsin) untersucht. Diese Versuche lieferten keinen Hinweis auf eine mögliche Interaktion (Daten nicht gezeigt).

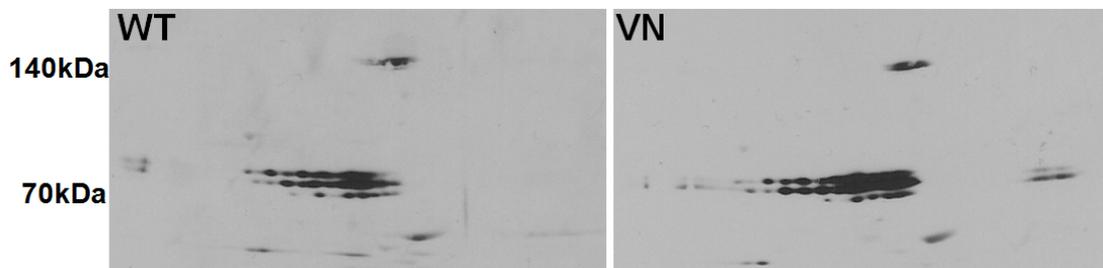


Abbildung 3.28. **Mutation im *Srpk79D*-Locus beeinflusst das Isoformmuster von Synapsin nicht erkennbar:** 2D-Gelelektrophorese durchgeführt mit Kopfhomogenaten aus 25 adulten Fliegen der Linien *w¹¹¹⁸* und *Srpk79D^{VN}*. Es konnte kein deutlicher Unterschied im Isoformmuster des Synapsins in der *Srpk79D*-Mutante detektiert werden.

3.8 Experimente mit dem Bruchpilot-Protein in *Srpk79D*-Nullmutanten

3.8.1 Untersuchungen des Bruchpilot-Proteins auf RNA- und Proteinebene

Die Überexpression des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot führt, ähnlich der Mutation im *Srpk79D*-Gen, zu Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven bei *Drosophila* (Kittel et al. 2006; Wagh et al. 2006). Um die Frage zu klären, ob die Agglomeratbildung in den larvalen Axonen der *Srpk79D*-Nullmutante aufgrund einer Überexpression von Bruchpilot ausgelöst wird, wurden zunächst Immunpräzipitationen durchgeführt. Wie man in Abbildung 3.29 sehen kann, zeigt der Western Blot nach einer Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper nc82 gegen Bruchpilot keinen Unterschied in der Bruchpilotmenge zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante. Dies bestätigt das Ergebnis von V. Nieratschker (Nieratschker, 2008), die in einem Western Blot mit

Ergebnisse

ansteigender Homogenatkonzentration von adulten *Drosophila*-Köpfen ebenfalls keinen Unterschied in der Bruchpilotmenge zwischen Wildtyp und *Srpk79D^{Pl}*-Mutante detektieren konnte.

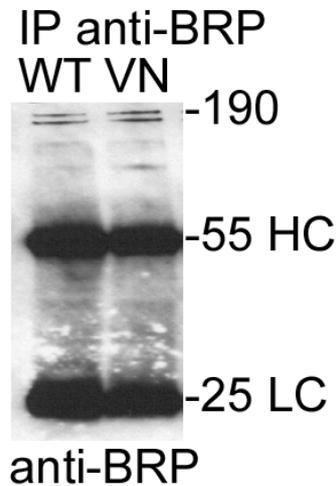


Abbildung 3.29. **Proteinmenge von Bruchpilot ist in *Srpk79D*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unverändert:** Western Blot nach einer Immunpräzipitation aus einem Homogenat aus adulten Fliegenköpfen gegen Bruchpilot, gefärbt mit nc82. In Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante sind vergleichbare Mengen des Bruchpilot-Proteins vorhanden. HC und LC bezeichnen die schwere und leichte Kette des Antikörpers.

Die Phosphorylierung von Serin/Arginin-reichen Proteinen (SR-Proteinen) durch SR-Proteinkinasen modifiziert wichtige Komponenten der Spleißmaschinerie. Die phosphorylierten SR-Proteine wandern in den Zellkern und sind am alternativen und konstitutiven Spleißen beteiligt (Roth et al., 1991; Manley et al., 1996; Cáceres et al., 1998; Graveley, 2000). Die Akkumulation von Bruchpilot in den *Srpk79D^{VN}*-Fliegen könnte aufgrund von Fehlspleißen der Bruchpilot-prä-mRNA resultieren. Zunächst wurde die Gesamt-RNA mittels einer reversen Transkription mit dem Oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben und mit verschiedenen Primerkombinationen getestet. Eine semiquantitative RT-PCR ermöglicht die Detektion von Unterschieden in der Transkriptmenge eines Gens durch die Analyse des PCR-Produkts nach 25, 28, 31 und 34 Zyklen. Die Primerkombinationen, die für diesen Versuch verwendet wurden, sind in Abbildung 3.30 graphisch dargestellt.

Ergebnisse

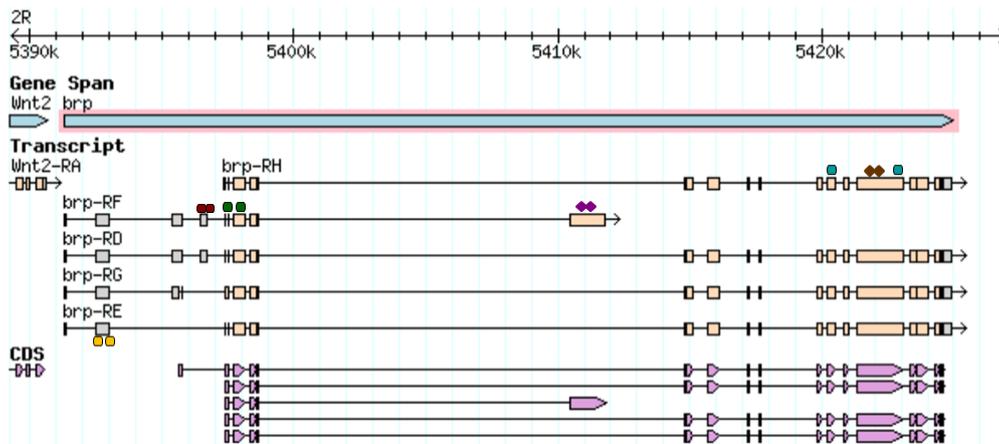


Abbildung 3.30. Schematische Darstellung des *brp*-Gens und die für die semiquantitative RT-PCR bzw. quantitative Real Time-PCR verwendeten Primerpaare: Die für die semiquantitative RT-PCR verwendeten Primer sind als Kreise eingezeichnet. Rauten stellen Primer für die Real Time-PCR dar und generieren immer ein Amplifikat von 100bp. Quelle: <http://flybase.org>.

Nachfolgend ist eine semiquantitative RT-PCR als Beispiel dargestellt. Als Referenzwert diente das Haushaltsgen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD). Das verwendete Primerpaar erfasst alle Bruchpilot-Transkripte und bildet ein Amplifikat von 500bp (Abbildung 3.30, grün markiert). Das Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR in Abbildung 3.31 zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Transkriptmenge von Bruchpilot zwischen *Srpk79D*-Mutante und Wildtyp. Die durchgeführten RT-PCRs mit den anderen in Abbildung 3.30 dargestellten Primerpaaren konnten ebenfalls keinen Unterschied in der Transkriptmenge detektieren (Daten nicht gezeigt).

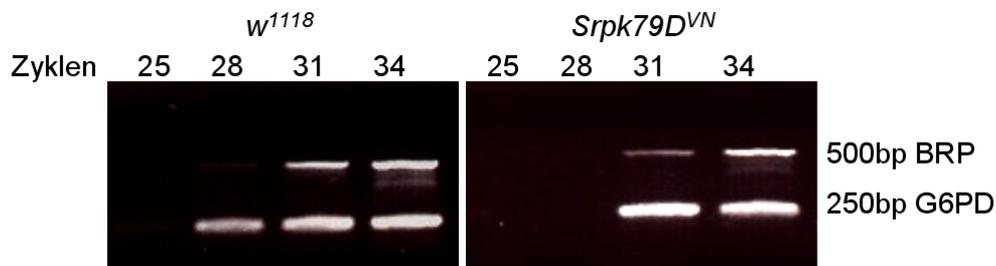


Abbildung 3.31. **Die *Srpk79D*-Mutation beeinflusst nicht die Bruchpilot-Transkriptmenge:** Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel einer semiquantitativen RT-PCR mit dem Primerpaar BRP 500bp RT sense und anti und dem Kontrollprimern G6PD. Getestet wurde die cDNA von *w¹¹¹⁸* und *Srpk79D^{VN}*-Mutanten. Der Anstieg der Amplifikatmenge wurde nach 25, 28, 31 und 34 Zyklen erfasst. Es konnte kein Unterschied in der Expressionsstärke des Bruchpilot-Transkripts zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Mutante detektiert werden.

Ergebnisse

Die quantitative Real Time-PCR dient zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, wobei eine Quantifizierung durch den CYBR Green Fluoreszenzfarbstoff (QIAGEN) erfolgt. Diese Methode ist sensitiver als eine semiquantitative RT-PCR. Da die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt, kann in der exponentiellen Phase die Quantifizierung stattfinden. Die Auswertung erfolgte mit dem REST-Programm (Relative Expression Software tool; www.gene-quantification.de/Rest.html) und Excel. Die für die Real Time-PCR verwendeten Primer sind in Abbildung 3.30 als farbige Rauten dargestellt und generieren immer ein Amplifikat von 100bp. Bei diesem Versuch wurden zwei verschiedene Bruchpilot-Transkripte erfasst. Zum einen die kurze Bruchpilot-RF-Isoform und zum anderen alle großen Bruchpilot-Transkripte (RH, RD, RG und RE). Die Real Time-PCRs wurden mit den Primerpaaren BRP 100bp RT sense und anti bzw. BRP RT hinten sense und anti durchgeführt. Als Kontrolle diente das ribosomale Protein LP0 (RpLP0). Wie man in Abbildung 3.32 sehen kann, ist die cDNA-Konzentration von Bruchpilot in Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante vergleichbar. Somit scheint die Transkription des *brp*-Gens nicht durch die *Srpk79D*-Mutation beeinflusst zu werden. Anhand von Western Blot-Analysen, Immunpräzipitationen, semiquantitativen RT-PCRs und Real Time-PCRs konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge und Proteinmenge von Bruchpilot sich in der *Srpk79D*-Nullmutante nicht signifikant zum Wildtyp unterscheidet.

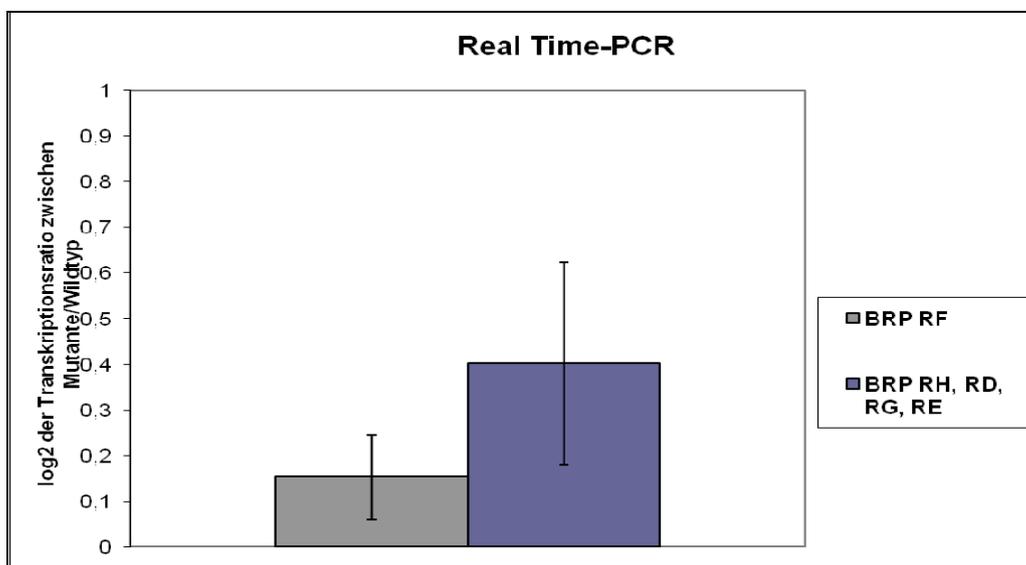


Abbildung 3.32. **Die Bruchpilot-Transkriptmenge unterscheidet sich zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante nicht auffällig:** Quantitative Real Time-PCR mit den Primern BRP 100bp RT sense und anti bzw. BRP RT hinten sense und anti. Als Referenzwert diente das ribosomale Protein LP0. Positive Werte zeigen eine Amplifikation des Transkripts an. Dargestellt ist jeweils die Ratio von Wildtyp zu Mutante. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Transkriptmenge von Bruchpilot zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante detektiert werden.

3.8.2 Experimente mit den neuen Bruchpilot-Antiseren D2 und N-Term

Der monoklonale Antikörper nc82 ist gegen den C-Terminus von Bruchpilot gerichtet (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006). In der Gruppe von S. Sigrist wurden zwei weitere Antiseren gegen das Aktive Zone-Protein Bruchpilot generiert. Aus diesem Anlass erfolgte eine Einteilung der Bruchpilot-cDNA in vier Teile: die erste Domäne enthält die Aminosäuren 1 – 320, die zweite Domäne 268 – 617, die dritte Domäne 473 – 1226 und die vierte Domäne enthält die Aminosäuren 1152 - 1740. Das N-Term Antiserum ist gegen das Peptid CREPRDRSRDRSLER gerichtet und detektiert den N-Terminus von Bruchpilot. Das D2-Antiserum richtet sich gegen die zweite Domäne der Bruchpilot-cDNA (Fouquet et al., 2009). Diese Antiseren wurden in Western Blot-Analysen und an larvalen Nerv-Muskel-Präparaten untersucht. Die RNAi-Linie C8 gegen Bruchpilot diente bei diesen Experimenten als Negativkontrolle. Wie man in Abbildung 3.33 sehen kann, unterscheidet sich die detektierte Bruchpilot-Proteinmenge durch die neuen Antiseren nicht in der *Srpk79D*-Nullmutante vom Wildtyp. Dies bestätigt das Western Blot Ergebnis mit dem monoklonalen Antikörper nc82 (vgl. Abbildung 3.29). Das N-Term Antiserum erkennt die großen Bruchpilot-Isoformen (PH, PD, PG und PE) und die kleine PF-Isoform bei 83kDa.

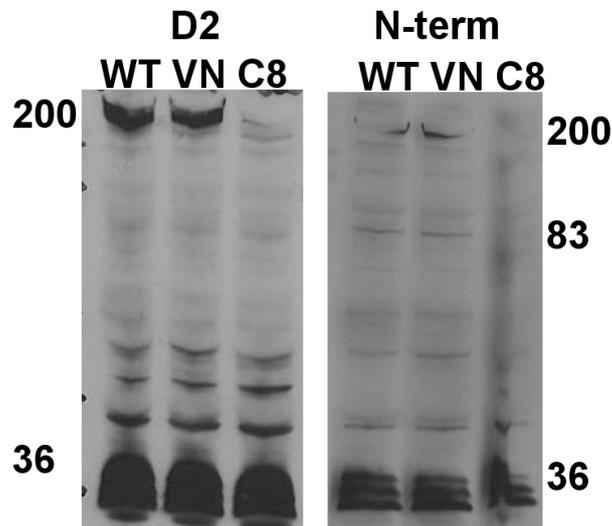


Abbildung 3.33: **Die Proteinmenge von Bruchpilot ist in Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante vergleichbar:** Western Blot mit dem D2-Antiserum (links) und dem N-terminalen Bruchpilot-Antiserum (rechts). Es wurde pro Tasche ein Homogenat aus zehn (links) und fünf (rechts) adulten Fliegenköpfen geladen. Die Menge an Bruchpilot-Protein scheint in Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante vergleichbar zu sein. Als Negativkontrolle wurde die Bruchpilot-RNAi Linie *elav-GAL4;UAS-brp-C8* verwendet. Das Cysteine string protein (CSP) bei 34kDa diente als Beladungskontrolle.

Ergebnisse

In den Präparaten in Abbildung 3.34 erkennen beide Antiseren die Bruchpilot-Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante. Die Färbung mit dem D2-Antiserum und N-term Antiserum zeigten eine Kolokalisation mit dem nc82-Signal. Der Wildtyp zeigt sowohl beim D2- als auch beim N-Term Antiserum eine gleichmäßige Verteilung des Bruchpilot-Proteins in den larvalen Nerven.

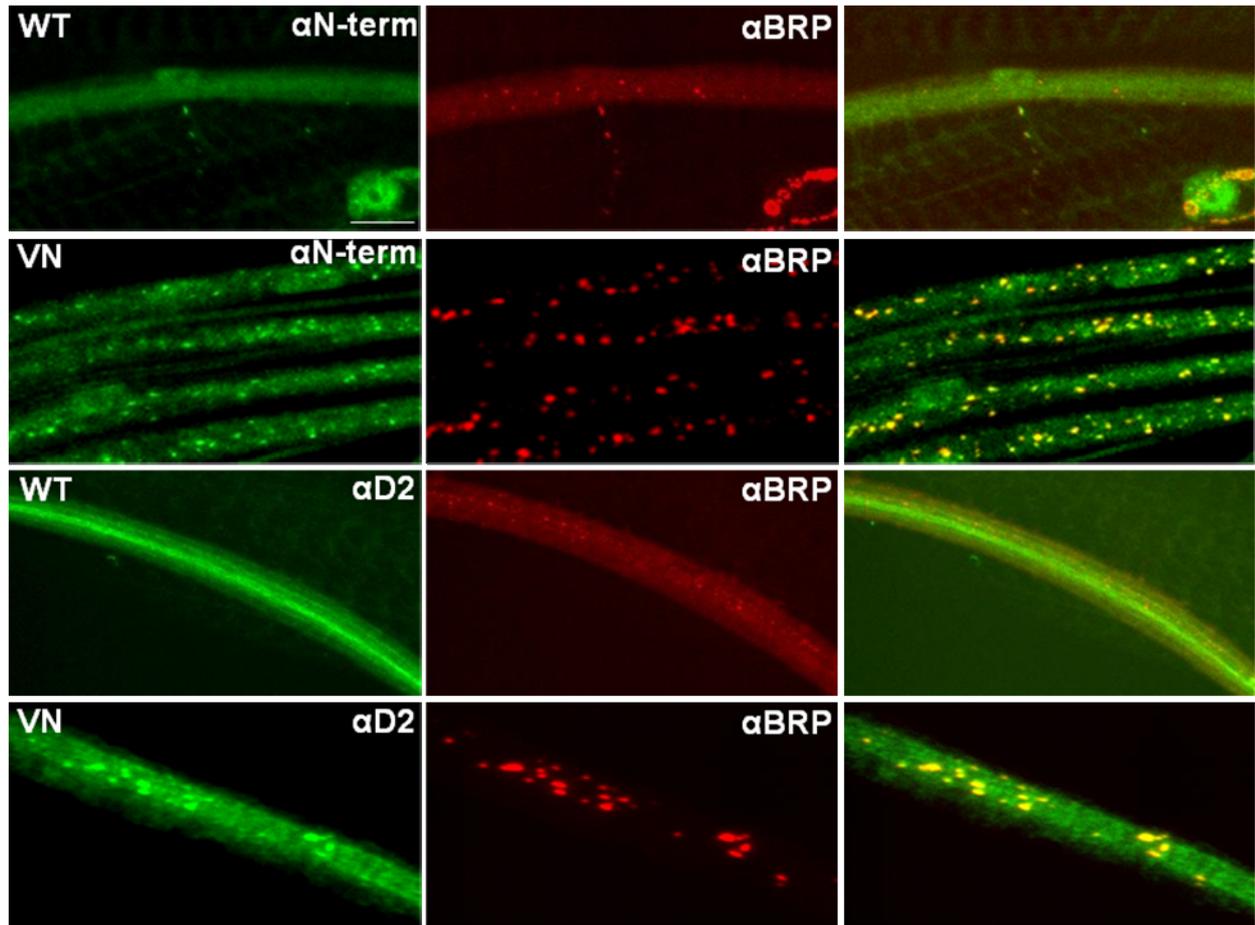


Abbildung 3.34. **Die neuen Bruchpilot-Antiseren erkennen die Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante:** Immunfluoreszenzfärbungen von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten mit dem Antikörper gegen den C-Terminus von Bruchpilot (nc82) und dem N-Term Antiserum bzw. den D2-Antiseren. Der Wildtyp zeigt eine gleichförmige Verteilung des Bruchpilot-Proteins in den larvalen Nerven. Beide Antiseren erkennen die Bruchpilot-Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante. Größenskalierung: 10µm

3.8.3 Experimente mit den neuen Bruchpilot-Überexpressionslinien

Die Überexpression von Bruchpilot führt zu einer Aggregation des Proteins im larvalen und adulten Nervensystem (Nieratschker, 2008). Im Labor von S. Sigrist wurden zwei neue Überexpressionslinien hergestellt *UAS-brp-D1-3 GFP* und *UAS-brp-D2-4 GFP* (siehe Abbildung

3.34, Fouquet et al., 2009). Die Überexpression der D1-3-cDNA (Aminosäuren 1 – 1226) führt zu einem verkürzten Bruchpilot-Protein ohne C-Terminus. Wohingegen die Expression des D2-4-Konstrukts (Aminosäuren 268 – 1740) zu einem verkürzten Bruchpilot-Protein, ohne N-Terminus führt. Diese zwei Fliegenlinien wurden mit dem panneuralen Treiber *elva-GAL4* gekreuzt und larvale Nerv-Muskel-Präparate der F1-Generation wurden gefärbt. Die zuvor publizierte Überexpressionslinie (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006) enthält die vollständige cDNA (Domäne 1-4, siehe Abbildung 3.35). Es sollte untersucht werden, ob alle Überexpressionskonstrukte von Bruchpilot zur Bildung von Bruchpilot-Aggregaten im larvalen und adulten Nervensystem führen.



Abbildung 3.35. Schematische Darstellung der cDNA von Bruchpilot, sowie ihre Einteilung in vier Domänen: Die Überexpressionslinie D1-3 besitzt keinen C-Terminus, wohingegen die Überexpressionslinie D2-4 keinen N-Terminus aufweist (modifiziert nach Fouquet et al., 2009).

Wie man in Abbildung 3.36 sehen kann, zeigt die Überexpression von D2-4 eine auffällige Akkumulation der D2-4-Proteine im larvalen und adulten Nervensystem. Sowohl im Gehirn, als auch in Motoneuronaxonen kolokalisiert das nc82-Signal mit dem GFP-Signal von D2-4, so dass offenbar keine Agglomerate entstehen, die nur das endogene Bruchpilot enthalten. Die Wildtyp-Färbung mit nc82 diente als Kontrolle und zeigt die gleichmäßige Verteilung des Bruchpilot-Proteins im Neuropil der Fliege.

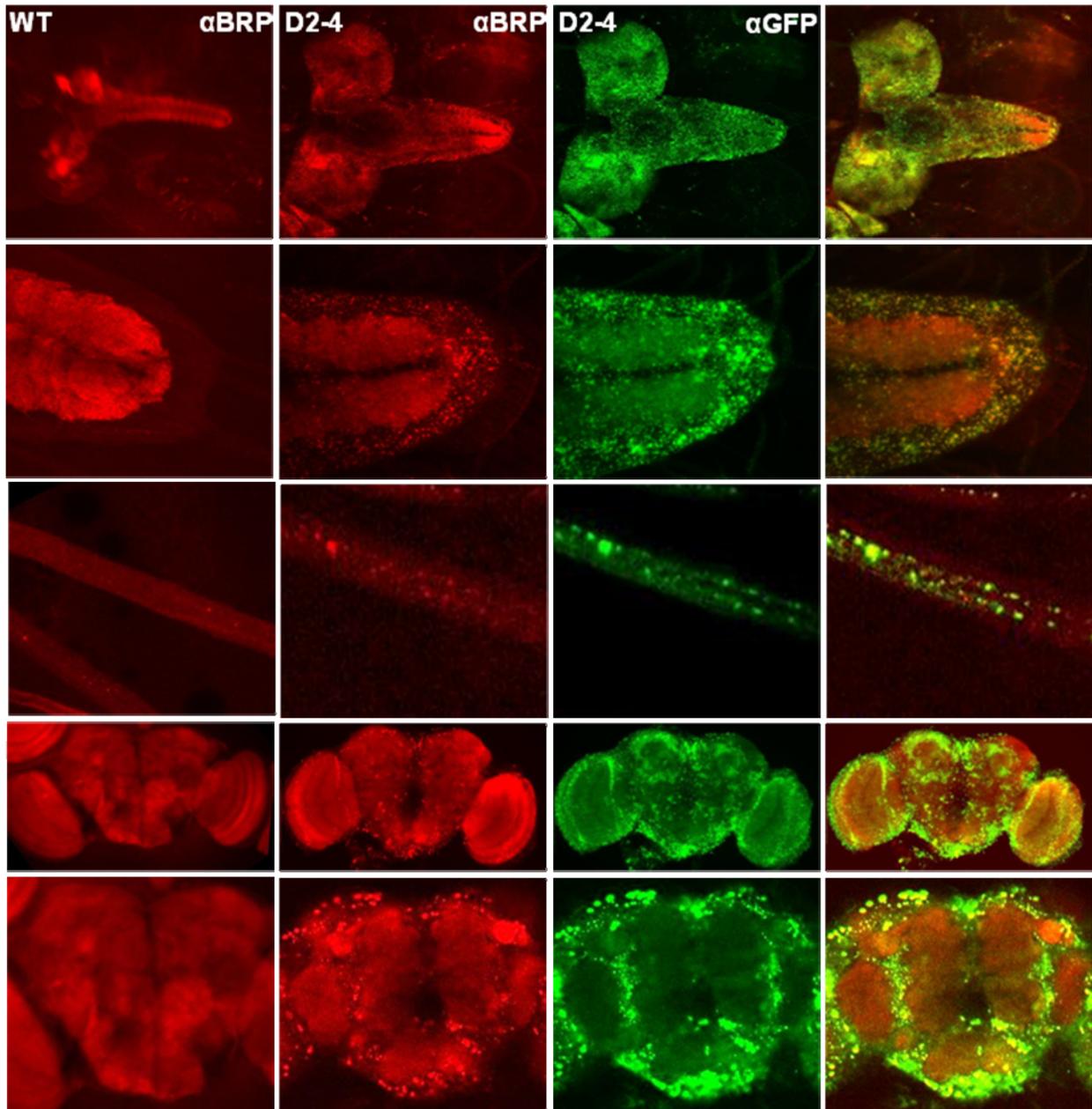


Abbildung 3.36. **Agglomeratbildung bei Überexpression des Bruchpilot-D2-4-Fragments:** Immunfluoreszenzfärbungen gegen Bruchpilot (nc82) und GFP von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten und adulten Fliegengehirnen. Der Wildtyp diente als Kontrolle und zeigt die charakteristische Verteilung des Bruchpilot-Proteins im Neuropil. Die Überexpression von D2-4 führt zur Ausbildung von Bruchpilot-Agglomeraten im larvalen und adulten Nervensystem. Alle Agglomerate enthalten GFP, also D2-4. Ob die Agglomerate auch endogenes Bruchpilot enthalten, kann nicht angegeben werden, da nc82 an beide Proteine bindet.

Das verkürzte D1-3-Bruchpilot-Konstrukt wird nicht von nc82 erkannt. Die Überexpression von D1-3 führt zu einer Aggregation des verkürzten Bruchpilot-Proteins im larvalen und adulten Nervensystem (Abbildung 3.37). Das endogene Bruchpilot ist wie im Wildtyp diffus im Neuropil verteilt.

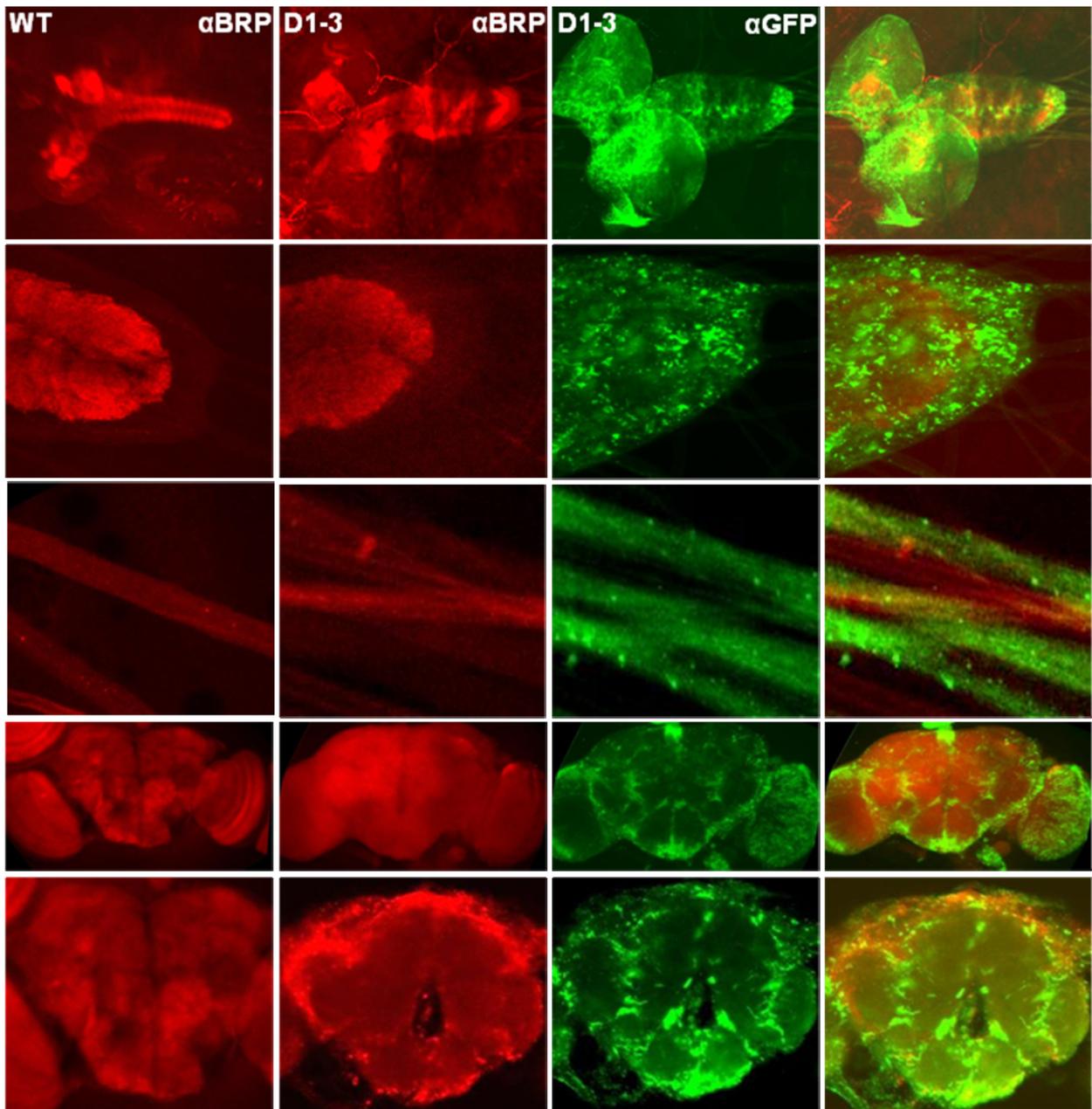


Abbildung 3.37. **Agglomeratbildung bei Überexpression des Bruchpilot-D1-3-Fragments:** Immunfluoreszenzfärbungen gegen Bruchpilot (nc82) und GFP von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten und adulten Fliegengehirnen. Der Wildtyp diente als Kontrolle und zeigt die charakteristische Verteilung des Bruchpilot-Proteins im Neuropil der Fliege. Bruchpilot D1-3 wird im larvalen und adulten Nervensystem akkumuliert, jedoch nicht das endogene Bruchpilot-Protein.

3.8.4 Simultane Überexpression der SRPK79D-Isoformen und von Bruchpilot

Da die Überexpression von Bruchpilot zur Akkumulation des Proteins im larvalen und adulten Nervensystem führt, sollte überprüft werden, ob die zeitgleiche Überexpression der Kinase den Phänotyp der Bruchpilot-Überexpression beeinflussen kann. Die Überexpression der SRPK79D-

Ergebnisse

Isoformen führt weder zu einer Akkumulation des Bruchpilot-Proteins noch der SRPK79D im larvalen und adulten Nervensystem (vgl. Bloch 2007; Nieratschker 2008). Es wurde sowohl die $w^{-1};UAS-Srpk79D-RB\ eGFP;+$, als auch die $w^{-1};UAS-Srpk79D-RC\ eGFP;+$ Fliegenlinie in den $w^{-1};+;UAS-BRP\ eGFP$ -Hintergrund gekreuzt. Die Expression erfolgte durch die panneurale Treiberlinie *elav-GAL4*. Es wurden larvale Nerv-Muskel-Präparate gegen Bruchpilot (nc82) gefärbt. Wie man anhand der Abbildungen 3.38 A und B erkennen kann, bleibt der Agglomerat-Phänotyp, der durch die Bruchpilot-Überexpression hervorgerufen wird, trotz der Überexpression der SRPK79D-Isoformen bestehen.

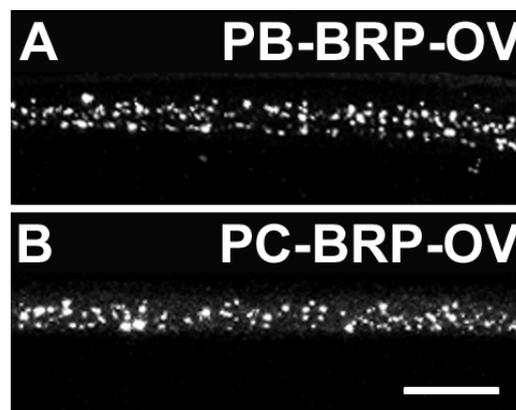


Abbildung 3.38. **Die Überexpression der SRPK79D-Isoformen rettet nicht den Bruchpilot-Überexpressions-Phänotyp:** Immunfluoreszenzfärbung gegen Bruchpilot (nc82) larvaler Nerv-Muskel-Präparate. Die zeitgleiche Überexpression der SRPK79D-Isoformen kann den Phänotyp der durch die Bruchpilot-Überexpression hervorgerufen wird, nicht beeinflussen (Genotyp $w^{-1}; UAS-Srpk79D-RB/RC\ eGFP;UAS-BRP\ eGFP$). Größenskalisierung: 10µm

3.8.5 Stimulated emission depletion-Mikroskopie

Das STED (stimulated emission depletion)-Mikroskop ermöglicht eine bessere räumliche Auflösung von Signalen in Fluoreszenzpräparaten. Bei diesem speziellen Konfokalmikroskop ist die Auflösung nicht beugungsbegrenzt. Wie man in Abbildung 3.39 erkennen kann, sind die Agglomerate in den Nerven der *Srpk79D*-Mutante ähnlich geformt wie die T-bars der Aktiven Zone mit der typischen Donut-Form (Kittel et al, 2006). Die meisten größeren Agglomerate erscheinen nadelförmig, vermutlich als Aneinanderreihung von fusionierten T-bars. Dies deckt sich mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von M. Jauch und S. Dippacher (Nieratschker et al., 2009; Dippacher, in Vorbereitung; Jauch, in Vorbereitung;).

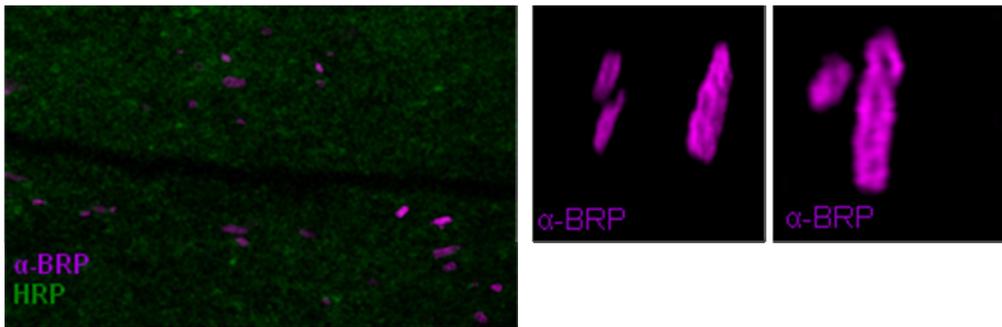


Abbildung 3.39. **Aufnahmen von Bruchpilot-Agglomeraten in Axonen der *Srpk79D*-Nullmutante:** STED-Aufnahme eines L3-Nervs einer *Srpk79D*-Nullmutante. Gefärbt wurde gegen Bruchpilot (nc82; rot) und gegen eine Natrium-Kalium-Pumpe (HRP; grün). In der Vergrößerung erscheinen die Agglomerate als nadelförmige Donut-geformte Strukturen im Nerv der *Srpk79D*-Nullmutante. Diese Strukturen haben große Ähnlichkeit mit dem Bruchpilot-Muster der Aktiven Zone (Kittel et al., 2006).

3.9 *In vivo* Imaging

Das *in vivo* Imaging ist eine neue Methode, die es ermöglicht fluoreszenzmarkierte Proteine in lebenden intakten Larven zu verfolgen. Dadurch können beispielsweise der zeitliche Ablauf des Aufbaus einzelner Synapsen, sowie Veränderungen in der Menge oder Verteilung eines einzelnen Proteins verfolgt werden (Andlauer et al., 2010). Um die Frage zu klären, ob Agglomerate, die durch den Ausfall des *Srpk79D*-Gens im larvalen Nerv gebildet werden, im Axon immobil vorliegen oder die Fähigkeit haben sich zu bewegen wurde die von T. Andlauer erhaltene *w⁺;UAS-Brp-D3 Strawberry, GAL4 OK6/Cy0;+* Linie in den *Srpk79D^{VN}*-Hintergrund gekreuzt. OK6 diente in diesem Experiment als neuronaler Treiber. Junge Larven des dritten Larvenstadiums wurden wie in 2.17 beschrieben in die Imaging-Kammer vorbereitet und unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Um Muskelkontraktionen vorzubeugen, wurde die Larve mit Desfluran anästhesiert. Die Expression des Bruchpilot-D3-Strawberry-Fragments führt zu einem verkürzten Bruchpilot-Protein (Aminosäuren 473 bis 1226; Schmid et al., 2008; Fouquet et al., 2009; Andlauer et al., 2010), das mit dem Fluorophor Strawberry gekoppelt ist. Ein Vorteil des verkürzten D3-Fragments ist, dass es bei Überexpression mit OK6 nur unwesentlich aggregiert (Abbildung 3.41 A). Wie man an den fixierten Präparaten in Abbildung 3.40 sehen kann, führt die Mutation im *Srpk79D*-Gen zur Agglomeratbildung von Bruchpilot und zum Einbau des verkürzten Bruchpilot-D3-Fragments in die Agglomerate.

Ergebnisse

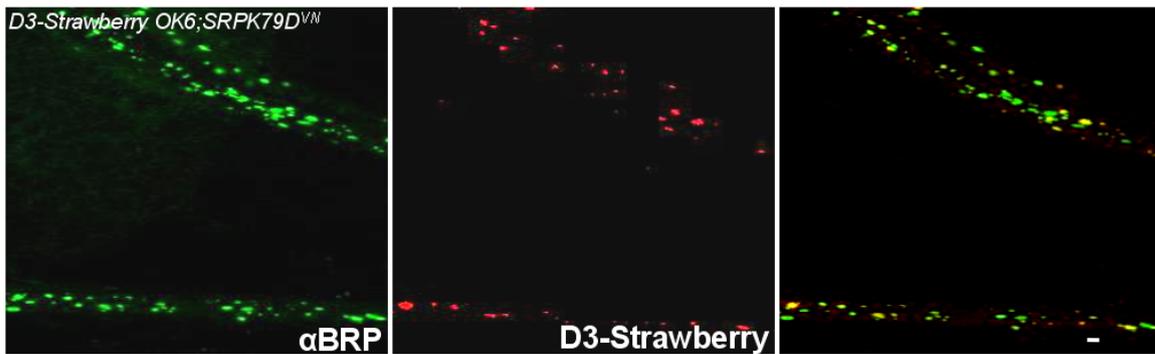


Abbildung 3.40. **Einbau des D3-Strawberry-Proteins in die Bruchpilot-Agglomerate der *Srpk79D*-Nullmutante:** Fluoreszenzaufnahme von fixierten Nerven einer *Drosophila*-Larve des dritten Larvenstadiums mit dem Genotyp: $w^1; UAS-Brp-D3\ Strawberry, GAL4\ OK6/Cy0; Srpk79D^{VN}$, gefärbt wurde gegen Bruchpilot (grün, nc82). D3-Strawberry fluoresziert im roten Bereich. Aufgrund der Kolokalisation beider Signale kann man schließen, dass der Einbau des verkürzten Bruchpilot-D3-Fragments in die Agglomerate erfolgt. Größenskalierung: 1 µm

In Abbildung 3.41 A wird eine Fluoreszenzaufnahme eines Nervs der Ausgangslinie $+; UAS-Brp-D3\ Strawberry\ OK6\ /Cy0; +$ gezeigt (T. Andlauer). In Abbildung 3.41 B wird eine larvale axonale Endigung der Linie $w^1; UAS-Brp-D3\ Strawberry, GAL4\ OK6/Cy0; Srpk79D^{VN}$ dargestellt, die eine deutliche Eigenfluoreszenz aufweist, die aufgrund der Lokalisation von D3-Strawberry an der Aktiven Zone hervorgerufen wird. Dabei ist das endogene Bruchpilot für die Lokalisation des verkürzten D3-Strawberry-Fragments essentiell (Fouquet et al., 2009; Andlauer et al., 2010). Infolgedessen wird das verkürzte D3-Strawberry-Fragment im Komplex mit dem intakten Bruchpilot in die synaptische Endigung transportiert.

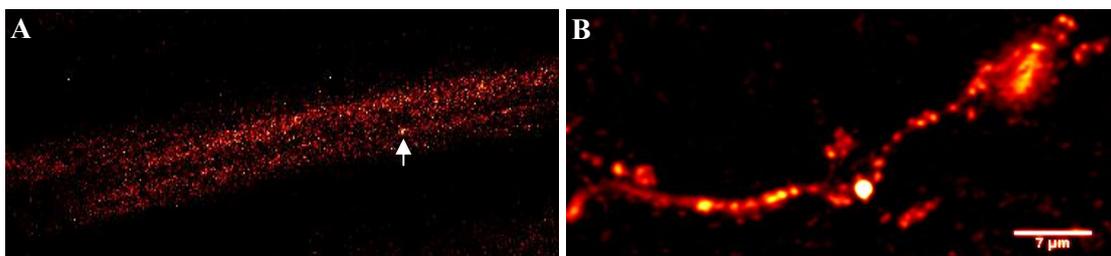


Abbildung 3.41. A: **Verteilungsmuster von D3-Strawberry:** *in vivo* Aufnahme des Nervs einer Larve mit dem Genotyp $w^1; UAS-Brp-D3\ Strawberry\ GAL4\ OK6\ /Cy0; +$ die als parentale Ausgangslinie diente (T. Andlauer). Hier liegt das D3-Strawberry diffus in den Axonen vor, aufgrund der Überexpression sind kleinere Aggregate erkennbar (siehe Pfeil). B: **Lokalisation von BRP-D3-Strawberry in Motorneuron-Endigungen:** Eigenfluoreszenz von Bruchpilot-D3-Strawberry in einer jungen Larve mit dem Genotyp: $w^1; UAS-Brp-D3\ Strawberry, GAL4\ OK6/Cy0; Srpk79D^{VN}$ im Fluoreszenzmikroskop.

Wie in Abbildung 3.42 gezeigt, konnte mit Hilfe der *in vivo* Imaging-Methode demonstriert werden, dass größere Agglomerate immobil im Axon ruhen, wohingegen kleinere Agglomerate weiterhin die Fähigkeit zur Bewegung besitzen (siehe Pfeile in Abbildung 3.42). Dabei erfolgt die Bewegung der kleinen Agglomerate anterograd und retrograd.

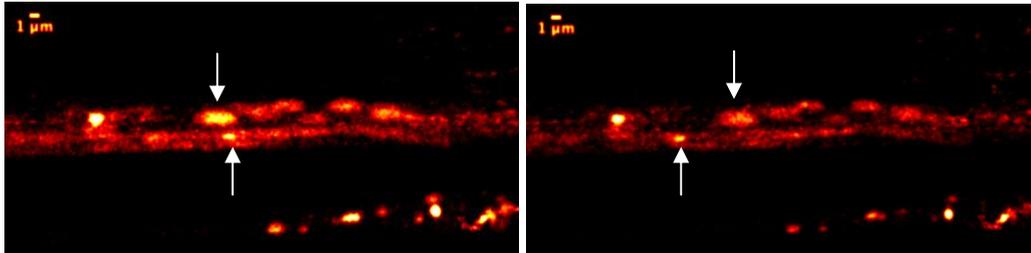


Abbildung 3.42. **Kleinere Bruchpilot-Agglomerate bewegen sich anterograd und retrograd im Nerv der *w¹¹¹⁸;UAS-Brp-D3-Strawberry GAL4 OK6;SRPK79D^{VN}* Larve:** Abfolge von zwei Aufnahmen am *in vivo* Imaging Fluoreszenzmikroskop. Größere Bruchpilot-Agglomerate verbleiben statisch im Axon. Kleinere Agglomerate sind mobil (siehe Pfeile) und können sich entlang des Nerven bewegen. Durch das Auftreten von Photobleaching verliert das Fluorophor mit der Zeit an Leuchtintensität.

3.10 Identifizierung von Interaktionspartnern für SRPK79D

Die Identifizierung von Substraten bzw. Interaktionspartnern von SRPK79D erfolgte durch die CytoTrap-Methode (Stratagene). Da diese Methode Interaktionen im Zytoplasma detektiert und sensitiver als der konventionelle Yeast-two-hybrid-Screen ist, können damit auch transiente Interaktionen untersucht werden. Außerdem die meisten SR-Proteinkinasen lokalisieren im Zytoplasma (Wang et al., 1996; Kuroyanagi et al., 1998; Papoutsopoutou et al., 1999; Ding et al., 2006; Mathew et al., 2008). Die Klonierung der SRPK79D-Isoformen erfolgte wie in 2.15 beschrieben. Dadurch entstand ein Fusionsprotein zwischen dem humanen SOS-Protein und der jeweiligen Kinase-Isoform. Im pMyr-Vektor lag die cDNA-Bibliothek von *Drosophila* vor (Stratagene). Anhand von Kontrolleexperimenten konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Konstrukte nicht allein zur Autoaktivierung in der Lage sind und den Gendefekt nicht komplementieren können. Nach einer Kotransformation von *cdc25* Hefen mit dem jeweiligen pSos-Vektor und der cDNA-Bibliothek erfolgte die Selektion wie in 2.15 beschrieben.

Der für die SRPK79D-PB-Isoform durchgeführte CytoTrap-Screen ergab vier positive Interaktionspartner.

1. CG5834. Bei CG5834 handelt es sich um das Hitzeschockprotein Hsp70Bbb. Wie in Flybase (www.flybase.org) zusammengefasst, ist es zur ATP-Bindung fähig, bei der Reaktion auf Hypoxia beteiligt und löst durch Hitzeschock das Puffing von polytären Chromosomen aus.
2. CG34083. Bei dem Gen CG34083 handelt es sich um das mitochondriale Protein mt:ND5, eine NADH-Dehydrogenase, welche an der an den Elektronentransport gekoppelten ATP-Synthese beteiligt ist (www.flybase.org).
3. CR34094. Bei CR34094 handelt es sich um das large ribosomal RNA Gen in Mitochondrien. Es ist Bestandteil des Ribosoms und wird für die Ausbildung der Polzellen benötigt (www.flybase.org).
4. CG11266. Laut Vorhersage von Flybase (www.flybase.org) kodiert das Gen CG11266 für Caper/1.3CC, welches an der Regulation des nukleären prä-mRNA-Spleißens, mittels Speißosom, beteiligt ist und die Fähigkeit zur prä-mRNA-Bindung besitzt.

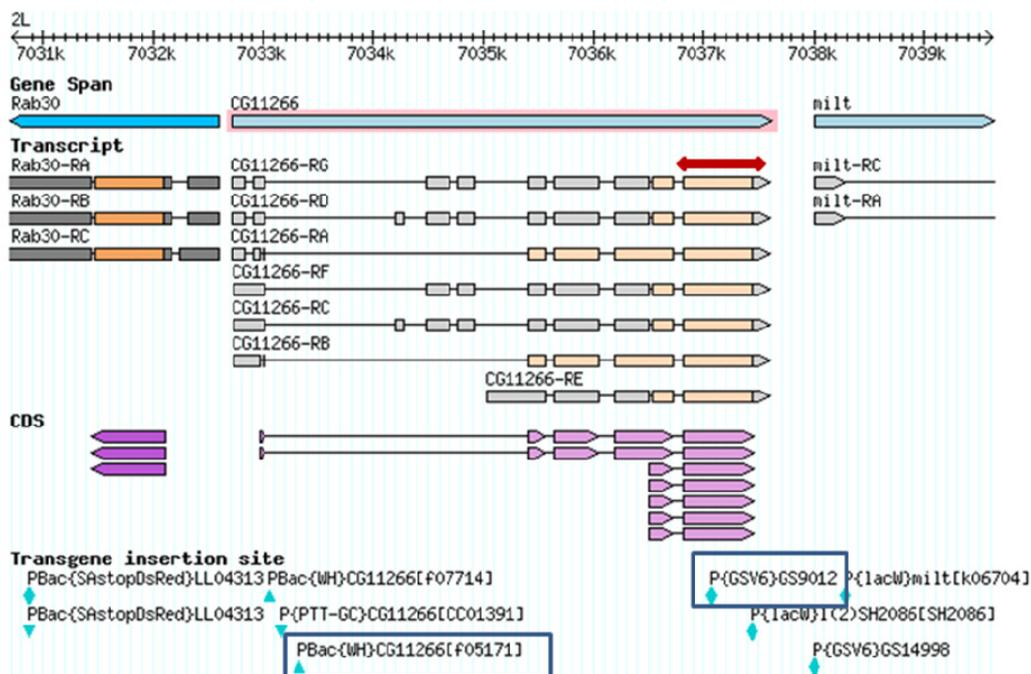


Abbildung 3.43. **Schematische Darstellung des CG11266 Genlocus:** Dieses Gen kodiert für eine große Isoform PA/PB und eine kleine Isoform PC-PF. Die bestellten P-Elementinsertionslinien sind markiert. In rot ist das Sequenzierergebnis des pMyr-Vektors resultierend aus dem CytoTrap-Screen eingezeigt. Im pMyr-Vektor liegt nur das letzte Exon von Caper vor, welches alle Isoformen gemeinsam haben (www.flybase.org).

Bei dem Gen CG11266 handelt es sich um das noch uncharakterisierte Protein Caper/1.3CC, das wahrscheinlich am Spleißen beteiligt ist (Park et al., 2004; Katzenberger et al., 2009). Da SR-Proteinkinasen SR-Proteine phosphorylieren und so die Regulation des alternativen und konstitutiven Spleißens beeinflussen (Roth et al., 1991; Manley et al., 1996; Cáceres et al., 1998; Graveley, 2000) konzentrierte sich die weitere Arbeit auf dieses Gen. Caper/1.3 CC erzeugt sieben Transkripte die für zwei Polypeptide kodieren, eine große Isoform PA/PB, und eine kleine PC/PD/PE/PF (Abbildung 3.43). Die Sequenzierung des pMyr-Klons ergab, dass sich nur das letzte Exon komplett im pMyr-Vektor befindet.

Der für die SRPK79D-PC-Isoform durchgeführte CytoTrap-Versuch ergab keine potentiellen Interaktionspartner. Alle getesteten Kolonien erwiesen sich als Temperaturrevertanten.

3.11 Charakterisierung von RNAi-Linien gerichtet gegen SR-Proteine von *Drosophila*

SR-Proteine sind hochkonservierte Phosphoproteine, die für das konstitutive und alternative Spleißen notwendig sind. Dabei werden SR-Proteine durch ihre Phosphorylierung der RS-Domäne von SR-Proteinkinasen und Clk/Sty-Kinasen reguliert. An ihrem N-Terminus besitzen SR-Protein eine oder zwei RNA-Erkennungsmotive (RRM) und C-Terminal Serin/Arginin-reiche Sequenzen. In *Drosophila* sind acht verschiedene SR-Proteine bekannt: SC35, SF2 (ASF), RBP1, RBP1-like, B52 (SRp55), SRp54, 9G8/x16 und SF3 (Krainer et al., 1990; Roth et al., 1991; Manley et al., 1996; Cáceres et al., 1998; Graveley, 2000). Daher wurden von VDRC UAS-RNAi-Linien bestellt, mit Konstrukten gegen sieben SR-Proteine. Die RNAi-Methode dient der Herunterregulierung von Transkripten. Durch Bildung von doppelsträngiger RNA wird der Abbau der Ziel-mRNA induziert. Die RNAi-Linien gegen die SR-Proteine SF2, RBP1, RBP1-like und SRp54 Linien wurden mit *UAS-Dicer*;+;*elav-GAL4* gekreuzt und die Larven der F1-Generation wurden auf das Vorhandensein von Bruchpilot-Agglomeraten getestet. Die als Transgen exprimierte Endoribonuclease Dicer produziert durch enzymatischen Abbau zusätzliche siRNAs und verstärkt dadurch den RNAi-Effekt. Die RNAi-Linie, deren Konstrukt gegen das SR-Protein ASF/SF2 (alternative splicing factor/splicing factor 2) gerichtet war, zeigte Bruchpilot-Agglomerate in den larvalen Nerven (Abbildung 3.44). Im Vergleich zur *Srpk79D*-Nullmutante sind diese Agglomerate jedoch kleiner. Färbungen gegen das Cysteine string protein konnte die Entstehung der Agglomeration aufgrund von axonalen Transportdefekten weitgehend ausschließen (Daten nicht

gezeigt). Anhand dieser Ergebnisse könnte das SR-Protein dSF2 ein potentieller Interaktionspartner der SRPK79D darstellen. SF2 ist am nukleären prä-mRNA-Spleißen beteiligt, wobei es die Auswahl der 5'-Spleißstelle bestimmt (Wu und Maniatis, 1993; Fu, 1995; Allemand et al., 2001). SF2 ist nicht nur am RNA-Metabolismus involviert, auch für die Entwicklung und Apoptose ist es bedeutsam (Ge and Manley, 1990; Gabut et al., 2007). Der Ausfall des Gens führt zur Letalität im Larvenstadium. Die RNAi-Linien gegen RBP1, RBP1-like und SRp54 zeigten eine wildtypische Bruchpilot-Verteilung in den larvalen Nerven (Daten nicht gezeigt). Auch die von M. Jauch getesteten RNAi-Linien gegen SC35, B52 und x16/ 9G8 zeigten keine Auffälligkeiten (Jauch, in Vorbereitung).

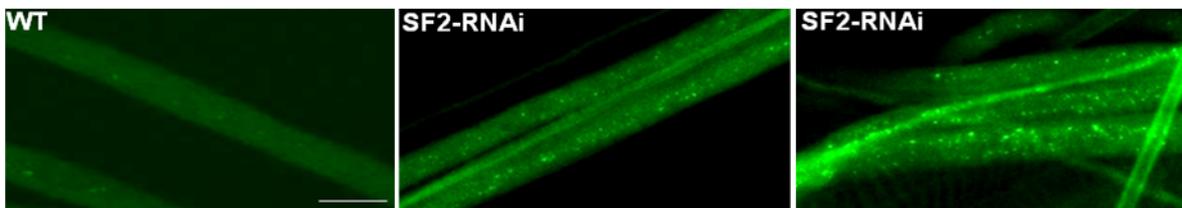


Abbildung 3.44. **Die Herunterregulierung von SF2 durch RNAi bewirkt Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Motoneuronaxonen:** Immunfluoreszenzfärbungen gegen Bruchpilot (nc82) von w^{1118} - und SF2-RNAi-Linie. Getrieben wurde das Konstrukt *UAS-RNAi-SF2* mit *UAS-Dicer*;+;*elav-GAL4*. Der Wildtyp zeigt eine diffuse Verteilung des Bruchpilot-Proteins in den larvalen Nerven. Die RNAi-vermittelte Reduktion von SF2 verursacht kleinere Bruchpilot-Agglomerate in den larvalen Nerven. Größenskalierung: 10µm

Ein spezifischer Antikörper gegen SF2 (freundlicherweise von J. Tazi zur Verfügung gestellt; Gabut et al. 2007) wurde an larvalen Nerv-Muskel-Präparaten getestet. Wie man in Abbildung 3.45 sieht, ist das SF2-Protein kein Bestandteil der Bruchpilot-Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante. Dagegen sind die Zellkerne von Glia der Nerven und von Muskelzellen, sowie die Umgebung der synaptischen Boutons gefärbt, was dem subsynaptischen Retikulum der Postsynapse entsprechen könnte (Abbildung 3.45 B und 3.46 A). Durch die Färbungen gegen den postsynaptischen Marker Disc large (Ataman et al., 2006) konnte die Lokalisation von SF2 im subsynaptischen Retikulum der Postsynapse bestätigt werden (Abbildung 3.48).

Ergebnisse

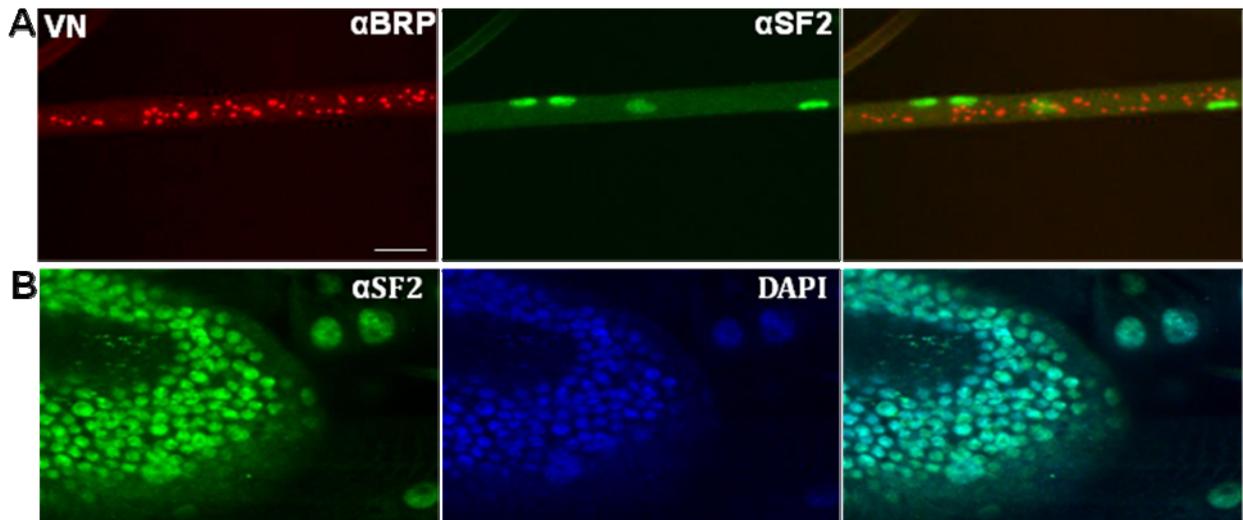


Abbildung 3.45 A und B. **A: Das SF2-Protein ist kein Bestandteil der Bruchpilot-Agglomerate von *Srpk79D*-Nullmutanten:** Immunfluoreszenzfärbungen von *Srpk79D^{VN}*-Larven gegen das SR-Protein SF2 und Bruchpilot (nc82). SF2 zeigt keine Agglomeration in larvalen Nerven. **B: Das SF2-Protein liegt in den Zellkernen von Glia des Nervs und Muskelzellen vor.** Zellkerne des Ventralganglions und Muskeln werden durch DAPI angefärbt. DAPI und das SF2-Protein kolokalisieren vollständig in den Zellkernen. Größenskalierung: 10µm

Die *UAS-Sf2-eGFP*-Überexpressionslinie (Allemand et al., 2001; Gabut et al, 2007) wurde mit *elav-GAL4* getrieben und immunhistochemisch untersucht. Die Überexpression von SF2 führt zur Akkumulation des SF2-Proteins im larvalen Nervensystem, und einer schwachen Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven (Abbildung 3.45 B). Auch im adulten Gehirn der SF2-Überexpressionslinie zeigt sich ein charakteristisches Muster der Dendriten. Immunhistochemische Färbungen gegen zwei weitere SR-Proteine RBP1 und B52 zeigten, dass beide SR-Proteine nicht an der Postsynapse vorliegen (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

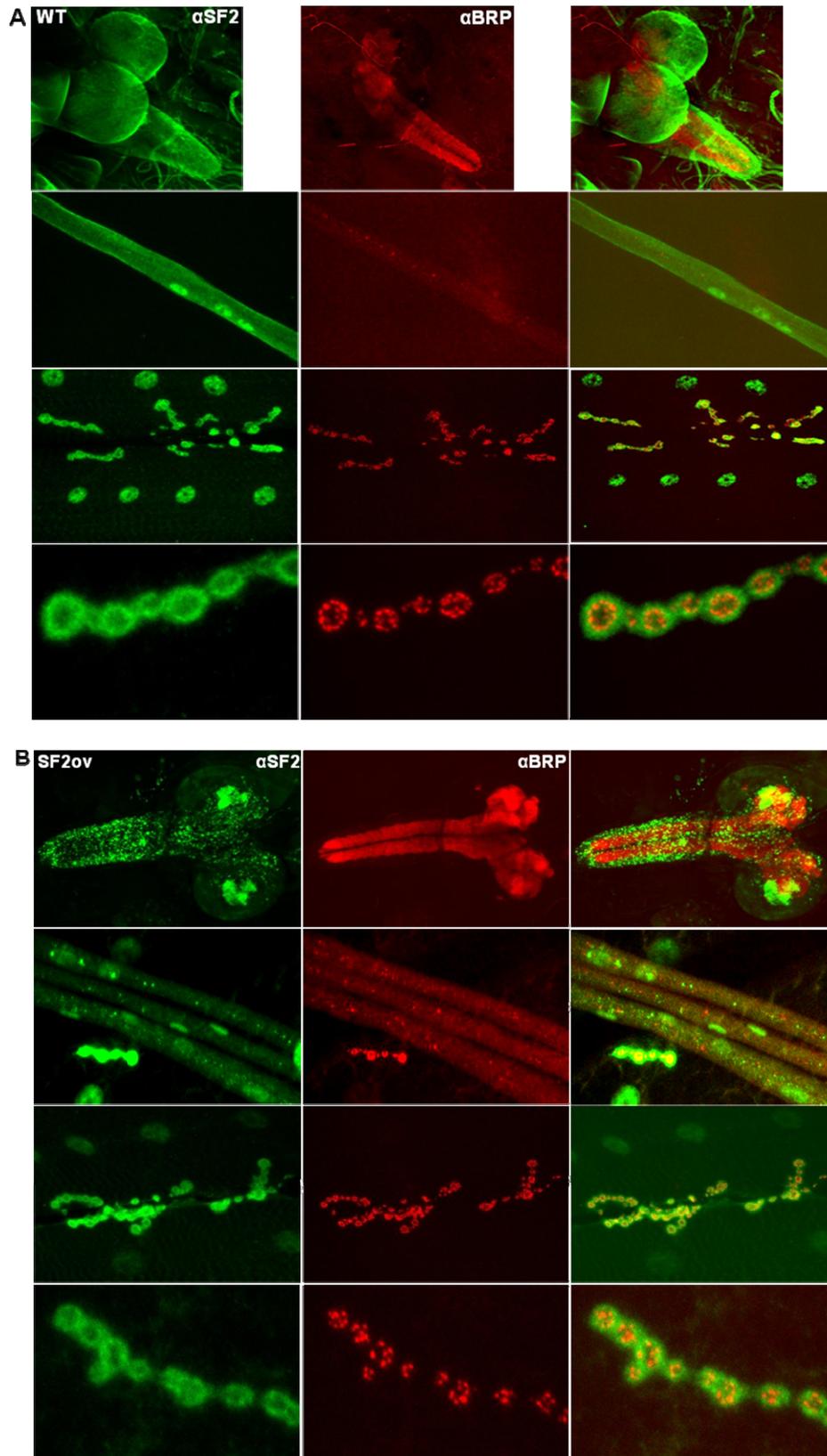


Abbildung 3.46. **Expressionsmuster des endogenen (A) und überexprimierten (B) SF2-Proteins:** Fluoreszenzaufnahmen von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten, gefärbt mit α SF2 und α Bruchpilot (nc82). Die Überexpression von SF2 führt zur Akkumulation des SF2-Proteins im larvalen Gehirn und larvalen Nerven. SF2 ist in den Zellkernen von Muskel- und Gliazellen vorhanden. SF2 besitzt eine charakteristische Färbung des subsynaptischen Retikulums der Postsynapse.

Ergebnisse

Die Überexpression führt auch im adulten Gehirn zu einer Agglomeration des SF2-Proteins (Abbildung 3.47). Dabei zeigt Bruchpilot, wie im Wildtyp, eine Färbung des Neuropils, ohne selbst zu aggregieren. Weiterhin zeigt die panneural überexprimierte SF2-Linie eine Färbung der Calyces des Pilzkörpers.

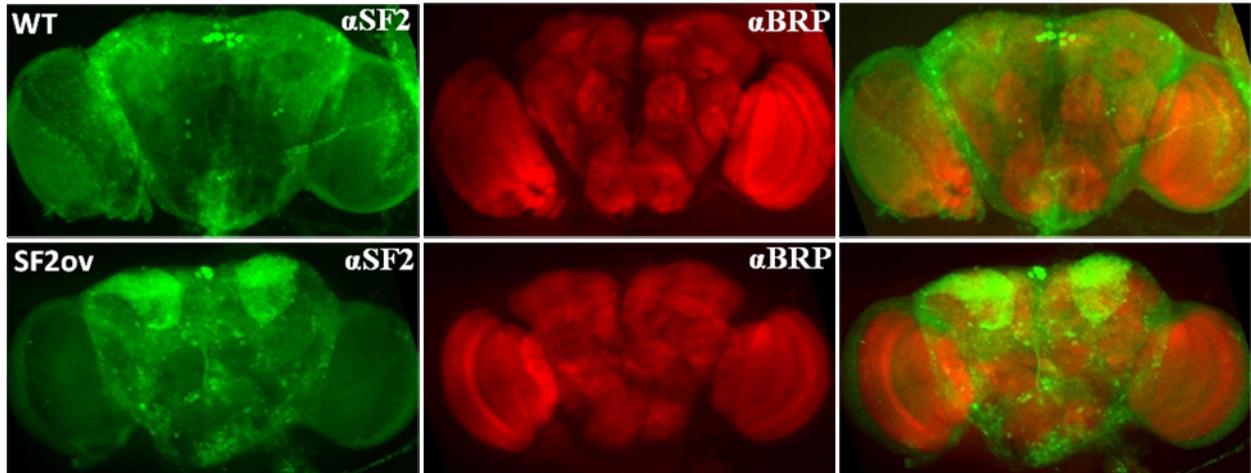


Abbildung 3.47: **Färbemuster des endogenen und panneural überexprimierten SF2-Proteins im adulten Fliegenhirn:** Z-Projektionen von Wildtyp und der panneural überexprimierten SF2-Linie, gefärbt gegen SF2 und Bruchpilot (nc82). Der SF2-Antikörper erkennt im Wildtyp einige Zellen u.a. in der protocerebralen Brücke. SF2 akkumuliert auch im adulten Gehirn. Weiterhin sieht man ein starkes Färbemuster der Calyces des Pilzkörpers.

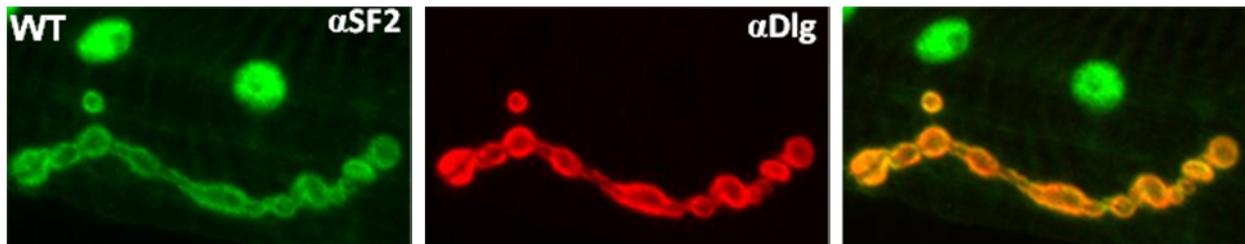


Abbildung 3.48: **SF2 und Disc large kolokalisieren vollständig an der Postsynapse:** Fluoreszenzfärbungen gegen den postsynaptischen Marker Disc large (Dlg) und SF2. Beide Proteine kolokalisieren vollständig am postsynaptischen Retikulum.

Da der vollständige Ausfall des SF2-Proteins zur Letalität von Fliegen führt (Allemand et al., 2001; Gabut et al., 2007) wurde die Spezifität des SF2-Antikörpers anhand der SF2-RNAi-Linie überprüft. Die Abbildung 3.49 zeigt die Reduktion des SF2-Proteins im larvalen Gehirn und im subsynaptischen Retikulum der Postsynapse.

Ergebnisse

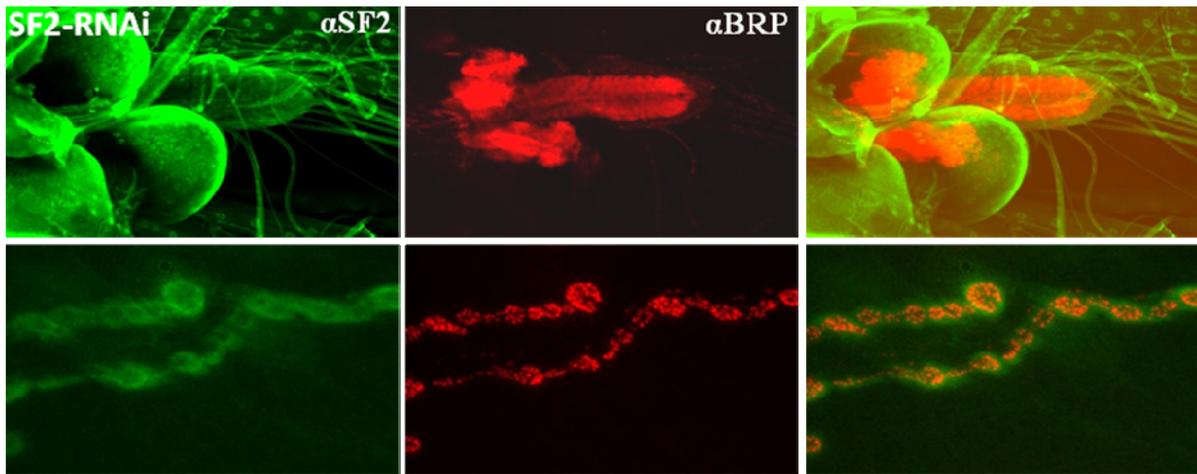


Abbildung 3.49: **RNAi-vermittelte Reduktion des SF2-Proteins führt zur schwächeren Färbung des subsynaptischen Retikulums der Postsynapse:** Fluoreszenzfärbungen gegen das SF2-Protein und Bruchpilot (nc82) von SF2-RNAi-Larven. Die RNAi-vermittelte Reduktion von SF2 führt zu einer Abschwächung der Färbung von Zellkernen und der Postsynapse.

Die Aggregation von Proteinen könnte aufgrund von Defekten des axonalen Transportes resultieren. Deswegen wurde der axonale Transport in der panneural überexprimierten SF2-Linie anhand von Färbungen gegen das Cysteine string protein (CSP) überprüft. Wie man in Abbildung 3.50 sehen kann, führt die Überexpression von SF2 zu auffälligen Agglomeraten von CSP, was auf einer Störung des axonalen Transportes beruhen könnte.

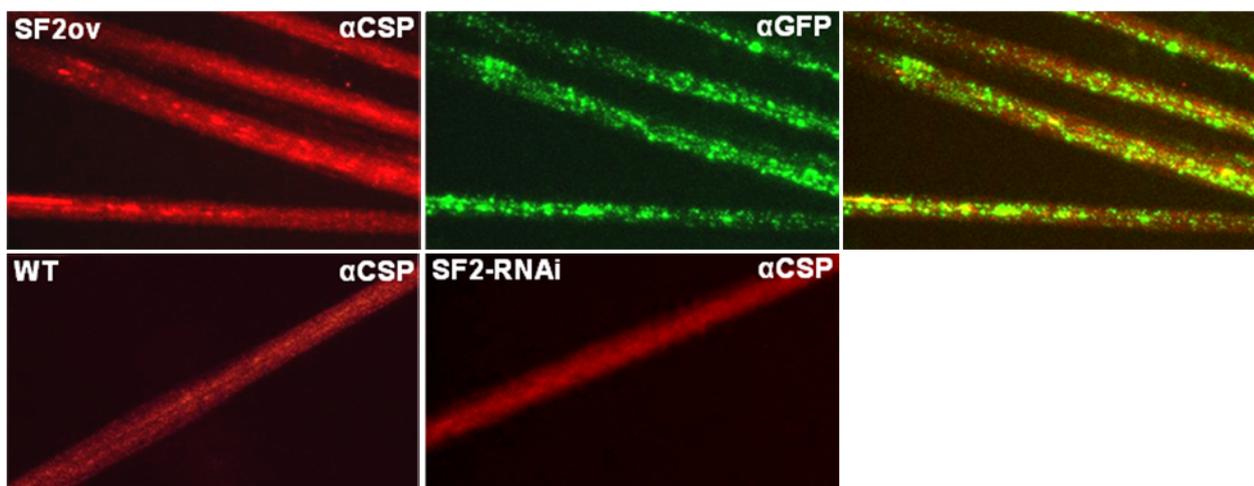


Abbildung 3.50 **Die panneurale Überexpression von SF2-GFP führt möglicherweise zu einem axonalen Transportdefekt:** Fluoreszenzfärbungen gegen CSP und GFP von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten. Im Wildtyp und der *UAS-SF2-RNAi*-Linie erfolgt eine einheitliche Färbung der larvalen Nerven. Die SF2-Überexpression führt zu einer Akkumulation von CSP, wie sie bei Störungen des axonalen Transportes beobachtet wird. Größenskalierung: 10 μ m

4. Diskussion

4.1 Immunhistochemische Charakterisierung von Antiseren gegen die SRPK79D

4.1.1 Präadsorption der polyklonalen Antiseren gegen die SRPK79D

In der Dissertation von V. Nieratschker wurde die Herstellung von Domänen-spezifischen Antiseren und von Peptidantiseren gegen die SRPK79D beschrieben (Nieratschker, 2008). Für die Gewinnung der Peptidantiseren wurden Peptide aus Exon eins verwendet, die spezifisch für die PC/PF-Isoformgruppe der SRPK79D waren, wohingegen die Immunisierung für die Herstellung der Domänen-spezifischen Antiseren mit den entsprechenden rekombinanten SRPK79D-Proteinfragmenten durchgeführt wurde. Dadurch sind die generierten Antiseren jeweils spezifisch gegen die PB/PE-Isoformen bzw. die PC/PF-Isoformen der SRPK79D gerichtet. Diese Sequenzen weisen keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen auf, so dass keine Kreuzreaktionen zu erwarten sind. Es zeigte sich jedoch, dass die Seren und die Peptidantiseren eine starke Hintergrundfärbung in Western Blot-Analysen, Kryostatschnitten und larvalen Nerv-Muskel-Präparaten produzierten. Ebenfalls war es mit ihnen nicht möglich einen Unterschied zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante zu detektieren (Bloch, 2007; Nieratschker, 2008). Durch das Vorhandensein der *Srpk79D*-Nullmutante konnten Homogenate aus adulten Fliegenköpfen hergestellt und für eine Präadsorption der Antiseren genutzt werden, wodurch die Hintergrundfärbung minimiert wurde. Die GFP-markierten Überexpressionsproteine wurden mit dem panneuralen Treiber *elav-GAL4* im nahezu gesamten Nervensystem der Fliege überexprimiert (Campos et al., 1985 und 1987; Robinow und White, 1988; Chalfie et al., 1994; Yeh et al., 1995) und dienten als Positivkontrolle. Die Antiseren waren in der Lage die überexprimierte SRPK79D zu detektieren (Abbildung 3.1; Bloch, 2007). Jedoch konnte für die endogenen Kinase weiterhin kein Signal verzeichnet werden und deutet darauf hin, dass die Expression der SRPK79D im Kopf der Fliege in sehr geringen Mengen erfolgt. Ausgehend von der Tatsache, dass Enzyme oft in niedrigen Konzentrationen wirksam sind, könnte dies das fehlende Signal der SRPK79D erklären.

In Immunpräzipitationen mit dem PC-Antiserum konnten die SRPK79D-PC/PF-Isoformen im anschließenden Western Blot nachgewiesen werden. Mittels einer Immunpräzipitation konnte die SRPK79D-PB/PE-Isoformen nicht zuverlässig angereichert und detektiert werden (Abbildung 3.2). Dies könnte darauf hin deuten, dass die SRPK79D-PB/PE-Isoformen in noch geringerer Konzentration als die SRPK79D-PC/PF-Isoformen exprimiert werden. Möglicherweise erfolgt auch

eine gewebe- bzw. entwicklungsspezifische Expression der SRPK79D-PB/PE-Isoformen. Die durchgeführten Immunpräzipitationen mit Larven und Puppen zur Isolierung der SRPK79D-Isoformen zeigten keine überzeugenden Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind die Bedingungen bei der Immunpräzipitation für das Scheitern der Proteinanreicherung verantwortlich, oder dass die Immunpräzipitationen am IgM-Antikörpern scheitert. Durch posttranslationale Prozesse in einem Organismus könnten Epitope verändert werden, sodass generierte Antikörper diese nicht mehr erkennen können. Jedoch kann diese Möglichkeit, zumindest für das PC-Antiserum, vornehmlich ausgeschlossen werden, da die endogene SRPK79D-PC/PF-Isoformen im Western Blot nach einer Immunpräzipitation zu detektieren waren (Abbildung 3.2). Auch die überexprimierten SRPK79D-Isoformen können von den generierten Antiseren detektiert werden. Somit scheinen die Antiseren per se zu funktionieren. Eine geringere Affinität des PB-Antiserums zum Protein kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Verteilung von Proteinen in bestimmten Zellkompartimenten könnte Aufschluss über die mögliche Funktion geben. In larvalen Nerv-Muskel-Präparaten konnte V. Nieratschker mit den unaufgereinigten Antiseren keine spezifischen Färbungsunterschiede zwischen *Srpk79D*-Mutante und der Überexpressionslinie an Aktiven Zonen detektieren. Die Präadsorption ermöglichte eine Minimierung der unspezifischen Färbung, sodass nun gezeigt werden konnte, dass die transgen überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform an der Aktiven Zone vorliegt und mit Bruchpilot kolokalisiert (Abbildung 3.3). Eine mögliche Interaktion zwischen SRPK79D und Bruchpilot wäre denkbar, auch wenn Co-Immunpräzipitationsexperimente keine direkte Interaktion zeigen konnten (Nieratschker, 2008). Weiterhin zeigte sich, dass ein Unterschied in der Lokalisation zwischen den SRPK79D-Isoformen existiert. Während die SRPK79D-PC-GFP-Isoform an die Aktive Zone transportiert wird, konnte die SRPK79D-PB-GFP-Isoform nicht an der Aktiven Zone detektiert werden (Abbildung 3.3). Somit muss der N-Terminus der PC/PF-Isoformen Zielsequenzen beinhalten, die den Transport an die Aktive Zone ermöglichen. Demnach ist der N-Terminus der SRPK79D entscheidend für die zelluläre Lokalisation, und nicht der Spacer. In einer parallelen Studie konnte gezeigt werden, dass Venus-markiertes SRPK79D^{ATC-PC} zusammen mit Bruchpilot in Aktiven Zonen und Nerven kolokalisieren (Johnson et al., 2009). Denkbar wäre, dass die SRPK79D-Isoformen verschiedene Aufgaben innerhalb der Zelle ausüben. So könnte eine SRPK79D-Isoformklasse für den Transport von Transportvesikeln notwendig sein, die andere Isoformklasse dagegen für das alternative Spleißen. Um dies im Detail untersuchen zu können, müssten neue spezifische Antikörper generiert werden, die das endogene Protein nachzuweisen können.

Wird das Expressionsmuster der ektopisch panneural überexprimierten SRPK79D-Isoformen betrachtet, zeigen diese eine diffuse Verteilung in larvalen Nerven (Bloch, 2007) und sind weiterhin im Zytoplasma neuronaler Zellkörper lokalisiert (vgl. Abbildung 3.4). Dabei stimmen diese Ergebnisse mit der Beobachtung überein, dass die meisten bekannten SR-Proteinkinasen im Zytoplasma lokalisieren (Wang et al., 1998; Ding et al., 2006). Auch bei dieser Färbung zeigten sich Isoform-spezifische Unterschiede. Die SRPK79D-PC-GFP-Isoform ist homogen im Zytoplasma verteilt, die SRPK79D-PB-GFP-Isoform wird hingegen lokal im Perikaryon des Ventralganglions akkumuliert (Abbildung 3.4). Diese Anhäufung könnte jedoch aus der Überexpression resultieren. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste das endogene Expressionsmuster bestimmt werden. Bei den beschriebenen Versuchen wurden die überexprimierten Proteine untersucht, dabei spiegelt das GAL4/UAS-System nicht die natürliche Verteilung der Proteine wieder.

Bei Färbungen adulter Gehirne mit Antiseren gegen die SRPK79D wurde im Wildtyp die endogene Kinase wie schon zuvor in Larven nicht detektiert. Die ektopisch panneural überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform ist im Zytoplasma der Zellkörper und im Neuropil lokalisiert (Abbildung 3.5), die SRPK79D-PB-GFP-Isoform hingegen in Zellkörpern (Abbildung 3.6), ähnlich zum larvalen Gehirn (Abbildung 3.4). Im adulten Gehirn der SRPK79D-Überexpressionslinien erkennt das PC-Antiserum den Fanshaped body, den Ringkomplex, Teile des Pilzkörpers und Zellen des Neuropils. In der SRPK79D-PB-GFP-Überexpressionslinie erkennt das PB-Antiserum neuronale Zellkörper und die Calyces des Pilzkörpers. Diese Unterschiede in der Lokalisation der SRPK79D-Isoformen könnten durch zellspezifische Transportmechanismen verursacht werden. Durch die Lokalisation beider Isoformen im Pilzkörper, könnte in zukünftigen Experimenten ein Lerndefekt untersucht werden. Der Pilzkörper des Fliegengehirns ist für das Lernen und die Ausbildung des Gedächtnisses essentiell (Dubnau et al., 1998; Heisenberg, 2003). Allerdings führt die Mutation im *Srpk79D*-Gen zu keiner Störung der klassischen Konditionierung im Zwei-Duft-Paradigma von Larven (Jauch, in Vorbereitung). Dies könnte darauf hindeuten, dass einfache Verhaltensmuster unbeeinflusst bleiben, während komplexe Lernvorgänge gestört sein könnten. Lerndefekte adulter Fliegen könnten durch die Durchführung von Tully-Experimenten aufgeklärt werden (Tully und Quinn, 1985).

4.1.2 Affinitätsaufreinigung der Antiseren gegen die SRPK79D

Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung der Antiseren gegen SRPK79D wurden diese mittels rekombinanter Proteine affinitätsgereinigt. Für diesen Versuch wurde das pET28a-

Expressionssystem verwendet, welches für eine Abfolge von Histidinen kodiert, über die die Fusionsproteine durch Nickel-Agarose (Ni-NTA-Agarose, QIAGEN) aufgereinigt werden können. Dabei zeigte sich, dass die transformierten *E. coli* Zellen mit dem pET28a-*SrpK79D-RB* Konstrukt ein schlechteres Wachstum und eine verminderte Produktion des Proteins zeigten, als mit dem *SrpK79D-RC*-Konstrukt (Abbildung 3.7). Dies könnte auf eine toxische Wirkung des Proteins hindeuten. Die Affinitätsaufreinigung konnte die Hintergrundfärbung im Western Blot sichtlich verringern (Abbildung 3.8), dennoch konnte die endogene Kinase nicht erfasst werden (vgl. auch Maicher, 2009). Ansonsten konnte gezeigt werden, dass die Peptidantiseren nicht fähig waren die SRPK79D zu detektieren (Abbildung 3.9), weshalb die Arbeit mit ihnen eingestellt wurde. Auch V. Nieratschker konnte mit den Peptidantiseren bei Western Blot-Analysen, adulten Gefrierschnitten und larvalen Nerv-Muskel-Präparaten keine spezifische Färbung erzielen (Nieratschker, 2008).

4.2 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

Die Mutation im *SrpK79D*-Gen führt in larvalen Nerven zu einer auffälligen Agglomeration des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot (Johnson et al., 2009; Nieratschker et al., 2009). Um zu überprüfen, ob auch adulte Fliegen eine Fehlverteilung von Bruchpilot im Nervensystem aufweisen, wurden Gefrierschnitte von *Drosophila*-Köpfen und Körpern hergestellt und gegen Bruchpilot (nc82) gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass auch in adulten Fliegen eine Agglomeration von Bruchpilot in Antennalnerven stattfindet (Abbildung 3.10). Eine Agglomeration des Bruchpilot-Proteins in anderen Bereichen wurde nicht näher untersucht. Die Überexpression von Bruchpilot führt zu einer Akkumulation des Proteins, sowohl im larvalen als auch adulten Nervensystem, insbesondere auch im zellulären Cortex, wohingegen die Mutation im *SrpK79D*-Locus offenbar vor allem längere Nerven betrifft. Neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder Chorea Huntington zeigen öfters Ablagerungen von Proteinen im Nervensystem, wobei die Agglomeration eine Art Schutzmechanismus gegen toxische Proteine darstellen könnte (Saudou et al., 1998; Muchowski et al., 2002; Fossgreen et al., 1998; Feany et al., 2000).

4.3 Immunhistochemische Färbung larvaler Nerv-Muskel-Präparate mit Antikörpern gegen verschiedene Synapsenproteine

Die Agglomeration von Bruchpilot im Nervensystem von *SrpK79D*-Mutanten könnte auf einen Defekt des generellen axonalen Transports zurückzuführen sein. Die Störung des axonalen Transports würde eine Aggregation weiterer synaptischer Proteine in den larvalen Nerven nach sich

ziehen. Diese Möglichkeit konnte anhand von Färbungen gegen das Cysteine string protein (CSP; Umbach et al., 1994; Zinsmaier et al., 1994; Eberle et al., 1998; Zinsmeier et al., 2002) und Synaptotagmin (Littleton et al., 1993) ausgeschlossen werden, da beide Proteine in der *Srpk79D*-Mutante wildtypisch verteilt vorliegen. Diese Vesikel-assoziierten Proteine dienen generell als Marker für axonale Transportdefekte (Hurd und Saxton, 1996; Grindhart et al., 1998; Martin et al., 1999; Zhang et al., 2002; Gindhart et al., 2003; Miller et al., 2005). Somit führt die Mutation der SRPK79D nicht zu einer generellen Beeinträchtigung des axonalen Transports, sondern scheint spezifischen Einfluss auf den Bruchpilot-Transport zu nehmen. In Vertebraten erfolgt der Transport von Proteinen der Zytomatrix wie Piccolo, Bassoon, Munc-13 u.a. in einer speziellen Klasse von elektronendichten Transportvesikeln, sog. PTVs (Sheetz, 1999; Ahmari et al., 2000; Zhai et al., 2001; Ziv und Garner, 2001; Shapira et al., 2003; Dresbach et al., 2006). Die mutierte SRPK79D könnte den Transport dieser bestimmten Vesikelklasse stören, wobei der generelle axonale Transport weiterhin intakt bleiben könnte. Allerdings sind Homologe zu den PTVs in Insekten bislang nicht nachgewiesen. Die Identifizierung des Transportmechanismus von Bruchpilot würde Aufschluss über die Beteiligung der SRPK79D verschaffen. Die Regulation dieser speziellen Vesikelklasse würde jedoch nicht allein durch die SRPK79D erfolgen, da genügend Bruchpilot an die Aktive Zone der *Srpk79D*-Mutante transportiert wird um die Transmission zu gewährleisten. In Standardexperimenten zur synaptischen Transmission am larvalen Nerv-Muskel-Präparat konnte keine Beeinträchtigung der Synapsenfunktion nachgewiesen werden (Bucher, 2008).

Um den Charakter der Agglomerate näher zu untersuchen, wurden verschiedene Antikörper an larvalen Nerv-Muskel-Präparaten getestet. In elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Bruchpilot T-bars in Synapsen mit klaren Vesikeln assoziiert vorliegen (Atwood, 2006; Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006; Wichmann et al., 2010). Auch die axonalen Bruchpilot-Agglomerate sind in elektronenmikroskopischen Präparaten häufig mit klaren Vesikeln assoziiert (Nieratschker et al., 2009; Jauch, in Vorbereitung). Der Verlust von Bassoon in Mäusen führte in synaptischen Endigungen von Photorezeptoren zu 'free floating ribbons' die mit Vesikeln umgeben waren (Dick et al., 2003). In Hippokampuszellen von Ratten konnten Aggregate mit klaren Vesikeln gefunden werden, die positiv für synaptische Vesikelmarker wie Synaptobrevin, SV2, Synaptotagmin und Synapsin waren (Tao-Cheng et al., 2007). Durch die vorliegenden Färbungen gegen CSP, Synaptotagmin, Synapsin, SV2, vGlut und Synaptobrevin (Abbildung 3.11) konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Vesikeln der *Srpk79D*-Mutante um reife synaptische Vesikel handelt (Broadie et al., 1995; Mahr und Aberle, 2006; Akbergova et al., 2009; Hofbauer et al., 2009). Diese klaren Vesikel könnten daher eine bestimmte Klasse von Transportvesikeln darstellen, die Bruchpilot enthalten und es entlang des Nervs zum

Bestimmungsort transportieren. Natürlich sind diese Vesikel zu klein um im konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgelöst zu werden. Auch immun-elektronenmikroskopische Studien mit nc82 konnten keinen Aufschluss darüber geben, ob Bruchpilot mit dem elektronendichten Material der Agglomerate oder mit den angelagerten klaren Vesikeln assoziiert ist (Jauch, in Vorbereitung). Die Färbungen mit den verschiedenen Vesikelmarkern schließen jedoch aus, dass die entsprechenden Vesikelproteine in den Agglomeraten in einem stöchiometrischen Verhältnis zu Bruchpilot vorkommen.

Die immunhistochemischen Färbungen gegen die potentiellen Interaktionspartner von Bruchpilot Liprin- α , Rab3, Syd-1 und SUK (Ataman et al., 2006; Fouquet et al., 2009; Graf et al., 2009; Oswald et al., 2010; Hamanaka et al., 2010) zeigten eine gleichförmige Verteilung der Proteine in larvalen Nerven der *Srpk79D*-Mutante (Abbildung 3.11). Die Proteine Liprin- α , Rab3 und Syd-1 sind für die Rekrutierung und Lokalisation von Bruchpilot essentiell, wobei ein zeitdifferenzierter Transport der Komponenten an die sich bildende Aktive Zone erfolgt (Fouquet et al., 2009; Graf et al., 2009; Oswald und Sigrist, 2009). Die genauen Mechanismen, die hier zugrunde liegen, sind noch nicht bekannt. Da jedoch Liprin- α und Syd-1 die sich entwickelnden Aktiven Zonen vor Bruchpilot erreichen (Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010), könnte dies die fehlende Färbung erklären. Die in diesem Teilprojekt durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass die Agglomeratbildung in der *Srpk79D*-Nullmutante bisher spezifisch für Bruchpilot erfolgt und dass die getesteten synaptischen Proteine eine zum Wildtyp vergleichbare Verteilung in der Aktiven Zone von *Srpk79D*-Mutanten zeigen. Somit bleibt die Frage ungeklärt, ob die Agglomerate in den *Srpk79D*-Mutanten nur aus Bruchpilot bestehen, oder ob ein makromolekularer Komplex ausgebildet wird. Weiterhin bleibt ungeklärt, in welchen Neuronen die Agglomeration stattfindet, da die larvalen Nervenbündel über 40 sensorische und motorische Axone enthalten. Die Generierung spezifischer Antikörper, die in der Lage wären die einzelnen Nervenbahnen voneinander zu unterscheiden, könnten zur Beantwortung beitragen.

Die Doppelfärbungen der panneural überexprimierten SRPK79D-PC-GFP-Linie mit dem PC-Antiserum und dem Glutamat-III Rezeptor bewiesen, dass die neuronal überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform an die Aktive Zone der Präsynapse transportiert wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform nicht nur mit Bruchpilot, sondern auch mit dessen Interaktionspartnern Rab3 und Liprin- α kolokalisiert (Abbildung 3.12). Somit könnte SRPK79D an der Lokalisation von Bruchpilot beteiligt sein. Auch die Möglichkeit, dass die Agglomeration von Bruchpilot aus einer generellen Überexpression synaptischer Proteine

resultiert, wurde untersucht. Die *UAS-Sap47 eGFP* (Funk, 2003) und *UAS-Synapsin PKA 1 und 2 mutiert* (B. Michels) Fliegenlinien wurden mit *elav-GAL4* getrieben und auf Bruchpilot-Agglomerate untersucht. Hier zeigte sich, dass die Überexpression des SAP47-Proteins und des Synapsin Proteins zu einer wildtypischen Verteilung von Bruchpilot in larvalen Nerven führten (Daten nicht gezeigt). Damit konnte ein genereller Effekt von überexprimierten Komponenten der Präsynapse ausgeschlossen werden.

4.4 Überprüfung des axonalen Transports durch Färbungen mit dem MitoTracker® Green FM

Eine Mutation der Unc-51 Serin/Threonin-Kinase in *Drosophila* führt ebenfalls zu Bruchpilot-Agglomeraten im larvalen Nervensystem (Wairkar et al., 2009). Diese Kinase reguliert eventuell die Lokalisation von Bruchpilot an der Aktiven Zone gegenüber den Glutamat-Rezeptoren der Postsynapse. Die Agglomeration von Bruchpilot wird in diesem Fall jedoch durch einen axonalen Transportdefekt verursacht (Wairkar et al., 2009). Das CAZ-Protein Bassoon der Vertebraten agiert als Cargo-Adaptor beim retrograden Transport (Fejtova et al., 2009). Bei einer Mutation wird der Bassoon-Transport unterbrochen und die Proteine Piccolo und Bassoon werden nicht mehr richtig an die Aktive Zone transportiert. Um Störungen des generellen axonalen Transports in der *Srpk79D*-Mutante endgültig ausschließen zu können (vgl. Kapitel 4.3), wurden die Mitochondrien durch den MitoTracker® Green FM Farbstoff (Invitrogen) visualisiert. Der Farbstoff diffundiert passiv in die Neurone und durch die äußere Membran von Mitochondrien und wird in aktiven Mitochondrien oxidiert, wodurch die Aktivierung seiner Fluoreszenz erfolgt. Die bidirektionelle Wanderung der aktiven Mitochondrien konnte beobachtet werden (Abbildung 3.13; Zinsmaier et al., 2009). Auch in einer parallelen Studie konnte kein Unterschied mit Mito-GFP festgestellt werden (Johnson et al., 2009). Folglich scheint die Mutation des *Srpk79D*-Gens den generellen axonalen Transport nicht zu beeinträchtigen.

4.5 Quantifizierungen der Anzahl von Boutons

Bei immunhistochemischen Färbungen larvaler Nerv-Muskel-Präparate von *Srpk79D*-Mutanten zeigte die Morphologie der synaptischen Boutons und die Zahl der Aktiven Zone keine Auffälligkeiten (Abbildung 3.14; Nieratschker, 2008). Die Mutation im Kinesin *imac* verursacht eine Agglomeration von Bruchpilot. Hier führt die Mutation jedoch auch zu einer Störung der

Differenzierung von Boutons, die in einer Reduktion von Aktiven Zonen resultiert (Pack-Chung et al., 2007). Dies konnte jedoch für die *Srpk79D*-Mutanten ausgeschlossen werden. Die Quantifizierungen der Anzahl der Ib-Boutons im Muskelsegment 6/7 bzw. 12/13 bestätigte dieses Ergebnis (Abbildung 3.15). Unvollständige oder fehlende T-bars würden zu einer gestörten Transmission führen (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006; Fouquet et al., 2009; Wichmann et al., 2010). Die synaptische Übertragung weist an der larvalen neuromuskulären Synapse der *Srpk79D*-Mutante keine offensichtlichen Veränderungen auf, wie die Messungen der mEJPs und eEJPs zeigten (Bucher, 2008). Infolgedessen scheint die Menge an Bruchpilot, welches bis zur synaptischen Endigung transportiert wird, für den Aufbau und die Funktion der Aktiven Zonen auszureichen (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006; Bucher, 2008). Durch die hohe Zahl von Vesikeln des 'readily releasable pools' der larvalen Nerv-Muskel-Synapse könnten Transmissionsdefekte unentdeckt bleiben. Die Wiederholung des Versuchs bei kontinuierlicher Belastung könnte möglicherweise einen Unterschied aufdecken, vergleichbar zur *Sap47*-Mutante (Saumweber, in Vorbereitung). Die Verhaltensdefizite der Bruchpilot-RNAi-Fliegen dürften durch die eingeschränkte Transmission verursacht werden, die am larvalen Nerv-Muskel-Präparat beobachtet wurden (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Zwar zeigt die *Srpk79D*-Mutante vergleichbare Verhaltensdefizite, diese sind jedoch weniger stark ausgeprägt (Bock, 2006; Bloch, 2007; Nieratschker et al., 2009). Die normale Transmission an der larvalen Nerv-Muskel-Synapse in den *Srpk79D*-Mutanten stellt demnach einen gravierenden Unterschied zu den Bruchpilot-RNAi-Fliegen dar. Da sich die Synapsen der larvalen Motoneurone jedoch von denen der im Zentralnervensystem der adulten Tiere unterscheiden, kann ein Defekt in der Transmission der *Srpk79D*-Mutanten erst ausgeschlossen werden, wenn auch die Transmission in adulten Tieren gemessen und mit dem Wildtyp verglichen werden kann. Trotzdem weisen die ähnlichen Verhaltensdefizite auf eine mögliche funktionelle Interaktion beider Proteine hin. In einer parallelen Studie konnte gezeigt werden, dass in der *Srpk79D^{P2}*-Linie eine etwa 30%ige Reduktion der Bruchpilot-spezifischen Immunfluoreszenz an der larvalen neuromuskulären Synapse erfolgt. Diese Fliegenlinie besitzt im achten Intron ein P-Element, das zum Ausfall aller *Srpk79D*-Transkripte führt (Johnson et al., 2009; Abbildung 3.24). Die Agglomerate in den larvalen Nerven könnten somit das Bruchpilot-Material repräsentieren, das an der neuromuskulären Synapse fehlt. Zum Vergleich der Ergebnisse könnte die Quantifizierung der Fluoreszenzstärke von Bruchpilot in der *Srpk79D^{VN}*-Nullmutante erfolgen.

4.6 Rettungsexperimente mit den Kinase-cDNAs im *Srpk79D^{VN}*-Hintergrund

Für die Verifizierung, dass die beobachteten Phänotypen auf den Ausfall des *Srpk79D*-Gens beruhen, sollte ein Rettungsversuch im *Srpk79D*-Nullmutanten-Hintergrund durchgeführt werden. Dies ist notwendig, um sicher zu stellen, dass die beobachteten Phänotypen nicht durch unabhängige Mutationen oder Effekte des genetischen Hintergrunds verursacht werden. Neurodegenerative Erkrankungen wirken sich oft auf die Lebensdauer und Lokomotion aus, so führt auch die Mutation im *Srpk79D*-Gen zu einer geringeren Lebenserwartung der Fliegen und zu Verhaltensdefiziten (Bock, 2006; Bloch, 2007; Nieratschker et al., 2009). In der *Srpk79D^{Pl}*-Fliege war die ektopische Expression von UAS-*Srpk79D-RF* in der Lage die negative Geotaxis, die Flugfähigkeit und die Laufaktivität vollständig, die Lebenserwartung und den Agglomerat-Phänotyp teilweise zu retten (Bock, 2006; Bloch, 2007; Nieratschker, 2008; Nieratschker et al., 2009). Die jeweilige cDNA wurde unter UAS-Kontrolle mit *elav-GAL4* (Campos et al., 1985 und 1987) panneural im genetischen Hintergrund der *Srpk79D*-Nullmutante exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Isoformen der SRPK79D in der Lage sind den Bruchpilot-Agglomerations-Phänotyp größtenteils zu retten (Abbildung 3.16). Verbleibende Agglomerate könnten aufgrund des Fehlens der jeweils restlichen drei Isoformen der SRPK79D auftreten, da die Rettung immer nur mit einer Isoform erfolgt. Weiterhin könnte die Menge der Kinase-Isoformen im Verhältnis zu den anderen Proteinen in der Fliege entscheidend sein. Da aufgrund der Überexpression ein „falsches“ Verhältnis generiert wird, könnte dies die unvollständige Rettung erklären.

Bei der Bestimmung der Lebensdauer und der negativen Geotaxis ergab sich jedoch das Problem, dass die *elav-GAL4*-Linie im Kinase-Nullmutanten-Hintergrund eine schlechtere Lebenserwartung zeigte als die *Srpk79D*-Nullmutante (Abbildung 3.17). Möglicherweise wirkt die Expression des GAL4-Proteins oder die vom Wildtyp abweichende Stärke der Expression des *elav*-Gens negativ auf die Fliegen (Campos et al., 1985 und 1987; Robinow und White, 1988). In der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Überexpression der SRPK79D die Lebensdauer verkürzt (Bloch, 2007). Da aufgrund des Phänotyps der *elav-GAL4*-Treiberlinie eine Interpretation der Befunde zur Lebenserwartung oder Ausprägung der negativen Geotaxis in den Rettungslinien nicht möglich war, wurde eine neue panneurale GAL4-Linie generiert. In der *nSyb-GAL4*-Linie (J. Simpson) wird GAL4 unter der Kontrolle von regulatorischen Sequenzen des Gens für neuronales Synaptobrevin exprimiert, das in allen Neuronen benötigt wird. Durch Rekombinationskreuzungen wurde mit dieser Linie die neue Treiberlinie $w^+; +; nSyb-GAL4, Srpk79D^{VN}$ generiert (Abbildung 3.18). Die Wiederholung der Rettungsversuche mit der $w^+; +; nSyb-GAL4, Srpk79D^{VN}$ -Linie konnten allerdings ebenfalls zu keiner eindeutigen Verbesserung der Verhaltensdefekte führen (Maicher,

2009). Jedoch wurde mit dieser Linie der Bruchpilot-Agglomerat-Phänotyp gerettet (Abbildung 3.23). Diese Befunde könnten darauf hinweisen, dass für die Verhinderung der axonalen Agglomerate eine ausreichende Menge an SRPK79D-Enzym, gleichgültig welcher Isoform, wichtig ist. Für die intakte Funktion des Nervensystems müssen jedoch beide Isoformgruppen, PC/PF und PB/PE präsent sein. Eine genomische Rettung im Nullmutanten-Hintergrund könnte diese Interpretation der Rettungsexperimente um weitere Argumente ergänzen.

Im Zusammenhang mit einer unabhängigen Publikation zur Funktion der SRPK79D-Isoformen kam die Frage auf, ob das *UAS-Srpk79D-RB*-Konstrukt in der Lage ist, den *Srpk79D^{P2}* Phänotyp zu retten. Durch die angesetzten Kreuzungen konnte gezeigt werden, dass das SRPK7D-PB-Konstrukt nur eine schwache Rettung des Agglomerations-Phänotyps bewirkt (Abbildung 3.25). Jedoch müssen diese Fliegen durch PCR-Analysen überprüft werden, was aus Zeitgründen nicht mehr möglich war. Erst danach kann eine fundierte Aussage getroffen werden.

4.7 Dephosphorylierungsversuche und 2D-Gelelektrophorese-Experimente

SR-Proteinkinasen regulieren ihre Substrate, sog. SR-Proteine, durch extensive Phosphorylierung der Serine in der RS-Domäne (Krämer, 1996; Graveley, 2000; Will und Lührmann, 2001). Auch die Aktivität von Kinasen wird anhand ihres Phosphorylierungsstatus reguliert (Stamm, 2008). Da die Peptidsequenz von SRPK79D bis zu 28 potentielle Phosphorylierungsstellen enthält (Abbildung 3.26), wurde in diesem Teilprojekt überprüft, ob die überexprimierte SRPK79D durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase verändert wird. Jedoch zeigte sich, dass in Western Blot-Analysen weder von 1D- noch von 2D-Gelelektrophoresen eine mögliche Dephosphorylierung nachweisbar war (Abbildung 3.27 und Daten nicht gezeigt). Dies könnte mehrere Gründe haben. Erstens könnte die Kinase dephosphoryliert aktiv sein. Zweitens könnten endogene Phosphatasen die Kinase dephosphorylieren. Drittens wäre es möglich, dass die Phosphorylierung entwicklungs- bzw. gewebespezifisch stattfindet. Die hier aufgeführten Daten wurden mittels adulter Kopfhomogenate gesammelt, bei Larven oder Puppen könnte sich das Phosphorylierungsmuster der Kinase unterscheiden. Demnach müssten weitere Versuche durchgeführt werden, in denen verschiedene Entwicklungsstadien von *Drosophila* überprüft werden. Viertens wäre es denkbar, dass sich das Phosphorylierungsmuster zwischen der endogenen Kinase und der neuronal überexprimierten SRPK79D-GFP unterscheidet. Dieser Versuch konnte nur mit den überexprimierten Proteinen

durchgeführt werden, da die Antiseren gegen die SRPK79D die endogene Kinase nicht detektieren können. Die Wiederholung des Versuchs könnte mit spezifischen Antikörpern erfolgen.

Das vesikuläre Phosphoprotein Synapsin spielt eine entscheidende Rolle bei der Anheftung der Vesikel an das Zytoskelett (Südhof, 2004). Synapsin von Vertebraten interagiert mit vielen Proteinen, um eine intakte Transmission zu gewährleisten (Cesca et al., 2010). In den *Srpk79D*-Mutanten wurde das Protein Synapsin in Western Blot-Analysen von 1D und 2D-Gelelen überprüft. Hier zeigte das Synapsin-Protein in der *Srpk79D*-Nullmutante das wildtypische Isoformmuster (Abbildung 3.28 und Daten nicht gezeigt). Auch der Frage, ob Synapsin mit Bruchpilot interagiert wurde nachgegangen. In Immunpräzipitationen konnte eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen nicht belegt werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern der SRPK79D würde die Durchführung von Silberfärbungen von Immunpräzipitations-Eluaten mit anschließender Massenspektroskopie darstellen.

4.8 Experimente mit dem Bruchpilot-Protein in *Srpk79D*-Nullmutanten

Die ektopische Überexpression von Bruchpilot führt zu einer Aggregation des Proteins im larvalen und adulten Nervensystem (Wagh et al., 2006, Nieratschker, 2008). Die in den *Srpk79D*-Mutanten beobachtete Agglomeration könnte somit aus einer Überexpression des Bruchpilot-Proteins resultieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurden Immunpräzipitationen, semiquantitative RT-PCRs und Real Time-PCRs durchgeführt. Auf Proteinebene konnte im Western Blot mit adulten und larvalen Gehirnen sowie Immunpräzipitation (Abbildung 3.29 und Abbildung 3.33) kein Unterschied in der Bruchpilotmenge zwischen *Srpk79D*-Nullmutante und Wildtyp detektiert werden (Johnson et al., 2009; Nieratschker, 2008; Nieratschker et al., 2009).

SR-Proteinkinasen sind durch die Phosphorylierung von SR-Proteinen an der Regulation des konstitutiven und alternativen Spleißens beteiligt. Auch die SRPK79D kann das synthetische SRPK1tide phosphorylieren. Einige SR-Proteine binden an den 'exonic splicing enhancer' und stimulieren Spleißereignisse und können u.a. auch regeln welches Exon in der mRNA verbleibt. Aufgrund der fehlenden Phosphorylierung von SR-Proteinen, könnte sich eine Isoformverschiebung ereignen, die in der Agglomeration von Bruchpilot resultiert. In diesem Versuch wurde einerseits ein mögliches Fehlspleißen der Bruchpilot-prä-mRNA, sowie ein möglicher Überschuss an cDNA untersucht. Für die semiquantitative RT-PCR (Abbildung 3.31) und die Real Time-PCR (Abbildung 3.32) wurden Primerkombinationen gewählt, die möglichst spezifisch für die einzelnen Isoformen

von Bruchpilot sind (Abbildung 3.31), um eine Isoform-spezifische Überexpression bzw. mögliche Spleißdefekte von Bruchpilot detektieren zu können. Hier zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp in der *Srpk79D^{VN}*-Nullmutante auf mRNA-Ebene keine signifikante Abweichung des Bruchpilot-Transkripts vorliegt. Zusammenfassend konnte anhand von Western Blot-Analysen, Immunpräzipitationen, semiquantitativen RT-PCRs und Real Time-PCRs gezeigt werden, dass die Transkriptmenge und Proteinmenge von Bruchpilot sich in der *Srpk79D*-Nullmutante nicht signifikant vom Wildtyp unterscheidet. Dies lässt vermuten, dass die Mutation des *Srpk79D*-Gens eine spezifische Störung des Transports von Bruchpilot verursacht. Aufgrund der fehlenden RS-Sequenzen in Bruchpilot stellt dieses wahrscheinlich kein direktes Substrat von SRPK79D dar. Für die Hypothese, dass der Phosphorylierungszustand von Bruchpilot als Ursache der Agglomerat-Bildung in Frage kommt, gibt es bisher keine Hinweise.

Momentan sind drei Antikörper gegen das Aktive Zone-Protein Bruchpilot erhältlich. Der monoklonale Antikörper nc82 ist gegen den C-Terminus von Bruchpilot gerichtet (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006), das N-Term Antiserum richtet sich gegen den N-Terminus und das D2-Antiserum richtet sich gegen die zweite Domäne des Bruchpilot-Proteins (Abbildung 3.35; Fouquet et al., 2009). Die immunhistochemische Färbung von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten der *Srpk79D*-Mutante zeigte sowohl für das N-Term Antiserum als auch für das D2-Antiserum eine nicht vom MAK nc82 abweichende Färbung (Abbildung 3.34). Die Bruchpilot-PF-Isoform besitzt einen anderen C-Terminus, der von nc82 nicht detektiert wird, aber durch die Färbung mit dem N-Term Antiserum unter Umständen erkannt würde. Dies deutet darauf hin, dass die Mutation im *Srpk79D*-Gen keine separate Akkumulation der Bruchpilot-PF-Isoform bewirkt.

Versuche mit den Überexpressionslinien für Bruchpilot (Abbildung 3.35; Fouquet et al., 2009) ergaben, dass die Überexpression von D1-3 und D2-4 jeweils zur Agglomeration der D2-4- und D1-3-Proteine führte (Abbildung 3.36 und 3.37). Ob die D2-4 Aggregate das endogene Bruchpilot enthalten, könnte mit dem N-Term Antiserum untersucht werden, der die D2-4-Isoform nicht erkennt. Die Überexpression der D1-3-Isoform führte zu einer Aggregation des D1-3-Proteins, diese enthalten jedoch das endogene Bruchpilot nicht. Dies deutet darauf hin, dass der C-Terminus für die Aggregation des Proteins nicht verantwortlich ist.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Überexpression der Kinase ausreicht, um die Aggregation des Bruchpilot-Proteins, die aufgrund der Bruchpilot-Überexpression entsteht, zu retten. Dafür wurde sowohl die *w⁻;UAS-Srpk79D-RB eGFP;+*, als auch die *w⁻;UAS-Srpk79D-RC eGFP;+* Fliegenlinie in den *w⁻;+;UAS-BRP eGFP*-Hintergrund gebracht und mit dem *elav-GAL4*-Treiber

verkreuzt. Die hergestellten Nerv-Muskel-Präparate der Nachkommen zeigten, dass der Bruchpilot-Überexpressions-Phänotyp nicht durch die zeitgleiche Überexpression der SRPK79D-Isoformen gerettet werden kann (Abbildung 3.38). Somit müssen Mechanismen in der Fliege vorhanden sein die einen vorzeitigen Zusammenbau von Bruchpilot unterbinden, und den Zusammenbau erst in der Aktiven Zone erlauben (vgl. auch Oh et al., 2007).

Aufgrund des Stimulated emission depletion (STED)-Mikroskops ist es möglich eine höhere Auflösung eines Fluoreszenzpräparates zu erzielen. Durch Begrenzung der Fluoreszenzanregung auf das Zentrum des Beugungsscheibchens wurde ein Bild der Bruchpilot-Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante generiert, das ihren T-bar ähnlichen Aufbau mit der typischen Donut-Form (Kittel et al., 2009; Fouquet et al., 2009) widerspiegelte (Abbildung 3.39). Die nadelförmigen Agglomerate bestehen vermutlich aus fusionierten T-bars. Dies deckt sich mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von M. Jauch und S. Dippacher (Nieratschker et al., 2009; Jauch, in Vorbereitung; Dippacher, in Vorbereitung). M. Jauch konnte durch Immun-Elektronenmikroskopie belegen, dass diese elektronendichten Akkumulationen in der *Srpk79D*-Mutante Bruchpilot enthalten. Dabei ist zu beachten, dass diese Agglomerate verschiedene Größen und Formen aufweisen können, in einer filamentösen Matrix liegen und ähnlich wie T-bars von kleinen klaren Vesikeln umgeben sind. Weiterhin ungeklärt bleibt die Frage, ob nur Bruchpilot in diesen Agglomeraten vorliegt, oder ob die Agglomerate einen Proteinkomplex im Verbund mit anderen Proteinen darstellen. Nach lichtmikroskopischer Identifizierung weiterer Proteine in den Agglomeraten, könnte man die genauere Verteilung der Proteine anhand der STED-Technik aufklären.

4.9 *In vivo* Imaging

In Zusammenarbeit mit T. Andlauer, AG Sigrist, konnte bei *in vivo* Imaging-Versuchen die Verfolgung des fluoreszenzmarkierten Bruchpilot-Proteins in der *Srpk79D*-Nullmutante erfolgen. Dazu wurde die *w¹¹¹⁸;UAS-Brp-D3-Strawberry, GAL4 OK6/Cy0;+* Linie in den *Srpk79D*-Nullmutanten-Hintergrund gekreuzt. Hierbei ist das endogene Bruchpilot Ausschlag gebend für die Lokalisation des Bruchpilot-D3-Fragments (Schmid et al., 2008; Fouquet et al., 2009; Andlauer et al., 2010). Aufgrund dessen wird das Bruchpilot-D3-Strawberry in die synaptische Endigung transportiert und es kolokalisiert auch mit den Bruchpilot-Agglomeraten im Axon (Abbildung 3.40 und 3.41). Durch die Überexpression mit dem neuronalen Treiber OK6-GAL4 (Sanyal, 2009) sind

auch in der parentalen Ausgangslinie kleinere Agglomerate vorhanden (Abbildung 3.42 A), die sich entlang des Axons bewegen können (T. Andlauer, persönliche Mitteilung). Das Strawberry-markierte Bruchpilot konnte in intakten und lebenden Larven verfolgt werden (Abbildung 3.42). Hier zeigte sich, dass kleine Bruchpilot-Agglomerate retrograd und anterograd im Axon transportiert werden können. Größere Agglomerate liegen statisch im Axon. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein bestimmter Grad des Zusammenbaus von Bruchpilot darüber entscheidet, ob der Transport unterbrochen wird oder weiterhin stattfindet. Die partielle Transportblockade könnte für die Reduktion der Bruchpilot-Färbung in den Aktiven Zonen verantwortlich sein. (Johnson et al., 2009). Bruchpilot besitzt ausgedehnte 'coiled-coil' Domänen und ist ein relativ großes Protein von 200kDa. Die elektronendichten Strukturen der Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante zeigen, dass Bruchpilot vermutlich gemeinsam mit anderen Proteinen fähig zu sein scheint, im Axon nahezu perfekt geformte T-bars auszubilden. Dabei könnten die Proteine wie Rab3 oder Liprin- α in der präsynaptischen Aktiven Zone den geregelten Aufbau und die Positionierung gegenüber den Glutamat-Rezeptoren in der Postsynapse steuern (Fouquet et al., 2009; Graf et al. 2009).

4.10 Identifizierung von Interaktionspartnern für SRPK79D

Die Identifizierung von Interaktionspartnern eines Proteins ermöglicht es Rückschlüsse auf seine Funktion zu ziehen. Hier wurde auf das CytoTrap-Verfahren der Firma Stratagene zurückgegriffen. Der CytoTrap-Versuch ermöglicht auch transiente Interaktionen wie z.B. Phosphorylierungen zu detektieren und ist demnach sensitiver als der konventionelle Yeast-two-hybrid-Screen. Ein weiterer Grund auf den CytoTrap-Versuch zurückzugreifen war, dass die Suche nach Interaktionspartnern ins Zytoplasma verlegt wird, da die meisten SR-Proteinkinasen im Zytoplasma von Zellen lokalisieren (Wang et al., 1998; Kuryonagi et al., 1998; Ding et al., 2006). Zunächst erfolgte die Klonierung der SRPK79D-Isoformen in den pSos-Vektor. Die anschließende Kotransformation in *cdc25* Zellen ergab für die SRPK79D-PB-Isoform vier positive Interaktionspartner. Davon war CG11266 oder Caper/1.3CC von Interesse, da es am Spleißvorgang beteiligt zu sein scheint (Park et al., 2004; Katzenberger et al., 2009). Caper/1.3 CC erzeugt sieben Transkripte die für zwei Polypeptide kodieren, eine große Isoform PA/PB, und eine kleine PC/PD/PE/PF (Abbildung 3.45). Dabei besitzt nur Caper-PA/PB phosphorylierbare Aminosäuren (11 Serine, 3 Threonine und 4 Tyrosine) in ihrer Peptidsequenz. Weiterhin besitzen Caper-PA/PB drei RNA-Erkennungsmotive (RRM) und die kleinere Isoform Caper-PC-PF jeweils zwei RNA-Erkennungsmotive (siehe Abbildung 4.1).

Diskussion

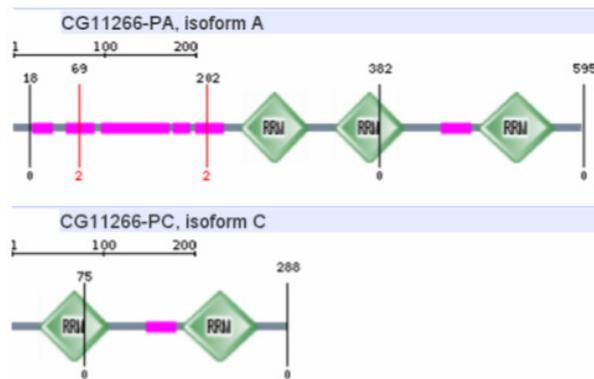


Abbildung 4.1. **Schematische Darstellung der Domänen von Caper/1.3 CC:** Die große Isoform PA/PB von Caper besitzt drei RNA-Erkennungsmotive (RRMs) und die kleine Isoform PC–PF zwei RNA-Erkennungsmotive. In pink sind Domänen von geringer Komplexität dargestellt. Quelle: <http://smart.embl-heidelberg.de/smart>

Die Sequenzierung des Klons ergab, dass nur das letzte Exon im pMyr Vektor vorliegt. Dies könnte eine neue Spleißvariante des Gens darstellen, wahrscheinlicher ist jedoch, dass die cDNA nur unvollständig kloniert wurde (Stratagene). Jedoch könnte dieses letzte Exon wichtig für die Protein-Protein-Interaktion sein (Park et al., 2004; Katzenberger et al., 2009). Um eine fundierte Aussage treffen zu können, könnte der CytoTrap-Versuch mit den zwei verschiedenen Isoform-Gruppen von Caper wiederholt werden. Ein weiteres interessantes Experiment wäre die Durchführung eines Phosphorylierungsversuchs, zur Überprüfung einer möglichen Phosphorylierung von Caper durch die SRPK79D. V. Nieratschker konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass die SRPK79D in der Lage ist ein synthetisches Peptid mit mehreren Serin/Arginin-Dipeptiden, korrespondierend zur Sequenz vom humanen ASF/SF2, zu phosphorylieren (Nieratschker, 2008). Die größere Isoform PA/PB von Caper besitzt bis zu 18 potentielle Phosphorylierungsstellen, davon 11 Serine. Über das Protein Caper ist bisher wenig bekannt. Im nächsten Schritt könnte GFP-markiertes Caper generiert werden, um die Lokalisation des Proteins untersuchen zu können. Dies würde Immunfärbungen mit einem GFP-Antikörper ermöglichen, wodurch eine Kolo-kalisation von Caper mit SRPK79D oder anderen Proteinen untersucht werden könnte. Die zwei bestellten P-Elementinsertionen, sowie die kürzlich wieder erhältliche RNAi-Linie können nun im nächsten Schritt auf Bruchpilot-Agglomerate untersucht werden.

Die weiteren identifizierten Kandidaten für die SRPK79-PB-Isoform sind mitochondriale Proteine und das Hitzeschock-Protein Hsp70Bbb. Da neurodegenerative Erkrankungen auch aufgrund von Mutationen in Mitochondrien (Karachitos et al., 2010) verursacht werden können, sollten die potentiellen Interaktionspartner anhand von P-Elementinsertionslinien oder RNAi-Linien auf den Agglomerations-Phänotyp untersucht werden.

Der für die SRPK79D-PC durchgeführte CytoTrap ergab nur Temperatur-Revertanten und konnte aus Zeitgründen nicht wiederholt werden. Die erneute Sequenzierung ergab, dass im ersten Viertel der SRPK79D-PC-Isoform im Hefeklon ein mutiertes Basenpaar ein Stopp-Codon generiert. Interessant wäre zu erfahren, ob die SRPK79D-Isoformen unterschiedliche Interaktionspartner besitzen, da der N-Terminus offenbar eine unterschiedliche Lokalisation bewirkt (vgl. Kapitel 3.1). Genauere Rückschlüsse lassen sich erst ziehen, wenn der Versuch mit der SRPK79D-RC-Isoform wiederholt wurde.

4.11 Charakterisierung von RNAi-Linien gerichtet gegen SR-Proteine von *Drosophila*

Durch die Phosphorylierung von SR-Proteinen regulieren SR-Proteinkinasen die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine und sind dadurch folglich am nukleären prä-mRNA-Spleißen beteiligt (Krämer, 1996; Graveley, 2000; Stamm, 2008). SR-Proteine sind hochkonservierte Phosphoproteine, die nicht nur am konstitutiven und alternativen Spleißen beteiligt sind, sondern auch die zytoplasmatische mRNA regulieren können (Huang und Steitz, 2005; Glanzer et al., 2005; Blaustein et al., 2009). An ihrem N-Terminus besitzen sie ein oder zwei RNA-Erkennungsmotive (RRM) und C-terminal Serin/Arginin-reiche Sequenzen. In *Drosophila* sind acht verschiedene SR-Proteine bekannt: SC35, SF2/ASF, RBP1, RBP1-like, B52 (SRp55), SRp54, 9G8/xl6 und SF3 (Roth et al., 1991; Manley und Tacke, 1996; Cáceres et al., 1998; Graveley, 2000; Wan et al., 2008). Da schon gezeigt werden konnte, dass SRPK79D das SRPK1tide phosphorylieren kann, ergibt sich die Möglichkeit, dass SR-Proteine Substrate der SRPK79D darstellen könnten. Larven, in denen diese SR-Proteine durch panneurale RNAi-Suppression reduziert waren, wurden auf Aggregation des Bruchpilot-Proteins untersucht. Dabei zeigte sich, dass SC35, RBP1, RBP1-like, B52 (SRp55), SRp54, 9G8 bzw. xl6 keine Bruchpilot-Agglomerate durch die RNAi-vermittelte Reduktion bewirken (Daten nicht gezeigt; vgl. auch Jauch, in Vorbereitung). Durch einen schwachen RNAi-Effekt oder durch die Beobachtung, dass SR-Proteine in der Lage sind sich in ihrer Wirkung zu komplementieren (Krainer et al., 1990; Zahler et al., 1992; Zahler et al., 1993), könnte sich der fehlende Phänotyp erklären. Die RNAi-vermittelte Reduktion des Spleißfaktors 2 (ASF/SF2) zeigte kleinere Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Nerven (Abbildung 3.44 und 4.39). Färbungen gegen das CSP belegten, dass die Agglomeratbildung nicht durch einen möglichen axonalen Defekt entsteht (Abbildung 3.50). Die Agglomeration von Bruchpilot deutet darauf hin, dass SF2 ein Substrat der SRPK79D sein könnte, oder zumindest dass beide Proteine in der gleichen Signalkaskade wirken. Das SR-Protein ASF/SF2 ist ein essentieller Spleißfaktor der durch

die Erkennung der 5'-Spleißstelle am konstitutiven und alternativen Spleißen beteiligt ist (Wu und Maniatis 1993; Fu, 1995; Allemand et al., 2001). Bei Co-Immünpräzipitationsversuchen konnte gezeigt werden, dass ASF/SF2 am RNA-Metabolismus, an der Entwicklung von *Drosophila* und bei der Apoptose maßgeblich beiträgt (Gabut et al., 2007). Die Färbung mit dem spezifischen Antikörper gegen SF2 (Gabut et al., 2007) zeigte, dass SF2 nicht in den Bruchpilot-Agglomeraten vorliegt (Abbildung 3.45). Weiterhin zeigten die Färbungen, dass das Phosphoprotein nicht ausschließlich im Nukleus vorliegt, wie bisher angenommen, denn es ist spezifisch am subsynaptischen Retikulum der Postsynapse lokalisiert (Abbildung 3.45 und 3.46 A). Dabei kolokalisiert SF2 mit dem postsynaptischen Marker Disc large (Abbildung 3.48). Hier könnte es maßgeblich an der Regulation der Translation von mRNAs beteiligt sein (Huang und Steitz, 2005; Glanzer et al., 2005; Blaustein et al., 2009). Inkorrekte Phosphorylierung von neuronalem SF2 könnte möglicherweise zu Fehlspleißen eines noch unbekanntem Bruchpilot-Interaktionspartners führen und so den beobachteten Phänotyp bewirken. Da es keine Nullmutante für SF2 gibt, wurde die Spezifität der SF2-Färbung an RNAi-Linien getestet. Hier zeigte sich eine Reduktion der SF2-Färbung im postsynaptischen Retikulum und in Zellkernen (Abbildung 3.49), die Färbung muss jedoch noch quantifiziert werden.

Hingegen führt die panneurale Überexpression von SF2 mit *eval-GAL4* zur Bildung von CSP-Aggregaten in larvalen Nerven (Abbildung 3.50), was einen generellen Defekt des axonalen Transports nahelegt. Dies verursachte auch eine schwache Akkumulation des Bruchpilot-Proteins, wohingegen SF2 und CSP stark akkumulieren (Abbildung 3.50). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Transport von Bruchpilot in einer spezifischen Vesikelklasse erfolgt. Bei der Überexpression mit *GMR-GAL4* in Photorezeptoren im sich entwickelnden Auge traten retinale Defekte, sog. „rough eyes“, auf. Weiterhin trat eine Letalität der männlichen Fliegen im Puppenstadium auf, wodurch SF2 wichtig für das Überleben männlicher Fliegen ist (Allemand et al., 2001). Die Überexpression von SF2 mit *elav-GAL4* führte ebenfalls zu einer Letalität der Fliegen ab dem Puppenstadium, wobei die wenigen überlebenden Fliegen (ca. 10%) keine auffälligen retinalen Defekte zeigten. Jedoch zeigten die überlebenden Fliegen Schwierigkeiten bei der Lokomotion. Dies müsste jedoch in weiteren Versuchen bestätigt werden, in denen Kreuzungen angesetzt werden müssen, um genügend Nachkommen zu erhalten. Auch eine Akkumulation des SF2-Proteins im adulten Fliegenhirn, sowie ein starkes Färbemuster der Calyces des Pilzkörpers konnte verzeichnet werden (Abbildung 3.47).

Es konnte gezeigt werden, dass SF2 von SRPK1 nicht phosphoryliert werden kann, sondern nur von Clk/Sty-Kinasen und der Topoisomerase I (Rossi et al., 1996; Allemand et al., 2001). Daraus wurde geschlossen, dass SF2 kein Substrat der SR-Proteinkinasen darstellt. In *in vitro*

Diskussion

Phosphorylierungsstudien konnte V. Nieratschker zeigen, dass SRPK1tide, korrespondierend zur RS-Domäne des humanen Spleißfaktors ASF/SF2, von beiden SRPK79D-Isoformen phosphoryliert werden kann. Möglicherweise ist die SRPK79D die erste SR-Proteinkinase die in der Lage wäre SF2 zu phosphorylieren. Bisher wurde angenommen, dass dSF2 ausschließlich im Nukleus vorliegt und nicht zu den 'shuttling'-Proteinen, wie sein humanes Homolog ASF/SF2, gehört (Allemand et al., 2001). Die putative Lokalisation im postsynaptischen Retikulum ist daher überraschend. SF2 interagiert mit sich selbst und ermöglicht dadurch U1 snRNP die Interaktion mit der 5'-Spleißstelle (Wu und Maniatis, 1993; Kohtz et al., 1994; Tarn und Steitz, 1994; Fu, 1995). Möglicherweise ist ein bestimmter Grad an Phosphorylierung ausschlaggebend, ob eine bestimmte prä-mRNA gespleißt wird.

Es konnte experimentell belegt werden, dass Proteintranslation am sich entwickelnden Terminal und in Dendriten stattfindet (Zhang et al., 2002, Glanzer et al., 2005; Lyles et al., 2006; Blaustein et al., 2009; Oh et al., 2010). Es gibt in 'ribbon' Strukturen bei Vertebraten auch RNA-bindende Proteine wie RIBEYE und CtBP1, die an sich bildenden Präsynapsen für die RNA-Prozessierung wichtig sein könnten (Schmitz et al., 2000; tom Dieck et al., 2005; Zanazzi und Matthews, 2009). Beispielsweise ist auch RIM bei Säugern ein Substrat mehrerer Kinasen (Lonart et al., 2003; Inoue et al., 2006). Die Vorhersage durch ein Onlinetool (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart>) für die SRPK79D-PC-Isoform verspricht ebenfalls eine Interaktion mit SF2 (Abbildung 4.2). Da die vorherigen Ergebnisse auf eine Interaktion zwischen SF2 und SRPK79D hinweisen, sollte SF2 in den pMyr-Vektor kloniert werden, um den CytoTrap-Screen wiederholen zu können. Aus Zeitgründen konnte der Versuch nicht beendet werden. Es wäre interessant den Versuch zu Ende zu führen, um eine mögliche Interaktion zu bestätigen.

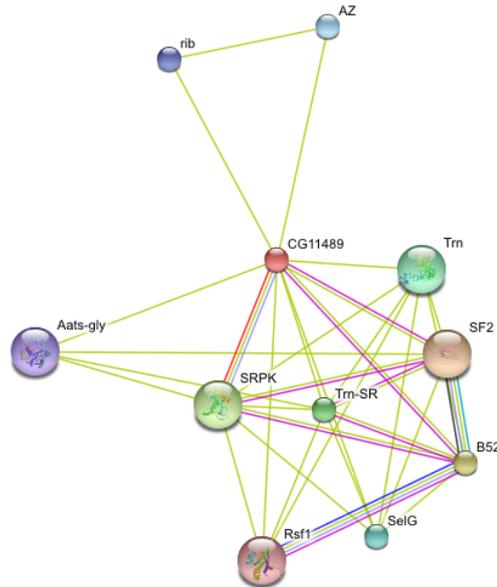


Abbildung 4.2. **Vorhersage von Interaktionspartnern für die SRPK79D-PC-Isoform:** Eine Interaktion von SRPK79D-PC und SF2 ist aufgrund der Analyse durch dieses Onlinetool möglich. Quelle: <http://smart.embl-heidelberg.de/smart>

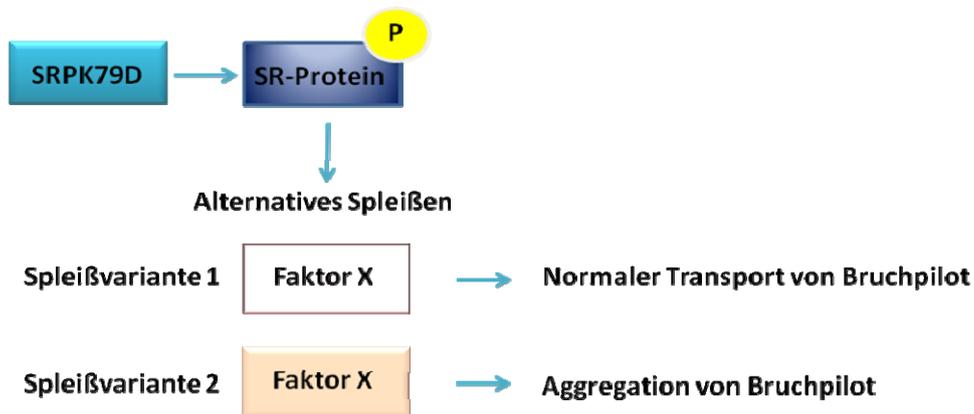
4.12 Mögliche Wirkmechanismen von SRPK79D

Es können verschiedene Hypothesen über die Funktion der SRPK79D anhand der vorliegenden Ergebnisse aufgestellt werden (Abbildung 4.3). So könnte SRPK79D durch die Phosphorylierung von bestimmten SR-Proteinen das Spleißen eines Proteins katalysieren. Dieses Protein könnte für den fehlerfreien Transport von Bruchpilot zuständig sein. Da die Konzentration von SR-Proteinen im Nukleus entscheidend ist, könnte die fehlende SRPK79D zu falsch gespleißten Proteinen, bzw. einer Isoformverschiebung führen, die eine Agglomeration von Bruchpilot verursachen (Abbildung 4.3 A).

Alternativ müsste ein unbekannter Faktor X, der mit Bruchpilot kotransportiert wird, in einem korrekten stöchiometrischen Verhältnis zu Bruchpilot präsent sein, um die Assemblierung von Bruchpilot zu verhindern. Dieses Verhältnis könnte durch eine Bruchpilot-Überexpression oder durch die fehlende Phosphorylierung gestört sein und die Agglomeration bewirken. In *Srpk79D*-Mutanten könnte einerseits eine Reduktion durch Fehlspleißen bzw. die Rekrutierung durch fehlende Phosphorylierung stattfinden (Abbildung 4.3 B). Da die Phosphorylierung von Proteinen eine wichtige Rolle bei Transportmechanismen von Vesikeln und Organellen spielt, könnte die fehlende Phosphorylierung zu einer Unterbrechung des Vesikeltransportes führen (Sheetz, 1999). Die Versuche mit zeitgleicher Überexpression der Kinase-Isoformen und von Bruchpilot machen

die Theorie des Faktors X möglich. Da auch die Agglomeration von Bruchpilot durch RNAi-vermittelter Reduktion in der *Srpk79D*-Mutante nicht verhindert wird (Jauch, in Vorbereitung) könnte das stöchiometrische Verhältnis des unbekanntes Faktors eine entscheidende Rolle spielen. Da SR-Proteine auch am Export der mRNA und der Translation (Long und Cáceres, 2009; Blaustein et al., 2009; Glanzer et al., 2005) beteiligt sind, wäre es weiterhin denkbar, dass der Ausfall der SRPK79D hierbei eine Störung verursacht. Um den Wirkmechanismus der Agglomeratbildung aufklären zu können sind eine Vielzahl weiterer Experimente notwendig.

A



B

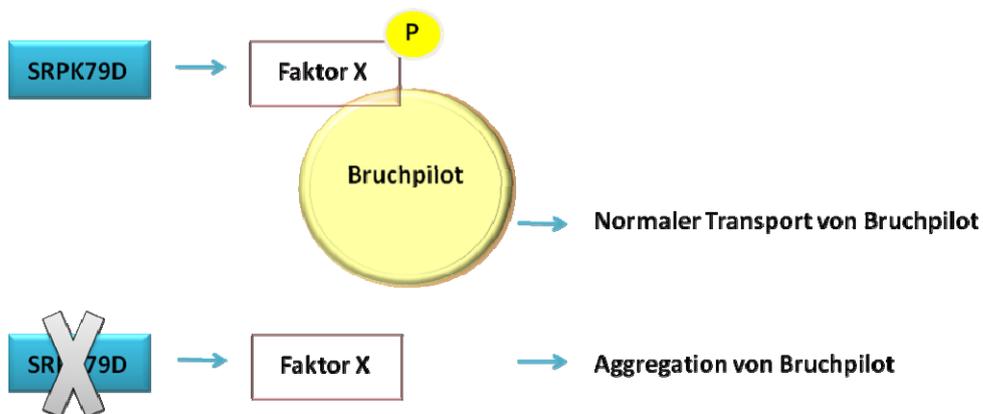


Abbildung 4.3. **Mögliche Wirkmechanismen der SRPK79D:** In Variante A könnte die SRPK79D durch die Phosphorylierung eines SR-Proteins das Spleißen eines unbekanntes Faktors (X) beeinflussen. Durch den Wegfall der SRPK79D könnte dieser nicht mehr korrekt gespleißt bzw. in ausreichender Menge exprimiert werden und die Akkumulation des Bruchpilot-Proteins in den larvalen Nerven verursachen. In Variante B könnte die SRPK79D anhand von Phosphorylierungen eines unbekanntes Faktors (X), der mit Bruchpilot im Transportvesikel vorliegt und seine vollständige Assemblierung verhindert, interagieren. Hier führt die fehlende, oder nicht ausreichende Phosphorylierung des unbekanntes Faktors zu einem gestörten Transport der Vesikel und dem frühzeitigen Zusammenbau des Bruchpilots in den larvalen Nerven.

5. Ausblick

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen mit den überexprimierten SRPK79D-GFP-Isoformen durchgeführt. Diese spiegeln jedoch nicht das endogene Muster in wildtypischen Fliegen wieder. Um eine fundierte Aussagen über die Lokalisation und das Expressionsmuster der SRPK79D treffen zu können, ist es unerlässlich, Antikörper zu generieren, die in der Lage sind die endogene SRPK79D zu detektieren. Mit den spezifischen Antikörpern könnten die Färbungen wiederholt werden, um so Klarheit über die Lokalisation und die mögliche Funktion der SRPK79D zu verschaffen. Die Überexpression der SRPK79D erfolgt in Gehirnarealen die mit Lernen und Gedächtnis assoziiert sind. Mögliche Lerndefekte könnten durch die Durchführung von Tully-Experimenten detektiert werden (Tully und Quinn, 1985).

Zur endgültigen Klärung der Frage, ob alle beobachteten Phänotypen aufgrund der Mutation im *Srpk79D*-Gen verursacht werden, müssen die Rettungsexperimente im Nullmutanten-Hintergrund wiederholt werden. Hier war nur eine eindeutige Rettung des Agglomerat-Phänotyps feststellbar. Zur Minimierung möglicher Effekte des genetischen Hintergrunds oder weiterer Mutationen sollten zuvor alle Linien gegen den Wildtyp ausgekreuzt werden. Auch die Durchführung eines genomischen Rettung könnte in Erwägung gezogen werden. Die getesteten cDNA-Konstrukte der SRPK79D-PB, -PC und -PF konnten den Agglomerate-Phänotyp retten. Das fehlende Konstrukt *UAS-Srpk79D-RE* konnte von M. Jauch nicht im Zuge ihrer Doktorarbeit erfolgreich hergestellt werden (Jauch, in Vorbereitung). Um eine Aussage über die Rettung mit dem PE-Konstrukt treffen zu können, müsste dieses Konstrukt noch kloniert werden. Dies würde möglicherweise eine Aussage über die Funktion einzelner SRPK79D-Isoformen erlauben.

Vordergründig bleibt immer noch die Frage ungeklärt, was die Agglomeration von Bruchpilot in der *Srpk79D*-Mutante verursacht. Immunhistochemische Färbungen konnten weder weitere aggregierte Proteine detektieren, noch die klaren mit den T-bars assoziierten Vesikel erkennen (Nieratschker et al., 2009). Findet man weitere Proteine, die lichtmikroskopisch mit den Bruchpilot-Agglomeraten assoziiert vorliegen, könnten immun-elektronenmikroskopische Experimente klären, ob diese Proteine im Zentrum der elektronendichten Strukturen liegen oder, wie Bruchpilot, diese eher peripher umgeben.

Die Überexpression von Bruchpilot führt zu einer Aggregation des Proteins im larvalen und adulten Nervensystem (Nieratschker, 2008). Eine mögliche Überexpression bzw. Spleißdefekte von Bruchpilot in der *Srpk79D*-Mutante konnten durch verschiedene Methoden größtenteils ausgeschlossen werden. Da noch weitere Bruchpilot-Isoformen existieren (T. Andlauer, persönliche Mitteilung), könnten diese ebenfalls in Real Time-PCRs und Western Blot-Analysen untersucht

werden. Auch die Durchführung von Phosphorylierungsversuchen mit Bruchpilot als Substrat könnte endgültige Gewissheit bringen, ob Bruchpilot ein Substrat der SRPK79D ist. Weiterhin wäre es von großer Wichtigkeit die Vesikelklasse zu identifizieren, die zum Einsatz beim Bruchpilot-Transport kommt. Die überexprimierte SRPK79D-PC-Isoform kolokalisiert mit Bruchpilot, Liprin- α und Rab3 an der Aktiven Zone. Eine mögliche Interaktion von SRPK79D mit Liprin- α oder Rab3 könnte anhand von Immunpräzipitationen untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden erste Schritte zur Identifizierung von Interaktionspartnern der SRPK79D unternommen. Ausgehend von den beschriebenen Ergebnissen, könnte die SRPK79D als Spleißregulator fungieren. SR-Proteinkinasen phosphorylieren ihre Substrate und regulieren so das konstitutive und alternative Spleißen (Gui et al., 1994; Colwill et al., 1996; Kuroyanagi et al., 1998; Aubol et al., 2003). Von den für die SRPK79D-RB-Isoform identifizierten Interaktionspartnern ist nur Caper als Mitglied der Spleißmaschinerie bekannt. Da keine Antikörper für Caper existieren, könnte GFP-markiertes Caper generiert werden. Durch die GFP-Markierung von Caper könnten verschiedene immunhistochemische Methoden zum Einsatz kommen, um die Lokalisation, Verteilung und eine mögliche Kolokalisation mit synaptischen Proteinen untersuchen zu können. Anhand von Phosphorylierungsversuchen könnte überprüft werden, ob Caper ein Substrat der SRPK79D darstellt. Ebenfalls sollten die drei weiteren putativen Interaktionspartner der SRPK79D-RB-Isoform anhand von P-Elementinsertionslinien oder RNAi-vermittelter Reduktion auf den Bruchpilot-Agglomerat-Phänotyp überprüft werden. Der CytoTrap-Versuch für die SRPK79D-RC-Isoform sollte wiederholt werden, da die Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern Rückschlüsse auf die Funktion der SRPK79D ermöglichen könnte.

Die beobachtete Agglomeration von Bruchpilot in der RNAi-vermittelter Reduktion von SF2 sollte noch weiter untersucht werden. Die Entstehung der Agglomerate aufgrund eines axonalen Transportdefekts konnten anhand von Färbungen gegen das Cysteine string protein ausgeschlossen werden. Jedoch könnten die Bruchpilot-Agglomerate infolge eines Fehlspleißens der Bruchpilot-prä-mRNA gebildet werden. Deshalb sollten die Bruchpilot-Transkripte anhand von Real Time-PCR-Analysen untersucht werden. Darüber hinaus wäre es interessant zu klären, warum SF2 am subsynaptischen Retikulum der Postsynapse lokalisiert vorliegt. Eine mögliche Regulation des RNA-Metabolismus kann nicht ausgeschlossen werden (Zhang et al., 2002; Glanzer et al., 2005; Lyles et al., 2006; Blaustein et al., 2009; Oh et al., 2010). Eine mögliche Phosphorylierung von SF2 durch SRPK79D könnte von großem Interesse sein, daher angenommen wurde, dass SF2 kein Substrat für SR-Proteinkinasen darstellt (Allemand et al., 2001).

6. Zusammenfassung

Auf der Suche nach Mutanten mit einer vom Wildtyp abweichenden Verteilung des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot wurde die Serin/Arginin-Proteinkinase SRPK79D identifiziert. Hier zeigte sich, dass die Mutation im *Srpk79D*-Gen zu einer Agglomeration von Bruchpilot in den larvalen segmentalen und intersegmentalen Nerven führt. In der vorliegenden Arbeit sollte die SRPK79D genauer charakterisiert werden. Nach Präadsorptionen und Affinitätsreinigungen von in einer früheren Arbeit erzeugten Antiseren, gelang es die Lokalisation der überexprimierten SRPK79D-GFP-Isoformen zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass keines der Antiseren die endogene Kinase im Western Blot oder immunhistochemisch detektieren konnte. Dies legt den Schluss nahe, dass die Expression der SRPK79D in einer geringen Konzentration erfolgt. Es war jedoch möglich die endogene SRPK79D-PC-Isoform mittels einer Immunpräzipitation soweit anzureichern, dass sie im Western Blot nachweisbar war. Für die SRPK79D-PB-Isoform gelang dies allerdings nicht. Anhand von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten konnte gezeigt werden, dass die panneural überexprimierte SRPK79D-PC-GFP-Isoform an die Aktiven Zone transportiert wird und dort mit Bruchpilot, sowie den Interaktionspartnern von Bruchpilot Liprin- α und Rab3 kolokalisiert. Außerdem liegt sie diffus im Zytoplasma von neuronalen Zellkörpern vor. In adulten Gehirnen lokalisiert die transgen überexprimierte SRPK79D-PC-GFP im Fanshaped body, Ringkomplex und in neuronalen Zellkörpern. Die panneural überexprimierte SRPK79D-PB-GFP-Isoform liegt im larvalen und adulten Gehirn lokal im Zytoplasma der Perikaryen akkumuliert vor und wird nicht an die Aktive Zone transportiert. Das PB-Antiserum erkennt im adulten Gehirn neuronale Zellkörper und das Neuropil in der Calyxregion der Pilzkörper.

Immunhistochemische Färbungen von larvalen Nerv-Muskel-Präparaten mit verschiedenen Antikörpern gegen neuronale Proteine belegen, dass die Agglomerate in der *Srpk79D*-Mutante für Bruchpilot spezifisch sind. Es konnten bisher keine weiteren Komponenten der Agglomerate detektiert werden. Auch ein genereller axonaler Defekt konnte durch Färbungen gegen CSP, Synaptotagmin und Experimenten mit dem Mitochondrienfarbstoff MitoTracker[®] FM Green ausgeschlossen werden. Die quantitative Auswertung der Präparate zeigte, dass die Morphologie der synaptischen Boutons und die Zahl der Aktiven Zonen durch die Mutation im *Srpk79D*-Gen nicht beeinflusst werden.

Um gesicherte Kenntnis darüber zu erlangen, ob die Mutation im *Srpk79D*-Gen die beobachteten Phänotypen verursacht, wurden Rettungsexperimente durchgeführt. Es konnte sowohl für das hypomorphe *Srpk79D^{P1}*-Allel, als auch für die Nullmutante *Srpk79D^{VN}* eine nahezu vollständige Rettung des Agglomerat-Phänotyps mit der panneural exprimierten SRPK79D-PF- oder der

SRPK79D-PB-Isoform erreicht werden. Eine eindeutige Rettung der Verhaltensdefizite im Nullmutanten-Hintergrund war nicht möglich, weder mit der *elav-GAL4*-Treiberlinie, noch nach der Generierung der neuen Treiberlinie *nSyb-GAL4*. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass beide Isoformen der SRPK79D in der Lage sind den Bruchpilot-Agglomerat-Phänotyp zu retten, die Rettung der Verhaltensdefizite jedoch alle Isoformgruppen benötigen.

Bei Dephosphorylierungsversuchen mit immunchemischem Nachweis in 1D- und 2D-Gelelektrophoresen ergaben sich keine Hinweise auf eine mögliche Phosphorylierung der SRPK79D. Das Synapsin-Protein scheint kein Substrat für die SRPK79D zu sein, da es in der *Srpk79D*-Nullmutante ein wildtypisches Isoformmuster zeigte.

Um zu untersuchen, ob der Agglomerations-Phänotyp der *Srpk79D*-Mutanten auf einer Überexpression des Bruchpilotgens oder auf Fehlspleißen seiner prä-mRNA beruht, wurden Immunpräzipitationen, semiquantitative RT-PCRs und Real Time-PCRs durchgeführt. Ausgehend von den Ergebnissen kann eine mögliche Überexpression bzw. Spleißdefekte von Bruchpilot weitgehend ausgeschlossen werden. Bei Färbungen mit den neuen Bruchpilot-Antisera D2 und N-Term zeigte sich, dass die Signale für das N-Term und D2-Antiserum dem nc82 Signal entsprachen. Somit bildet die Bruchpilot-PF-Isoform keine separaten Bruchpilot-Agglomerate in der *Srpk79D*-Nullmutante. Bei der panneuralen Überexpression der verkürzten Bruchpilot-Proteine D1-3 und D2-4, zeigten beide Konstrukte eine Agglomeration im larvalen und adulten Nervensystem. Dabei wird das endogene Bruchpilot-Protein in der panneuralen D1-3-Überexpression nicht akkumuliert. Die simultane Überexpression von SRPK79D und Bruchpilot konnte den Phänotyp der Bruchpilot-Überexpression nicht retten. Anhand der stimulated emission depletion-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Agglomerate das charakteristische Donut-förmige Muster der T-bars zeigen und wahrscheinlich als fusionierte Ketten von T-bars in den larvalen Nerven vorliegen. Beim *in vivo* Imaging Versuch konnte demonstriert werden, dass das verkürzte Bruchpilot-D3-Strawberry in die Bruchpilot-Agglomerate der *Srpk79D*-Nullmutante eingebaut wird und dass größere Agglomerate unbewegt im Nerv verharren. Der anterograde und retrograde Transport kleinerer Agglomerate konnte verzeichnet werden.

Bei CytoTrap-Yeast-two-hybrid-Experimenten konnten für die SRPK79D-PB Isoform vier potentielle Interaktionspartner identifiziert werden: das Hitzeschockprotein Hsp70Bbb, die mitochondriale NADH-Dehydrogenase mt:ND5, das large ribosomal RNA Gen in Mitochondrien und das am Spleißen beteiligte Protein 1.3CC/Caper. Die Sequenzierung zeigte, dass nur das letzte Exon von Caper im pMyr-Vektor vorliegt. Der für die PC-Isoform durchgeführte CytoTrap-Versuch ergab nur Temperatur-Revertanten.

Zusammenfassung

SR-Proteinkinasen phosphorylieren die RS-Domäne von SR-Proteinen und sind dadurch an der Regulation des konstitutiven und alternativen Spleißens beteiligt. Somit stellen die acht identifizierten SR-Proteine in *Drosophila* potentielle Interaktionspartner der SRPK79D dar. Die durch RNAi-vermittelte Reduktion von sieben SR-Proteinen führte zu keiner Agglomeration von Bruchpilot. Jedoch führte die RNAi-vermittelte Reduktion des SR-Proteins Spleißfaktor 2 (SF2) zu kleineren Bruchpilot-Agglomeraten in den axonalen Nerven. SF2 ist selbst kein Bestandteil der Agglomerate der *Srpk79D*-Nullmutante. Die Überexpression von SF2 führt wahrscheinlich zu einem axonalen Transportdefekt, wie die Färbung gegen das Cysteine string protein zeigte. Weiterhin führt die Überexpression zu einer Akkumulation von SF2 in larvalen Axonen und im adulten Gehirn der Fliegen. SF2 ist nicht nur in Zellkernen sämtlicher Zellen nachweisbar, sondern es konnte auch ein spezifisches Signal im subsynaptischen Retikulum der Postsynapse detektiert werden, wie die Färbungen gegen Disc large bestätigten.

7. Summary

In a Screen for mutations which affect the distribution of the active zone protein Bruchpilot, the serine/arginine protein kinase 79D (SRPK79D) was identified. A mutation in the *Srpk79D* gene leads to conspicuous agglomeration of Bruchpilot in the larval segmental and intersegmental nerves. The aim of this thesis was to characterize the function of SRPK79D and to identify its interaction partners. The isoform specific antisera which were generated in an earlier PhD thesis recognized only the pan-neuronal overexpressed GFP-tagged SRPK79D isoforms in Western blots and immunohistochemical stainings. After preabsorption and affinity purification the antisera could uncover the localization of the overexpressed SRPK79D-GFP. Without enrichment of the endogenous SRPK79D concentration seems to be too low to be detected with the antisera. However, the endogenous SRPK79D-PC isoform could be detected in a Western blot after immunoprecipitation, but not the SRPK79D-PB isoform. The panneuronal overexpressed SRPK79D-PC-GFP isoform co-localizes with Bruchpilot as well as with the Bruchpilot interaction partners Liprin- α and Rab3 at active zones and showed a diffuse pattern in the cytoplasm of neuronal cell bodies. In adult brains the panneuronal overexpressed SRPK79D-PC isoform is detectable in the fan-shaped body, ring complex and neuronal cell bodies. The panneuronal overexpressed SRPK79D-PB isoform is not present at the active zone but is detectable in larval and adult CNS accumulating in discrete spots in the cytoplasm of neuronal cells. The panneuronal overexpressed SRPK79D-PB isoform is also present in the neuronal cell bodies and calyces of the mushroom body.

Larval dissections followed by stainings with different antibodies against synaptic proteins showed that the agglomerates in the *Srpk79D* mutants are quite specific for Bruchpilot. No other components of the agglomerates could be revealed until now. General impairments of axonal transport could be excluded by stainings against cysteine string protein (CSP), Synaptotagmin, and experiments with the dye MitoTracker[®] Green FM. These synaptic proteins are uniformly distributed along the larval nerves. The quantification of boutons revealed that the basic synaptic structure is not altered in *Srpk79D*-mutants. Stainings on frozen head sections of null mutant *Srpk79D* revealed a spot like Bruchpilot accumulation in the antennal nerves.

The mutation of *Srpk79D* causes behavioral deficits in adult flies as well as a shortened life span. In order to test if expression of either isoform (SRPK79D-PC/PF or -PB) is able to rescue the obtained phenotypes, rescue experiments were performed. A nearly complete rescue of the agglomerate phenotype was achieved with both SRPK79D isoforms. Rescue experiments for the observed behavioral phenotype in the null mutant background did not significantly improve the defect, neither when using the panneuronal driver lines *elav-GAL4* nor the newly generated *nSyb-GAL4*.

Summary

Alkaline Phosphatase treatment followed by 1D- or 2D-gel electrophoresis could not detect a possible phosphorylation of SRPK79D. Also the vesicle-associated protein Synapsin showed a normal isoform pattern which indicates that Synapsin is not a substrate for SRPK79D.

In experiments to detect overexpression or splicing defects of the active zone protein Bruchpilot as possible cause for the agglomeration phenotype in mutant *Srpk79D* animals, immunoprecipitations, semiquantitative RT-PCRs and Real Time-PCRs were performed. The results showed that overexpression or splicing deficits could be largely excluded. In stainings with the new Bruchpilot antisera N-Term and D2 the staining pattern did not differ from the nc82 staining showing that the PF isoform of Bruchpilot is not forming separate agglomerates in *Srpk79D^{VN}* mutants. The overexpression of D2-4 and D1-3, truncated Bruchpilot proteins without either the N- or C-terminus, respectively, showed an agglomeration of the corresponding proteins in larval and adult CNS. However the overexpression of D1-3 is not affecting the endogenous Bruchpilot distribution. The simultaneous overexpression of SRPK79D and Bruchpilot could not rescue the phenotype caused by Bruchpilot overexpression. With the stimulated emission depletion microscope the pattern of the Bruchpilot agglomerates in the *Srpk79D^{VN}* mutant revealed electron-dense donut-shaped structures in larval nerves, presumably fused T-bars. With *in vivo* imaging experiments anterograde as well as retrograde movement of D3-labeled agglomerates in the *Srpk79D^{VN}* mutant was observed whereas large agglomerates are immobile.

To identify substrates or interaction partners of SRPK79D the Yeast-two-hybrid screen CytoTrap was performed. The CytoTrap screen for the SRPK79D-PB isoform identified four interaction partners: the heat shock protein Hsp70Bbb, the mitochondrial NADH-Dehydrogenase mt:ND5, the large ribosomal RNA gene in mitochondria and 1.3CC/Caper. Caper is involved in splicing via the spliceosome. Sequencing revealed that the pMyr vector includes only the last exon of Caper. The performed CytoTrap for the RC-Isoform detected only temperature revertants.

The RNAi mediated knock down of each of the eight known SR proteins in *Drosophila* showed that seven of them do not produce a phenotype whereas the reduction of SF2 leads to Bruchpilot agglomerates in larval nerves. The SR-Protein SF2 is not included in the agglomerates of the *Srpk79D* mutant but showed expression in nuclei of all cell types. The overexpression of SF2 leads to an agglomeration of SF2 in the larval nerves probably due to an impairment of general axonal transport. SF2 is not only a nuclear protein; it is also associated with post synaptic structures.

8. Literaturverzeichnis

- Aberle** H., Haghghi A.P., Fetter R.D., McCabe B.D., Magalhaes T.R., Goodman C.S.; 2002. *Wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in Drosophila*. *Neuron* 33, 545-558
- Adams** M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F.; 2000. *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195
- Ahmari** S.E., Buchanan J., Smith S.J.; 2000. *Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets*. *Nat. Neuroscience* 3: 445-451
- Akbergova** Y., Bykhovskaia M.; 2009. *Stimulation-Induced Formation of the Reserve Pool of Vesicles in Drosophila Motor Boutons*. *J Neurophys* 101: 2423-2433
- Allemand** E., Gattoni R., Bourbon H.M., Stevenin J., Cáceres J.F., Soret J., Tazi J.; 2001. *Distinctive Features of Drosophila Alternative Splicing Factor RS Domain: Implication for Specific Phosphorylation, Shuttling, and Splicing Activation*. *Mol Cell Biol* 21: 1345-1359
- Allemand** E., Dukudovskaya S., Bordonné R., Tazi J.; 2002. *A Conserved Drosophila Transportin-Serine/Arginine-rich (SR) Protein Permits Nuclear Import of Drosophila SR Protein Splicing Factors and Their Antagonist Repressor Splicing Factor I*. *Mol Biol Cell* 13: 2436-2447
- Andlauer** T.F.M., Sigrist S.J.; 2010. *In vivo imaging of Drosophila larval NMJs to study synapse assembly*. CSHL Press
- Ashery** U., Varoqueaux F., Voets T., Betz A., Thakur P., Koch H., Rettig J., Brose N.; 2000. *Munc 13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells*. *EMBO* 19: 3586-3596
- Ataman** B., Budnik V., Thomas U.; 2006. *Scaffolding proteins at the Drosophila neuromuscular junction*. *Int Rev Neurobiol* 75: 181-216
- Atwood** H.L.; 2006. *Gatekeeper at the synapse*. *Science* 312: 1008-1009
- Aubol** B.E., Chakrabarti S., Ngo J., Shaffer J., Nolen B., Fu X.-D., Ghosh G., Adams J.A.; 2003. *Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2*. *PNAS* 100: 12601-12606
- Augustine** G.J., Burns M.E., DeBello W.M., Hilfiker S., Morgan J.R., Schweizer F.E., Tokumaru H., Umayahara K.; 1999. *Proteins involved in synaptic vesicle trafficking*. *J Physiol* 520: 33-41
- Bähler** M., Greengard P.; 1987. *Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation dependent manner*. *Nature* 326: 704-707

Literaturverzeichnis

- Baines** R.A., Robinson S.G., Fujioka M., Jaynes J.B., Bate M.; 1999. *Postsynaptic expression of tetanus toxin light chain blocks synaptogenesis in Drosophila*. *Curr. Biol.* 9: 1267-1270
- Beal** M.F.; 2001. *Experimental models of parkinson's disease*. *Dept. of Neurobol.*, 2: 325-332
- Becherer** U., Rettig J.; 2006. *Vesicle pools, docking, priming and release*. *Cell Tissue Res* 326: 393-407
- Benfenati** F., Valtorta F., Greengard P.; 1991. *Computer modeling of synapsin I binding to synaptic vesicles and F-actin: implications for regulation of neurotransmitter release*. *PNAS* 88: 575-579
- Benfenati** F., Bähler M., Jahn R., Greengard P.; 1998. *Interactions of synapsin I with small synaptic vesicles: distinct sites in synapsin I bind to vesicle phospholipids and vesicle proteins*. *J. Cell. Biol.* 108: 1863-1872
- Benzer** S.; 1973. *Genetic dissection of behaviour*. *Sci Am* 229(6): 24-37
- Broadie** K., Prokop A., Bellen H.J., O'Kane C.J., Schulze K.L., Sweeney S.T.; 1995. *Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in Drosophila*. *Neuron* 15:663-73.
- Betz** A., Thakur P., Junge H.J., Ashery U., Rhee J.S., Scheuss V., Rosenmund C., Rettig J., Brose N.; 2001. *Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming*. *Neuron* 30: 183– 96
- Black** D.; 2003. *Mechanism of alternative pre-messenger RNA splicing*. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 291-336
- Blaustein** M., Quadrana L., Risso G., Mata M., Pelish F., Srebrow A.; 2009. *SF2/ASF Regulates Proteomic Diversity by Affecting the Balance Between Translation Initiation Mechanisms*. *J Cell Biochem* 107: 826-833
- Blencowe** B.J.; 2000. *Exonic splicing enhancers: mechanism of action diversity and role in human genetic diseases*. *Elsevier Sci Ltd* 25: 106-110
- Bloch** A.; 2007. *Identifizierung und Charakterisierung der Bruchpilot-related-protein-kinase-Nullmutante BRPKVN100 in Drosophila*. Diplomarbeit; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Bock** N.; 2006. *Funktionelle Charakterisierung der Bruchpilot-related-protein-Kinase*. Diplomarbeit; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Bourgeois** C.F., Lejeune F., Stévenin J.; 2004. *Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78: 37-88
- Brand** A.; 1995. *GFP in Drosophila*. *Trends Genet.* 11: 324 – 325

Literaturverzeichnis

- Brand** A.H. und Perrimon N.; 1993. *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development 118: 401-415
- Bucher** D.; 2008. *An electrophysiological analysis of synaptic transmission at the Drosophila larval neuromuscular junction*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Buchner** E., Buchner S., Crawford G., Mason W. T., Salvaterra P. M., Satelle D. B.; 1986. *Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Res. 246: 57-62.
- Burré** J., Volkhardt W.; 2007. *The synaptic vesicle proteome*. J. Neurochem. 101: 1448-1462
- Cáceres** J.F., Sreaton G.R., Krainer A.R.; 1998. *A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm*. Genes Dev 12: 55-66
- Cáceres** J.F., Krainer A.R.; 1993. *Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domain*. EMBO J. 12: 4715-4726
- Campos** A.R., Grossman D, White K.; 1985. *Mutant alleles at the locus elav in Drosophila melanogaster lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis*. J.Neurogenet. 2: 197-218
- Campos** A.R., Rosen D.R., Robinow S.N., White K.; 1987. *Molecular analysis of the locus elav in Drosophila melanogaster: a gene whose embryonic expression is neural specific*. EMBO J. 6: 425-431
- Cases-Langhoff** C., Voss B., Garner A.M., Appeltauer U., Takei K., Kindler S., Veh R.W., De Camilli P., Gundelfinger E.D., Garner C.C.; 1996. *Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix*. Eur. J. Cell Biol. 69: 214-223
- Cesca** F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F.; 2010. *The synapsins: key actors of synapse function and plasticity*. Prog Neurobiol. 91:313-48
- Chalfie** M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C.; 1994. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263: 802-805
- Chua** J.J.E., Kindler S., Boyken J., Jahn R.; 2010. *The architecture of an excitatory synapse*. J Cell Sci 123: 819-823
- Colwill** K., Feng L.L., Yeakley J.M., Gish G.D., Cáceres J.F., Pawson T., Fu X.-D.; 1996. *SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine / arginine-rich splicing factors*. J. Biol. Chem. 271: 24569-24575

- Colwill K.**, Pawson T., Andrews B., Prasad J., Manley J.L., Bell J.C., Duncan P.I.; 1996. *The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution*. EMBO J. 15: 265–275
- Couteaux R.** und Pecot-Dechavassine M.; 1970. *Synaptic vesicles and pouches at the level of “active zones” of the neuromuscular junction*. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 271: 2346–2349
- Dick O.**, tom Dieck S., Altroock W.D., Ammermüller J., Weiler R. Garner C.C., Gundelfinger E.D. Brandstätter J.H.; 2003. *The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina*. Neuron 37: 775-786
- Ding J.**, Zhong X., Hagopian J.C., Cruz M.M., Ghosh G., Feramisco J., Adams J.A., Fu X.; 2006. *Regulated Cellular Partitioning of SR Protein-specific Kinases in Mammalian Cells*. Mol. Biol. Cell 17: 876–885 30
- Dresbach T.**, Qualmann B., Kessel M.M., Garner C.C., Gundelfinger E.D.; 2001. *The presynaptic cytomatrix of brain synapses*. Cell. Mol. Life Sci. 58: 94-110
- Dresbach T.**, Torres V., Wittenmayer N., Altroock W.D., Zamorano P., Zuschratter W., Nawrotzki R., Ziv N.E., Garner C.C., Gundelfinger E.D.; 2006. *Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment*. J Biol Chem 281: 6038-6047
- Dubnau J.** Tully T.; 1998. *Gene discovery in Drosophila: new insights for learning and memory*. Annu Rev Neurosci 21: 407-444
- Duffy J.B.**; 2002. *GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife*. Genesis 34, 1-15
- Eberle K.**; 1995. *Mutagenese und Funktionsanalyse des Csp-Gens von Drosophila melanogaster*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Eberle K.**, Zinsmaier K.E., Buchner S., Gruhn M., Jenni M.; 1998. *Wide distribution of the cysteine string protein in Drosophila tissue revealed by targeted mutagenesis*. Cell tissue Res 294: 203-217
- Eperon I.C.**, Ireland D.C., Smith R.A., Mayeda A., Krainer A.R.; 1993. *Pathways for selection of 5'-splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF*. EMBO J. 12: 3607-3617
- Feany M.B.**, Bender W.W.; 2000. *A Drosophila model of Parkinson's disease*. Nature 404: 394-398

Literaturverzeichnis

- Fejtova A.**, Davydova D., Bishof F., Lazarevic V., Altmann W., Romorini S., Schöne C., Zuschratter W., Kreutz M.R., Garner C.C., Ziv N.E., Gundelfinger E.D.; 2009. *Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon*. J Cell Biol 185: 341-355
- Fenster S.D.**, Chung W.J., Zhai R., Cases-Langhoff C., Voss B., Garner A.M., Kaempf U., Kindler S., Gundelfinger E.D., Garner C.C.; 2000. *Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon*. Neuron 25: 203–214
- Fire A.**, Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C.; 1998. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-11
- Fossgreen A.**, Brückner B., Czech C., Masters C.L., Beyreuther K.; 1998. *Transgenic Drosophila expressing human amyloid precursor protein show γ -secretase activity and a blistered-wing phenotype*. Proc Natl Acad Sci 95: 13703-13708
- Fouquet W.**, 2008, *Analysis of synapse assembly in Drosophila melanogaster*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Fouquet W.**, Oswald D., Wichmann C., Mertel S., Depner H., Dyba M., Hallermann S., Kittel R.J., Eimer S., Sigrist S.J.; 2009. *Maturation of active zone assembly by Drosophila Bruchpilot*. J Cell Biol 186: 129-145
- Fu X.D.**, Mayeda A., Maniatis T, Krainer A.; 1992. *General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection*. PNAS 89; 11224-11228
- Fu X.D.**; 1993. *Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins*. Nature 343: 437-441
- Fu X.D.**; 1995. *The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors*. RNA 1: 663-680
- Gabut M.**, Dejardin J., Tazi J., Soret J.; 2007. *The SR Family Proteins B52 and dASF/SF2 Modulate Development of the Drosophila Visual System by Regulating Specific RNA Targets*. Mol Cell Biol 27: 3087-3097
- Garner C.C.**, Waites C.L., Ziv N.E.; 2006. *Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees*. Cell Tissue Res 326: 249-62
- Ge H.** und Manley J.L.; 1990. *A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro*. Cell 62: 25-34
- Gindhart J.G.Jr.**, Desai C.J., Beushausen S., Zinn K., Goldstein L.S.B.; 1998. *Kinesin light chains are essential for axonal transport in Drosophila*. J. Cell Biol. 141: 443-454

- Gindhart J.G.**, Chen J., Faulkner M., Gandhi R., Doerner K.; 2003. *The Kinesin-associated Protein UNC-76 is required for axonal transport in the Drosophila nervous system.* Mol Biol Cell 14: 3356-3365
- Glanzer J.**, Miyashiro K.Y., Sul J.Y., Barrett L., Belt B., Haydon P., Eberwine J.; 2005. *RNA splicing capability of live neuronal dendrites.* PNAS 101: 16859-16864
- Graf E.R.**, Daniels R.W., Burgess R.W., Schwarz T.L., DiAntonio A.; 2009. *Rab3 dynamically controls protein composition at active zones.* Neuron 64: 663-667
- Graveley B.R.**; 2000. *Sorting out the complexity of SR protein functions.* RNA 6: 1197-1211
- Grunau C.**, Hindermann W., Rosenthal A.; 2000. *Large-scale methylation analysis of human genomic DNA reveals tissue-specific differences between the methylation profiles of genes and pseudogenes.* Hum. Mol. Genet. 9: 2651-2663
- Gui J.F.**, Tronchere H., Chandler S.D., Fu X.-D.; 1994. *Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors.* PNAS 91: 10824-10828
- Gui J.F.**, Lane W.S., Fu X.D.; 1994. *A serin kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle.* Nature 369: 678-682
- Hamanaka Y.**, Meinertzhagen IA.; 2010. *Immunocytochemical localization of synaptic proteins to photoreceptor synapses of Drosophila melanogaster.* J Comp Neurol. 518:1133-55.
- Hastings M.L.**, Krainer A.R.; 2001. *Pre-mRNA splicing in the new millennium.* Curr Biol Cell Biol 13: 302-309
- Heisenberg M.**; 2003. *Mushroom body memoir: from maps to models.* Nat Rev Neurosci 4: 266-275
- Hilfiker S.**, Pieribone V.A., Czernik A.J., Kao H.-T., Augustine G.J., Greengard P.; 1999. *Synapsins as regulators of neurotransmitter release.* Phil. Trans. R. Soc. Lond. 354: 269-279
- Hofbauer A.**, Ebel T., Waltenspiel B., Oswald P., Chen Y.C., Halder P.; 2009. *The Würzburg Hybridoma Library against Drosophila Brain.* J Neurogenet 2009: 1-14
- Hurd D.D.** und Saxton W.M.; 1996. *Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in Drosophila.* Genetics 144: 1075-1085
- Huynh N.**, Ma C.T., Giang N., Hagopian J., Ngo J., Adams J., Ghosh G.; 2009. *Allosteric Interactions Direct Binding and Phosphorylation of ASF/SF2 by SRPK1.* Biochem 48: 11432-11440

Literaturverzeichnis

- Inoue E.**, Mochida S., Tagaki H., Higa S., Deguchi-Tawarada M., Takao-Rikitsu E., Inoue M., Yao I., Takeuchi K., Kitajima I., Setou M., Ohtsuka T., Takei Y.; 2006. *SAD: A presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release*. Neuron 50: 261-275
- Jahn R.**, Scheller R.H.; 2006. *SNAREs – engines for membrane fusion*. Nat Rev 7: 631-643
- Jamison S.F.**, Pasmán Z., Wang J., Will C., Lührmann R., Manley J.C. Garcia-Blanco M.A.; 1995. *U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: Characterization of required elements*. Nucleic Acids Res. 23: 3260-3267
- Jang S.W.**, Yang S.J., Ehlén A., Dong S., Khoury H. Chen J., Persson J.L.; Ye K.; 2008. *Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1*. Cancer Res 68: 4559-70
- Jauch M.**, in Vorbereitung. *Die Serin/Arginin-Proteinkinase 79D (SRPK79D) in Drosophila melanogaster und ihre Rolle bei der Bildung Aktiver Zonen von Synapsen*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Jin Y.**, Garner C.C.; 2008. *Molecular Mechanism of Presynaptic Differentiation*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 24: 237-262
- Johnson E.**, Fetter R.D., Davis G.W.; 2009. *Negative regulation of active zone assembly by an SR protein kinase*. PLoS Biol 7: e1000193. Doi:10.1371/journal.pbio.1000193
- Kanopka A.**, Mühlemann O., Petersen-Mahrt S., Estmer C., Öhrmalm C., Akusjärvi G.; 1998. *Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins*. Nature 393: 185-187
- Karachitos A.**, Gałgańska H., Kmita H.; 2010. *The role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease*. Postepy Biochem. 56:174-81.
- Katzenberger R.J.**, Marengo M., Wassermann D.A.; 2009. *Control of Alternative Splicing by Signal-dependent Degradation of Splicing-regulatory Proteins*. JBC 284: 10737-10746
- Kawasaki F.**, Zou B., Xu X., Ordway R.W.; 2004. *Active zone localization of presynaptic calcium channels encoded by the cacophony locus of Drosophila*. J Neurosci. 24: 282–285
- Keller A.**, Sweeney S.T., Zars T., O’Kane C.J., Heisenberg M.; 2002. *Targeted expression of tetanus neurotoxin interferes with behavioral responses to sensory input in Drosophila*. J Neurobiol 50: 221-233
- Keshishian H.**; 1996. *The Drosophila Neuromuscular Junction: A Model System for Studying Synaptic Development and Function*. Annu Rev Neurosci 19: 545-575

Literaturverzeichnis

- Khimich D.**, Nouvian R., Pujol R., Tom Dieck S., Egner A., Gundelfinger E.D., Moser T.; 2005. *Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling*. Nature 434: 889-894
- Kittel R.**, Wichmann C., Rasse T., Fouquet W., Schmidt M., Schmid A., Wagh D., Pawlu C., Kellner R., Willig K., Hell S., Buchner E., Heckmann M., Sigrist S.; 2006. *Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺-channel clustering, and vesicle release*. Science 312: 1051-1054
- Kittel R.J.**, Hallermann S., Thomsen S., Wichmann C., Sigrist S.J. M. Heckmann; 2006. *Active zone assembly and synaptic release*. Biochem Soc Trans 34: 939-941
- Kohtz J.D.**; Jamison S.F., Will C.L., Zuo P., Lührmann R., Garcia-Blanco M.A., Manley J.L.; 1994. *Protein-protein-interactions and 5'-splice site recognition in mammalian mRNA precursors*. Nature 368: 119-124
- Koizumi J.**, Okamoto Y., Onogi H., Mayeda A., Krainer A. R., Hagiwara M.; 1999. *The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs)*. J. Biol. Chem. 274: 11125-11131.
- Kpebe A.**, Rabinow L.; 2007. *Alternative Promotor Usage Generates Multiple Evolutionarily Conserved Isoforms of Drosophila DOA Kinase*. Wiley InterScience DOI: 10.1002/dvg.20374
- Krämer A.**; 1996: *The Structure and Function of Proteins involved in mammalian pre-mRNA Splicing*. Annu. Rev. Biochem. 65: 367-409
- Krainer A.R.**, Conway G.C., Kozak D.; 1990. *Purification and characterization of premRNA splicing factor SF2 from HeLa cells*. Genes & Development 4: 1158-1171
- Krainer A.R.**, Conway G.C., Kozak D.; 1990. *The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites*. Cell 62: 35-42
- Kuroyanagi N.**, Onogi H., Wakabayashi T., Hagiwara M.; 1998. *Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 242: 357-364
- Li Q.**, Lee J.A., Black D.L.; 2007. *Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing*. Nat Rev 8: 819-831
- Littleton J.T.**, Bellen H.J., Perin M.S.; 1993. *Expression of synaptotagmin in Drosophila reveals transport and localization of synaptic vesicles to the synapse*. Development 118:1077-1088
- Lonart G.**, Schoch S., Kaeser P.S., Larkin C.J., Südhof T.C., Linden D.J.; 2003. *Phosphorylation of RIM1 alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses*. Cell 3:49-60

Literaturverzeichnis

- Long** J.C., Cáceres J.F.; 2009. *The SR-protein family of splicing factors: master regulators of gene expression*. *Biochem. J.* 417:15-27
- Lukasiewicz** R., Velazques-Dones A., Huynh N., Hagopian J., Fu X.-D., Adams J., Ghosh G.; 2007. *Structurally unique yeast and mammalian serine-/arginine protein kinases catalyze evolutionary conserved phosphorylation reactions*. *J. Biol. Chem.*, 282: 23036-23043
- Lyles** V., Zhao Y., Martin K.C.; 2006. *Synapse formation and mRNA localization in cultured Aplysia neurons*. *Neuron* 49: 349-56
- Ma** C.T., Hagopian J.C., Ghosh G., Fu X.D., Adams J.A.; 2009. *Regiospecific Phosphorylation Control of the SR Protein ASF/SF2 By SRPK1*. *J Mol Biol* 24: 618-634
- Mahr** A, Aberle H.; 2006. *The expression pattern of the Drosophila vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain*. *Gene Expr Patterns*. 6:299-309.
- Manley** J.L. und Tacke R.; 1996. *SR proteins and splicing control*. *Genes Dev.* 10: 1569-1579
- Marqués** G., Bao H., Haerry T.E., Shimell M.J., Duchek P., Zhang B., O'Connor M.B.; 2002. *The Drosophila BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function*. *Neuron* 33: 529-543
- Martin** M.A., Iadurai S.J., Gassman A., Gindhart J.G.jr., Hays T.S., Saxton W.M.; 1999. *Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are independent and essential for fast axonal transport*. *Mol. Biol. Cell* 10: 3717-3728
- Methew** R., Hartmuth K., Möhlmann S., Urlaub H., Ficner R., Lührmann R.; 2008. *Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome*. *Nature* 15: 435-443
- Miller** K.E., DeProto J., Kaufmann N., Patel B.N., Duckworth A.; 2005. *Direct observation demonstrates that Liprin-alpha is required for trafficking of synaptic vesicles*. *Curr Biol* 15: 684-689
- Misteli** T., Cáceres J.F., Clement J.Q., Krainer A.R., Wilkinson M.F., Spector D.L.; 1998. *Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription *n vivo**. *J. Cell. Biol.* 143: 297-307
- Morrison** D.K., Murakami M.S., Cleghon V.; 2000. *Protein kinases and phosphatases in the Drosophila genome*. *J Cell Biol* 150: F57-F62

Literaturverzeichnis

- Mount S.M.** und Salz H.K.; 2000. *Pre-messenger processing factors in the Drosophila genome*. J. Cell. Biol. 150: F37-F43
- Muchowski P.J.**, Ning K., D'Souza-Schorey C., Fields S.; 2002. *Requirement of an intact microtubule cytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment*. PNAS 99: 727-732
- Nakagawa O.**, Arnold M., Nakagawa M., Hamada H., Shelton J.M., Kusano H., Harris T.M., Childs G., Campbell K.P., Richardson J.A., Nishino I., Olson E.N.; 2005. *Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2*. Genes Dev. 19: 2066-2077
- Nieratschker V.**; 2004. *Identifizierung und molekulare Charakterisierung des Crpk-Gens von Drosophila, das für die Verhinderung von CAST-Aggregaten in Axonen verantwortlich ist*. Diplomarbeit; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Nieratschker V.**; 2008. *Charakterisierung der Serin-/Threonin-Proteinkinase SRPK3 in Drosophila melanogaster und Phosphorylierungsstudien an Synapsin*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Nieratschker V.**, Schubert A., Jauch M., Bock N., Bucher D., Dippacher S., Krohne G., Asan E., Buchner S., Buchner E.; 2009. *Bruchpilot in Ribbon-Like Axonal Agglomerates, Behavioral Defects, and Early Death in SRPK79D Kinase Mutants of Drosophila*, PLOS Genet 5: e1000700
- Oh H-W.**, Campusano J.M., Hilgenberg L.G.W., Sun X., Smith M.A., O'Dowd D.K.; 2007. *Ultrastructural Analysis of Chemical Synapses and Gap Junctions Between Drosophila Brain Neurons in Culture*. Dev Neurobiol 15: 281-294
- Oh Y.**, Nam Y., Jo A., Cheon H., Rhee S., Park J., Lee J., Kim H.K.; 2010. *Apolipoprotein E mRNA is transported to dendrites and may have a role in synaptic structural plasticity*. J. Neurochem. 114, 685-696
- Ohtsuka T.**, Takao-Rikitsu E., Inoue M., Takeuchi M., Matsubara K., Deguchi-Tawarada M., Satoh K., Morimoto K., Nakanishi H., Takai Y.; 2002. *CAST: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and Munc13-1*. J. Cell Biol. 158: 577-590
- Owald D.**, Sigrist S.J.; 2009. *Assembling the presynaptic active zone*. Curr Opin Neurobiol 19: 311-318
- Owald D.**, Fouquet W., Schmidt M., Wichmann C., Mertel S., Depner H., Christainsen F., Zube C., Quentin C., Korner J., Sigrist S.; 2010. *A Syd-1 homologue regulates pre- and postsynaptic maturation in Drosophila*. J Cell Biol 188: 565-579

Literaturverzeichnis

- Pack-Chung E.**, Kurshan P.T., Dickman D.K., Schwarz T.L.; 2007. *A Drosophila kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport*. Nat Neurosci. 10, 980-989
- Papoutsopoulou S.**, Nikolakaki E., Chalepakis G., Kruff V., Chevillier P., Giannakouros T., 1999. *SR protein specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1*. Nucleic Acides Research 27: 2972-2980
- Pellizzoni L.**; 2007. *Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease*. EMBO 8: 340-345
- Prasher D.C.**, Eckenrode V.K., Ward W.W.; 1992. *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene 111: 229-233
- Prokop A.**, Meinertzhagen I.A.; 2006. *Development and structure of synaptic contacts in Drosophila*. Cell Develop Biol 17: 20-30
- Rabinow L.**, Chiang S.L., Birchler J.; 1993. *Mutations of the Darkener of apricot Locus Modulate Transcript Levels of copia and copia-Induced Mutations in Drosophila melanogaster*. Genetics 134: 1175-1185
- Raker V.A.**, Plessel G., Lührmann R.; 1996. *The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro*. EMBO 15: 2256-2269
- Reichmuth C.**, Becker S., Benz M., Debel K., Reisch D., Heimbeck G., Hofbauer A., Klagges B., Pflugfelder G.O., Buchner E.; 1995. *The sap47 gene of Drosophila melanogaster codes for a novel conserved neuronal protein associated with synaptic terminals*. Brain Res. Mol. Brain Res. 32:45-54
- Reiter L.T.**, Potocki L., Chien S., Gribskov M., Bier E.; 2001. *A systematic analysis of human diseases-associated gene sequences in Drosophila melanogaster*. Genome Res 11: 1114-1125
- Richmond J.E.**; 2007. *Synaptic Function*. WormBook
- Rizzoli S.O.**, Betz W.J.; 2005. *Synaptic vesicle pools*. Nat Rev Neurosci 6: 57-69
- Rizzoli S.O.**, Jahn R.; 2007. *Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles*. Traffic 8, 1137-1144
- Robinow S.** und White K.; 1988. *The locus elav of Drosophila melanogaster is expressed in neurons at all developmental stages*. Developmental Biology 126: 294-303
- Roscigno R.F.** und Garcia-Blanco M.A.; 1995. *SR proteins escort the U4/U5/U6 tri-snRNP to the spliceosome*. RNA 1: 692-706

Literaturverzeichnis

- Rossi F.**, Labourier E., Forné T., Divita G., Derancourt J. Riou J.F., Antoine E., Cathala G., Brunel C., Tazi J.; 1996. *Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I*. Nature 381: 80-82
- Roth M.B.**, Zahler A.M., Stolk J.A.; 1991. *A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription*. J. Cell. Biol. 115: 587-596
- Sanyal S.**; 2009. *Genomic mapping and expression patterns of C380, OK6 and D42 enhancer trap lines in the larval nervous system of Drosophila*. Gene Expr Patterns 9: 371-380
- Saudou F.**, Finkbeiner S., Devys D., Greenberg M.; 1998. *Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions*. Cell 95: 55-66
- Schaal T.D.**, Maniatis T.; 1999. *Selection and Characterization of Pre-mRNA Splicing Enhancers: Identification of Novel SR Protein-Specific Enhancer Sequences*. Mol Cell Biol 19: 1705-1719
- Schmid A.**, Sigrist S.J.; 2008. *Analysis of neuromuscular junctions: histology and in vivo imaging*. Methods Mol Biol. 420:239-51.
- Schmitz F.**, Königstorfer A, Südhof TC.; 2010. *RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function*. Neuron 28:857-72.
- Schoch S.** und Gundelfinger E.D.; 2006. *Molecular organization of the presynaptic active zone*. Cell and Tissue Research 326: 379-391
- Shapira M.**, Zhai R.G., Bresler T., Torres U.I., Gundelfinger E.D., Ziv N.E., Garner C.C.; 2003. *Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles*. Neuron 38: 273-252
- Sheetz M.P.**; 1999. *Motor and cargo interactions*. Eur J Biochem 262: 19-25
- Siebel C.W.**, Feng L., Guthrie C., Fu X.D.; 1999. *Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors*. PNAS 11: 5440-5445.
- Snell G.D.**, Reed S.; 1993. *William Ernest Castle, Pioneer Mammalian Geneticist*. Genetics 133: 751-753
- Soba P.**, Zhu S., Emoto K., Younger S., Yang S.J., Yu H.H., Lee T., Jan L.Y., Jan Y.N.; 2007. *Drosophila Sensory Neurons Require Dscam for Dendritic Self-Avoidance and Proper Dendritic Field Organization*. Neuron 54: 403-416
- Sorensen J.B.**, Wiederhold K., Muller E.M., Milosevic I., Nagy G., de Groot B.L., Grubmuller H., Sorensen D.; 2006 *Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles*. EMBO J 25: 955-966

- Stamm S.**; 2008. *Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation*. J. Biol. Chem. 283: 1223-1227
- Stojdl D.F.** und **Bell J.C.**; 1999. *SR protein kinases: the splice of life*. Bichem. Cell Biol. 77: 293-298
- Südhof T.C.**; 2004. *The synaptic vesicle cycle*. Annu. Rev. Neurosci. 27: 509-547
- Sweeney S.T.**, **Broadie K.**, **Keane J.**, **Niemann H.**, **O'Kane C.J.**; 1995. *Targeted expression of tetanus toxin light chain in Drosophila specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioural deficits*. Neuron 14: 341-351
- Tang Z.**, **Yanagida M.**, **Lin R. J.**; 1998. *Fission yeast mitotic regulator Dsk1 is an SR protein-specific kinase*. J. Biol. Chem. 273: 5963-5969
- Tang Z.**, **Kuo T.**, **Shen J.**, **Lin R. J.**; 2000. *Biochemical and genetic conservation of fission yeast Dsk1 and human SR protein-specific kinase I*. Mol. Cell. Biol. 20: 816-824
- Tao-Cheng J.H.**; 2007. *Ultrastructural localization of active zone and synaptic vesicle proteins in a preassembled multi-vesicle transport aggregate*. Neuroscience 150: 575-584
- Tarn W.Y.**, **Steitz J.A.**; 1994. *SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions in vitro*. Gen. Develop. 8: 2704-2717
- Tazi J.**, **Bakkour N.**, **Stamm S.**; 2008. *Alternative splicing and disease*. Elsevier 14-26
- Tom Dieck S.**, **Sanmarti-Vila L.**, **Langnaese K.**, **Richter K.**, **Kindler S.**, **Soyke A.**, **Wex H.**, **Smalla K.H.**, **Kampf U.**, **Franzer J.T.**, **Stumm M.**, **Garner C.C.**, **Gundelfinger E.D.**; 1998. *Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals*. J. Cell Biol. 142: 499-509
- tom Dieck S.**, **Altrock WD.**, **Kessels MM.**, **Qualmann B.**, **Regus H.**, **Brauner D.**, **Fejtová A.**, **Bracko O.**, **Gundelfinger ED.**, **Brandstätter JH.**; 2005. *Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex*. J Cell Biol. 168:825-36.
- Tully, T.**, and **Quinn, W.G.**; 1985. *Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster*. J Comp Physiol A 157, 263-277.
- Umbach J.A.**, **Zinsmaier K.E.**, **Eberle K.K.**, **Buchner E.**, **Benzer S.**, **Gundersen C.B.**; 1994. *Presynaptic dysfunction in Drosophila csp mutants*. Neuron 13: 899-907

Literaturverzeichnis

- Wagh D.A.**, Rasse T.M., Asan E., Hofbauer A., Schwenkert I., Dürrbeck H., Buchner S., Dabauvalle M., Schmidt M., Qin G., Wichmann C., Kittel R., Sigrist S.J., Buchner E.; 2006. *Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in Drosophila*. *Neuron* 51: 275-275
- Wairkar Y.P.**, Toda H., Mochizuki H., Furukubo-Tokunaga K., Tomoda T., DiAntonio; 2009. *Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling*. *J. Neurosci.* 29: 517-28
- Wan Y.**, Sun M., Wang S., Liu L., Yuang I.; 2008. *DX16 is a novel SR protein phosphorylated by DOA*. *Moll Cell Biochem* 307: 177-183
- Wang H.**, Lin W., Dyck J.A., Yeakley J.M, Songyang Z., Cantley L.C., Fu X.; 1998. *SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells*. *J. Cell Biol.* 23: 737-750
- Wang H.Y.**, Arden K.C., Bermingham J.R. jr., Viars C.S., Lin W., Boyer A.D., Fu X.D.; 1999. *Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in human and mouse chromosomes*. *Genomics* 15: 310-315
- Wang Y.**, Okamoto M., Schmitz F., Hofman K., Südhof T.C; 1997. *RIM: a putative Rab3-effector in regulating synaptic vesicle fusion*. *Nature* 388: 593–98
- Wang Y.**, Liu X., Biederer T., Südhof T.C.; 2002. *A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: implications for the genesis of synaptic active zones*. *PNAS* 99: 14464–14469
- Wichmann C**, Sigrist S.J.; 2010. *The active zone T-bar--a plasticity module?* *J Neurogenet.* 24:133-45.
- Will C.L.**, Lührmann R.; 2001. *Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*. *Curr Op Cell Biol* 13: 290-301
- Wu J.Y.** und Maniatis T.; 1993. *Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing*. *Cell* 75: 1061-1070
- Yeakley J.M.**, Tronchère H., Olesen J., Dyck J.A., Wang H.Y., Fu X.D.; 1999. *Phosphorylation Regulates In Vivo Interaction and Molecular Targeting of Serine/Arginine-rich Pre-mRNA Splicing Factors*. *J Cell Biol* 145: 447-455
- Yeh E.**, Gustafson K., Bouliane G.; 1995. *Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in Drosophila*. *PNAS* 92: 1036-7040

Literaturverzeichnis

- Xiao** S.H und Manley J.L.; 1997. *Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing*. Genes and Development 11: 334-344
- Xiao** X., Lee J.H.; 2010. *Systems analysis of alternative splicing and its regulation*. WIREs Syst Biol Med 2 550-565
- Xue** M., Lin Y.Q., Pan H., Reim K., Deng H., Bellen H.J., Rosenmund C.; 2009. *Tilting the balance between facilitatory and inhibitory functions of mammalian and Drosophila Complexins orchestrates synaptic vesicle exocytosis*. Neuron 64: 367-380
- Zahler** A.M., Lane W.S., Stolk J.A., Roth M.B.; 1992. *SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors*. Genes & Development 6: 837-847
- Zahler** R.G., Neugebauer K.M., Lane W.S., Roth M.B.; 1993. *Distinct functions of SR proteins in alternative pre mRNA splicing*. Science 260: 219-222
- Zahler** R.G. und Roth M.B.; 1995. *Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites*. PNAS 92: 2642-2646
- Zampighi** G.A., Fain N., Zampighi L.M., Cantele F., Lanzavecchia S., Wright E.M.; 2008. *Conical Electron Tomography of a Chemical Synapse: Polyhedral Cages Dock Vesicle to the Active Zone*. J Neurosci 28 (16): 451-4160
- Zanazzi** G., Matthews G.; 2009. *The molecular architecture of ribbon presynaptic terminals*. Mol Neurobiol 39: 130-148
- Zhai** R.G., Vardinon-Friedman H., Cases-Langhoff C., Backer B., Gundelfinger E.D., Ziv N.E., Garner C.C.; 2001. *Assembling the presynaptic active zone: A characterization of an active zone precursor vesicle*. Neuron 29: 131-143
- Zhai** R.G und Bellen H.J; 2004. *The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal*. Physiology (Bethesda) 19: 262-70
- Zhang** X., Poo M.M.; 2002. *Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon*. Neuron 36: 675-88
- Zhen** M., Jin Y.; 2004. *Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly*. Curr Op Neurobiol 14: 280-287
- Zinsmaier** K.E., Eberle K.K., Buchner E., Walter N., Benzer S.; 1994. *Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of Drosophila*. Science 263: 977-980

Literaturverzeichnis

Zinsmaier KE, Babic M, Russo GJ.; 2009. *Mitochondrial transport dynamics in axons and dendrites.*

Zinsmaier KE. 2010. *Cysteine-string protein's neuroprotective role.* J Neurogenet. 24:120-32.

9. Abkürzungen

ASF-1,2/ SF2	alternative splicing factor 1,2, splicing factor 2
ATP	Adenosin-Triphosphat
BRP	Bruchpilot
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
CAZ	Cytomatrix at the active zone
cDNA	komplementäre DNA
cm	centimeter
CSP	Cysteine string protein
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dd	doppelt-destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EJP	excitatory junction potential
et al.	et alii
g	Konstante für Schwerebeschleunigung der Erde
GFP	Green fluorescent protein
H ₂ O	Wasser
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
M	Mol
m	milli
MAK	monoklonaler Antikörper
μ	mikro
mEJP	miniture excitatory junction potential

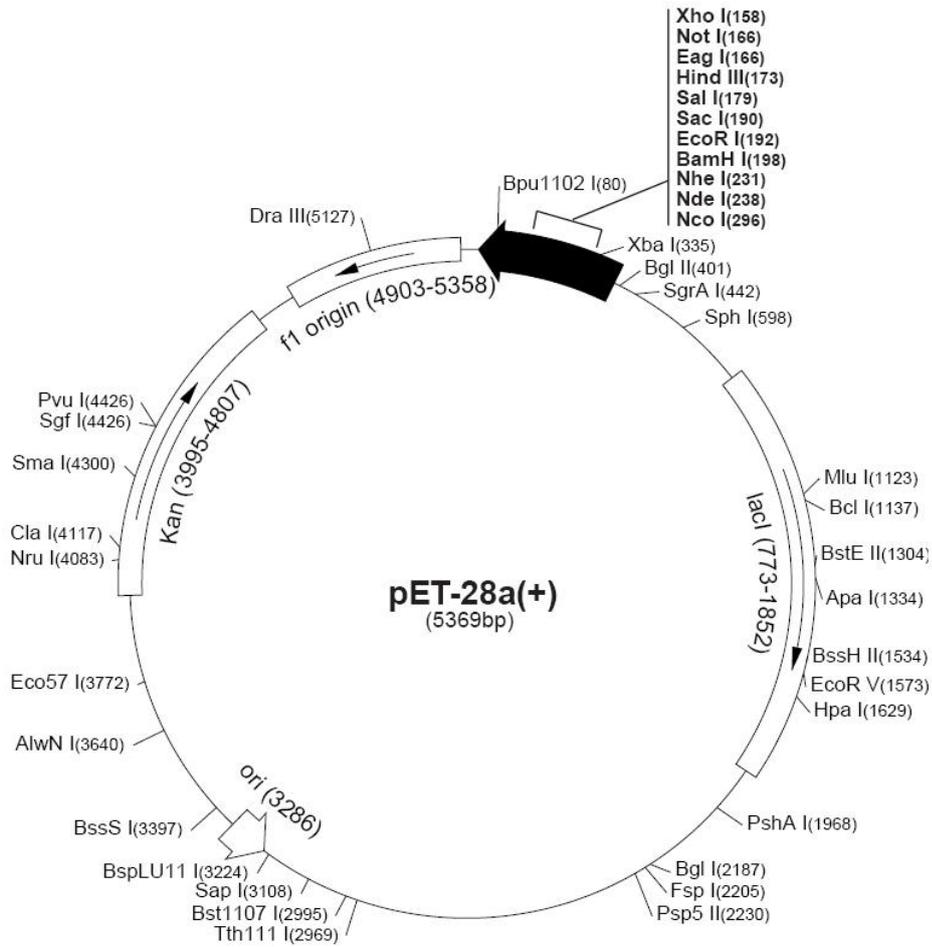
Abkürzungen

min	Minute
mol	molar
mRNA	messenger RNA
ORF	open reading frame
PSD	post synaptic density
PTV	Piccolo-Bassoon transport vesicle
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	rounds per minute
RRM	RNA recognition motif
RT	reverse Transkriptase
S	Serin
SAP47	Synapse associated Protein of 47kDa
SDS	Sodiumdodecylsulfat
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
sog.	sogenannt
SRPK	Serin-/Arginin-Proteinkinase
Syn	Synapsin
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
Ura	Uracil
U2AF	U2 auxiliary factor
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

10. Anhang

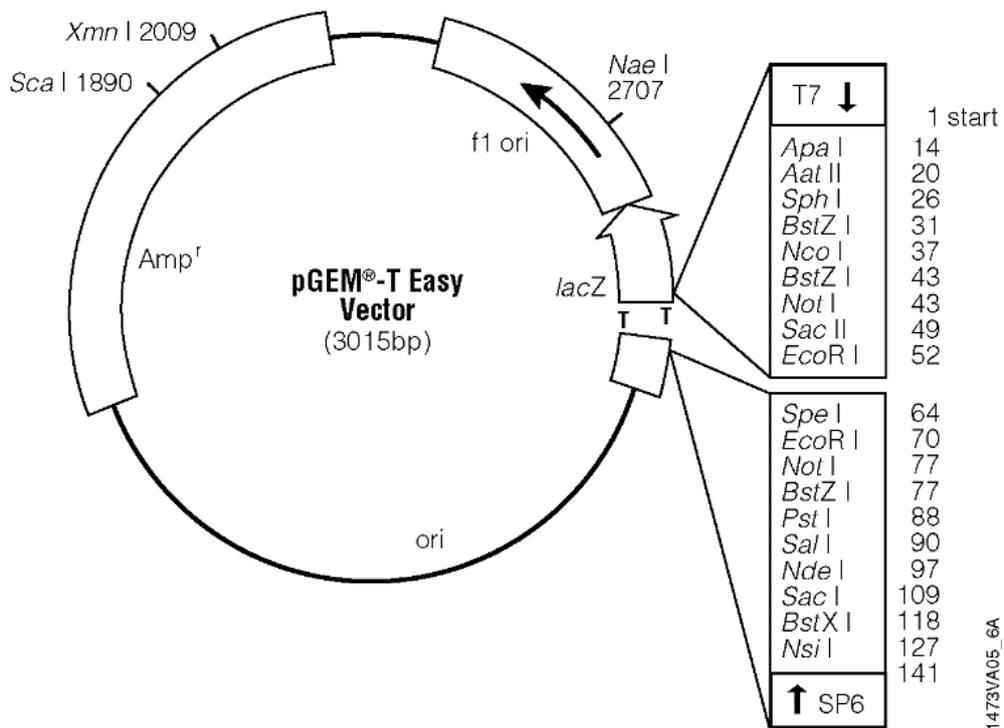
10.1. Vektoren

10.1.1 pET-28a-c(+)



Quelle: http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET-28_a_%28+%29.htm

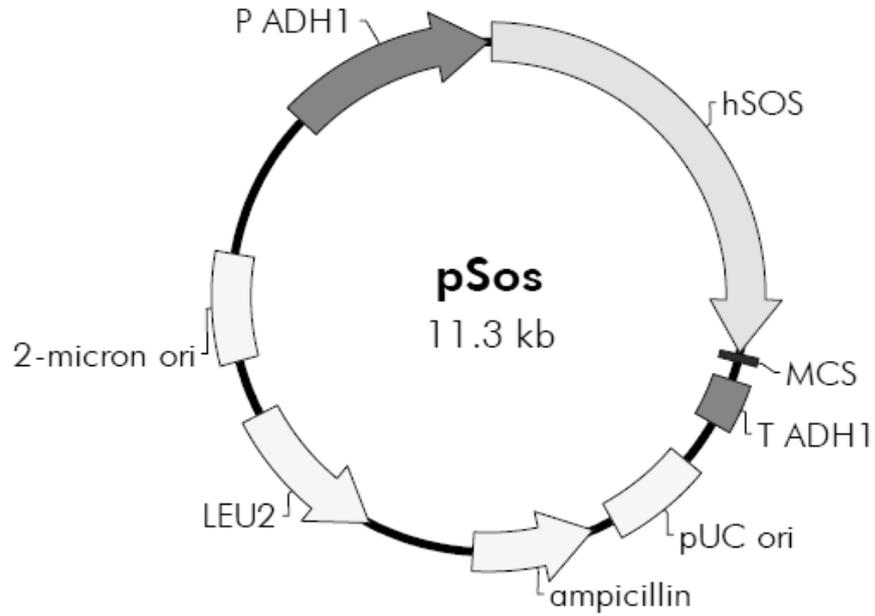
10.1.2 pGEM-T easy Vektor



Quelle: <http://www.promega.com/paguide/chap13.htm>

10.1.3 pSos Vektor

pSos Vektor



pSos Multiple Cloning Site Region (sequence shown 3201? 299)

^{end of hSos}
 CCA AGG AAA ATT AGT TAT AGT AGG ATC CCC ATG GCC CGG GCG ACG TCG ACG...

BamH I Nco I Srf I Aat II Sal I BssH II
 | | | | | |

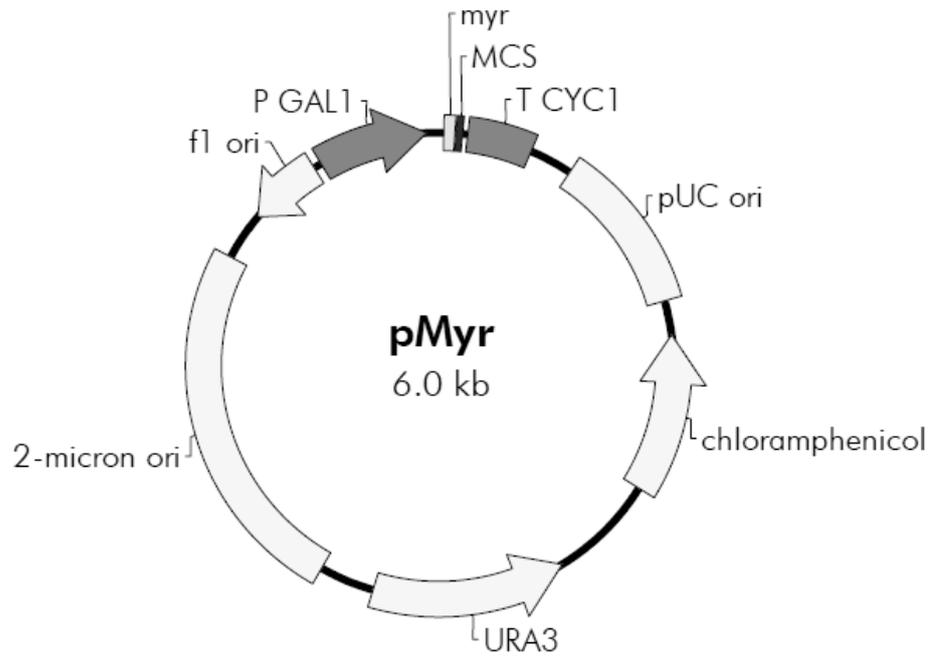
... CGC GCA CGC GTG AGC TCG CGG CCG CCG CGG TTA ATT AAT TAA TTA ACC

Mlu I Sac I Not I Sac II Pac I Pac I
 | | | | | |
 [] [] [] [] [] []
 STOP STOP STOP STOP STOP STOP

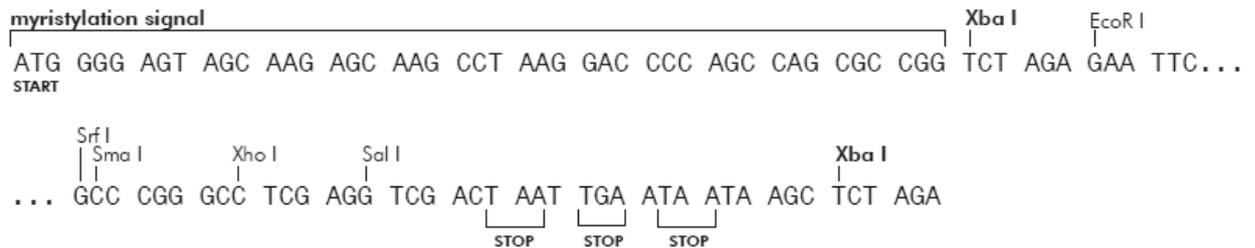
Quelle: www.ebiotrade.com/buyf/productsf/stratagene/

10.1.4 pMyr Vektor

pMyr Vector



pMyr Multiple Cloning Site Region (sequence shown 22? 20)



Quelle: www.ebiotrade.com/buyf/productsf/stratagene/

10.2. Genomische Region des *Srpk79D*-Gens

Nicht translatierte Exon-Bereiche sind hier **hellgrau** dargestellt, Exons sind in **rot** dargestellt, Introns in **schwarz** und die Kinasedomäne in **violett**.

22191287	GAGAGTTCGA	GCCAAGTGCG	GACAAAGAAG	ACTTTTCCGT	GCTGCTGCTT	CTGCCAAAAA
22191347	CACAAAGTGG	AAAATGTGAT	GTGTTTCGCTT	TATTTGTGCGA	GGATAAATCA	ATTCCGCTAT
22191407	TAACTAGACT	ACGGGCACGT	ACCTGGCCAA	AAGCATCGAA	GAAAGGCGAA	AGGGAATCCA
22191467	ATAGGCCCAA	TTGAGGGCAG	ACCGTGGAAA	AACCCTCTTC	TATCGCGAAC	CAGTTCGTGG
22191527	CAGTGTGTGC	GTGCGTGTGT	GGATTTTCGC	CTTACTTTTT	TCATGCGCAA	TTTGGGTTAC
22191587	AAAGCGAGAA	AAGCGCTGCT	TAAAATGCAT	GTTTTAAGCG	CGTCCCTTCA	TTGATTTTCC
22191647	TACGCACAAG	GAATGATATA	CGAAGTCCTC	ACCAGGAACA	AAGGGCGCAG	GCCAACGATG
22191707	AGGACAAAAG	CGCGAGGAAG	CTGCTTCTAG	CTTCCCAGCA	TTCATTAGGA	CAGGGCGAGG
22191767	ACCAGCCCCG	CGCAGATCAG	GAAACTCATC	CCGGGAGGCA	TCCTGGCTCC	CGTACTGCCC
22191827	AGTAGCGGCA	TGGCCGGCCT	CATCGGTGCC	GCAAATGGCA	AACACCACCA	CCCACACCTC
22191887	ATCTCGCCCA	CCCACACGTC	ACTGCCGGCC	GGCATATGTA	GTAGTGACAG	CGGCATCTCC
22191947	ACTTTGAGTG	CCATCTCGCC	GCCACTCTCC	ACCTCGACCA	CCACGGCCTC	CGGTGCAGGC
22192007	GGAGGAGTGG	GCGGCAGCCC	TCAGCTGCGC	ACCTCACCTG	CGCTGAGTAT	GCTGGGTAGC
22192067	GCCACGGCGA	CGGCCAGCGG	CGTTACCGCC	TCCTCAGGAT	GCGGTCTAAC	TGCCGGGATC
22192127	CTGGGCCCGG	CGGCCAGCAT	TGACCTGGGC	AGCTCGCCGC	TTTCTCACCG	AAACTACAGC
22192187	AACTCACTGA	AGGGCTTTAG	TTTCCGTGCG	AGCTTCGACG	ACAAGATCAT	CAATACGCCG
22192247	TACTTGTGCG	GCGCTCCAGC	CTACACCCAC	GGCATTCCCT	ATCCGCATTT	TCACGGTACT
22192307	CAGCCTGCGG	CCACCAGGCC	GCACCACCTC	CACCTACACC	ACCATGGGAA	CGGCACAGCT
22192367	GCGGGATCAG	GTTCCGGTGT	GGGATCGGGA	CCGGGATCTG	GCAGCGGTGC	AGGAGGACTC
22192427	TACCAGCAGC	CTCTGTGCGT	GGCCTCGATG	ACAGCGGCC	TGCCACTGGC	TCCGCTCTAT
22192487	GGATCCCCGC	TGTCCCTGCC	GCTGACCTCC	TCTCAGTCCA	CCACCAAGCT	CTCCTACCGC
22192547	GACGACTTTC	TGCAGCAGAT	TGGCTATCTG	CCAACTACGC	GCATCTACAG	CACCCCGACC



Insertionsort des P-Elements P487/16

22192607	AGCATCGTCG	ACGAGGACAA	GGCCCAGCA G	GACTTCCTCT	CGCTGTGCTT	GTCGCCGCCG
22192667	CTCAACCGAC	GGCGGGATAT	GCCGGCACTG	CGCGGCCCAT	TCGTGAGTCT	GTAAGTACTT
22192727	CATCGATATC	GTTGTCCCTA	TTTGGTAAAA	CATTTTTATT	GTGCTATAAA	ATTAATATAA
22192787	GAATTTAGTA	TATATTTCTA	TTTTCGGCTA	CAAATACCAT	ATTTGCCAAT	ATTATAAGAT
22192847	AAACTTCCTT	CGATCACTTC	ATGATCACTT	GAACACTTCA	TCTTCAAAAA	AAATGTTCTT
22192907	GACATGAACT	GACACTGAGA	CATGATCAGA	AGATCAGGAT	CTTTTAACAA	ATAGAGCTGG
22192967	GCGTGTCCGT	CCGTCCGTAA	TTTTGTATAA	AGTTCGACCA	CACGTTTATT	TCAAGACGTG
22193027	TTCATGACGG	ACTACTAGAA	ACGTTAACTA	ATACTGCTCA	TTGGAAAGCG	ACGTCTCTTT
22193087	AACGCTTTTC	TGTTAAGATA	TCTCAACTCA	ATCTCTCAAC	TGAGTAACGA	AGTAACTCGA
22193147	CCAAATGCAT	TTAATTTGTA	TTGACAAAAT	GGTATTAGGT	TCCATTTCTG	AGTGACACAG
22193207	TATAAGCCTG	TAATGTAAAT	AAAAATATAA	ATTGACAATT	AATGAAATAA	TATTAAGGGG
22193267	CATACCAGCT	TCGACTTAGT	AAAGTAAGCT	TTTTTCCAGT	TTTCTTTCCC	ATCACTCTCA
22193327	TGCGGATAAA	ATATGAACAT	AAAGTATACG	CCGCGTGTAT	TCCACGTGTC	TCTCACAGGC
22193387	AGGAAATAAA	TTTATCGAAC	CGTAACGAGC	TGCTCCAATA	TGTGAGCCGT	TGGGGATGG
22193447	CCTCACTATT	CGCGTTCCCA	CTGTGCGGGC	ACAGTGGGCC	TCATTGTTGA	CGCAACCCAT
22193507	TAGTTCGATA	CCCTTCGCCA	CACAGTGTGC	TTATCCCGAA	TGGGATGTGA	TTCCACACAC
22193567	TACATACTTA	CTTATGTGGT	CCAGTTTTTT	CGACAGTGGT	ACCAAGCAAA	CTTTACCTCC
22193627	TGCGTCCCAT	AATCCTACAT	CGATCCCCCC	GCATGAGTTC	TTCCATTGAG	TCCGCTCGGT
22193687	TTGTTTACGT	TTTAAATTTG	CCCTAACCGC	AAGTAGGCAC	CACGTGACGC	CAGTGGCTAA
22193747	CCAATGAGCA	CCCCAACCC	AATCACCAAC	CTCCAACCC	CAGCGCATCC	CCGCAATAAC

Anhang

22193807	ACAAACTCAC	TGCAATCGAG	CAAACGATG	ACGTTTTACT	GCCTCTGGCT	GCTCTGTATT
22193867	CGCACTGATT	TTCTAGCCGA	CTTATTGTTT	TCATTTCGCTT	CTTTTCGGCGT	CTATAAATAA
22193927	TAATTTTATT	GTGTTGTGCG	GGGGGGGGGG	GGGTTTGGTG	GTGGTGTGTG	TATGTACGCC
22193987	GAGTAGAGCG	CGTTCGTGTG	TCAGAAATAG	GGTGACTCAA	GATGTCAGCA	AGCTTTTCCT
22194047	TCTAAAGAAA	TCGCCATGGC	TCCATAAGGA	TCAACGGCTG	ACTCAAGTTG	GGAACGGGGC
22194107	TGCAAAATCA	ATAAGGCCGG	TTAGTCCCAA	TACGAACTCA	CACATTTGCA	TATTGTGCAG
22194167	GCGGCGGACG	GAACTGCAGT	TGCATTGCGA	GGAATTTTTT	AATCGCACCT	AATCGCTCGA
22194227	AACTACCTTT	CGAAGTGTTT	TCGAAACCTT	TTGGAATTCG	AGGTATTTCG	AATCCTGCCT
22194287	GTCGAACACC	CCTCTGCACG	GCGGAGGGAA	AATTTGGCAA	GATGCCTAAG	AAATCTCGAA
22194347	GCACTCGATG	ATGACGATGA	TGTTGACGGG	CATGGCCCCG	CATGAGTGTG	TGCTCATTTG
22194407	GTGGACTCTT	TCCTGGTGTA	GTGCAGTCCA	TGACCGGCAA	AGGCAGCGAA	CAACGAGCAG
22194467	CGCCACGACA	TCGACTTGAT	GAAGTACATT	GGATAATGAC	GCCAGCAAAA	TACACGGCGC
22194527	ATAAAATTAT	TCATTTACAA	AATATCCAAC	TTTTTTGAAT	AAGTATTTCT	CATCAGAATT
22194587	GCCCACAAAG	CAACCATTTT	ATACTCAGTA	AAAAAATATT	TATATACGAA	TACACCTGTC
22194647	TTTCAGTTTT	TATTTAGTTA	TTTACGAAGC	CACTAAATTA	CGATCCTGTA	AAGTAGAAGG
22194707	TATCTGTTGG	CCAAAGACTG	CGACCTAACT	GCTTTGTAAG	GAAGTGTTC	CGCAGTGTAT
22194767	CACTCTAAGG	AAAACATATG	GCGGGCATGG	GTTCTAGGTG	ATCCACACAC	CTCACCCCTT
22194827	GCCGACTGTG	GAGCGGGCGA	AGACTAAACT	TAGTTGTGAC	AAAAAAAAAA	AAAGAAACAA
22194887	AAAAGCAGAA	CAGAAATACT	CGCGAGTTGG	AAACGGCTGC	GCCTTGCCCG	CTCAGGAAGA
22194947	GGCGGCAAAA	ACAAAAGCGA	AAAGCCATTC	CGACATTCTC	GCGGACGCAA	CTGAACGAAT
22195007	CGGACGAGCG	AGGAAAGATA	CTCGCGCAGA	TACAGATACA	GATACTTTTC	ATATTTTCAGA
22195067	TTTTCCGCCG	TGCGATATAT	TTTATTTTAT	TACCCCGCTC	GGGCCACTGT	TATGTAAGGA
22195127	GAGTGTGTGC	AGCGTGGTGT	TTGTGTTTCGA	CCAAACTCGT	TCGGCGGTGT	CCGTGATGCA
22195187	AGTGGGGGTC	TACGAAAGTC	AAGGTCGCCA	CCCCCTACAC	GCACGCCCCAC	AGCCATCCCC
22195247	TGTTACTGCG	CCCAGTTGCC	ATGAATTCGC	GAAGGTCTAA	TCGGAAATCC	AATTGTTCGAA
22195307	TCGAGCAGTG	AATCGAATCA	GAAATGGATG	ACTTTGGCTC	GACCGCATCC	GACTTGGAAG
22195367	AGGCCACCTG	CCCCATGCAG	GCCAATGCCA	CGTTCAGCAT	CGATTGGCGA	GTGACCCTGC
22195427	TGGACCACTG	GTTGGATCTC	TATCTTGGCT	ACATGAACCG	CCTACACATG	CTGCTATCAC
22195487	TAGCCGGCAG	GCTGCATCTT	CTAAGCCGGC	ACATCCTGGG	TACTCTCGGC	CAGGATCCGA
22195547	TTTTTATGGG	TGTGCTGCAG	GGCAGCCTGT	TAATGCTCTT	CCTCTTCCTG	ATGCACCTGC
22195607	TGCGGCTGTG	GAGCTGTGGA	TACGCAGTTG	AGCGGCCGCT	GAACCCCACT	CCGGACGTGG
22195667	CAAAAGAGCT	GAGCTGCGAC	TTCAACTTCG	TCTCCGAGCA	AGAGAAGCGA	GCTGCCCAAG
22195727	AAGCCGCGAC	GGAGGCTCTG	CTAGAGGTTG	AGGAGAAGAA	GCGCCGCAAG	CGGTTTACAA
22195787	AGAAGCGCAA	CTGCGTGTCC	GCCGGGCCGA	TCCTTATTGC	CTTGCGCCAT	CAGTCTAAGC
22195847	GACCAAAGCA	CCATCGTCAC	GCTGCTCTAC	CCTTTGAGCC	CGTTACCCCC	GGGAAATAA
22195907	TCCTGGATAC	CTACTTGCCG	CCGCGGGAAC	TGCCGCTCAC	GATAAGACTG	CCTCAGTTGG
22195967	CGGAGCCGGT	CAAGGAAGAG	GAAGTCGAAT	ATATCGAGCT	TAAGTGGGTT	GCAACGGGAA
22196027	TTCTCACAGA	GTTTACATTT	TAAAACATGT	ATTGTTCCCT	GTCAACTAAT	GGCCAAACCT
22196087	TTTTTTCTTT	ACAGATCGGA	GCCCCGGGGG	ACCCTCAGTA	CGACCGACGA	AATTTACCCG
22196147	GATTTCGTCCG	ACAGCAGTCT	TTACGTTTCA	GACGAGGAGC	AGGAAGACGC	CTCTCAGTAT
22196207	TGCCGCGGTG	GATACCATCC	AGTAGTCATC	GGAGACATAT	TTGACAACCG	GTTTCGAGTG
22196267	GTCAGAAAAC	TGGGCTGGGG	CCATTTTTTC	ACTGTCTGGC	TATGCCGGGA	TCTCAAGTAT
22196327	GTGATGAAAT	GTCGAACTTA	CCATAAAACA	AGCTCTTTCA	AACTTCATGC	TTTCCCCAGA
22196387	GATGAGAAGT	ACGTGGCCCT	CAAGGTTGTT	AAGAGTGCTC	CGCATTACAT	AGAGACGGCA
22196447	GCGGACGAGA	TCCGGCTCCT	GGAAGCTATC	CGTGACGCAG	ACCCCATGGA	CGTTAAGCGG
22196507	GAGAGGATCG	TGCGGCTGAT	GAACCACTTC	ACTGTGCGCG	GTGTGAATGG	AATGCACACC
22196567	TGCCTGGTTT	TCGAGGCCCT	GGGCTGCAGC	TTGTATAAGC	TGATAGTGAA	GAACAACACT
22196627	CAGGGTCTGG	CCATCGCTCA	GGTGCCTAAC	ATAATCCGCC	AGGTTTTTGA	GGGACTGGAC
22196687	TACCTGCACA	GCAAGTGTAG	CATCATAAC	ACGGACATTA	AGCCGGAGAA	CATCCTGCTG
22196747	GTGATCGATA	ATGCCGCCGC	GATGAACCAG	CAGATCGACG	ATGAGATCAA	CAGTCTGCGC
22196807	GTGAAGGGTG	TCGACTTCCC	CGACTCGTAC	AGTGAGTATC	AGTATCCAAG	TTGAGTTGCC
22196867	AATGGCTAAT	GCGTTCCACC	CTTAGTCAGC	TCCATCGAGA	AGCAGACCAA	GTCGCGGGCC
22196927	AAGTGCCAC	TGATCGAGCC	AAATGGATCG	ACCAACACCA	ACACTAACAC	TAGCAATAGC

Anhang

22196987	ACGGCGACCA	ATTCCAATTC	GTCGACTCCG	CTGGCCGCCG	TGATCATGTC	CACGCTGGAC
22197047	AAGGAGGACA	CCACGACAAC	CACCTCGTCC	ACGCTCAATT	CCAACACCAC	ATCATCGCTG
22197107	GCCTCCAAGT	ACTCCAGTCT	GTTGGGGGAC	AGCGAGTGCA	ACGGAGGCCT	CGGCGGATCA
22197167	GCGAACATAA	ACAACCGCTA	CCGAACGGAG	AAGAAAATCA	CTGCCAAGGT	AAGATTGCTT
22197227	TCAAACAGGT	CGCCCCTGCC	CCACACTCGA	AAGCACTGGC	CAGGATTACA	TATACGTTGT
22197287	GGTGTGCATG	GAAAGCATTT	GCACTCTCCA	CATTGTGAGC	CCACCTGCAA	ACACACACTG
22197347	CACACCAAAG	GAACACGAAA	TTCTTACGTT	TTACTTTTGT	TTCATTTTAT	TTTCGCGTTA
22197407	TCTTTGCCTT	TGGTTTGACA	CTCGTATCAG	TCTTCTGGGG	ATTGCGACGA	AGATGCCGAG
22197467	TCCGACACGC	TGGGCGAGCA	GAGCACCTTG	GCGAGCACCA	TGGATTGCGC	CACCGATCTC
22197527	GATCCCGAAC	CCGAACTCGA	TTCCAAGCCC	AACACCGTAC	CCGAGCCAAG	TGAAGGACCG
22197587	ATCCCAGAGG	TAAAGTGGGT	TGGATGCGGG	ATAGTTGTTA	GTGATAGCCC	GGTCATTAGA
22197647	AAGAACCCTG	GGATAATCTG	TTCCACTTTG	GATTATATGT	GTTGTTATTT	GGGGGCAAAT
22197707	CCGCCTCTCT	GCTGTTTACT	TAACGTTTTG	GATTATCGCT	TTTCGTTTGA	ATTTGTTGTC
22197767	TCTCAGCCTC	ACACACACTT	AACCCACATG	CTTTTTCAAG	GCAATTATTT	CCTGGATCGA
22197827	AACGCCAAAT	GCTTGATTGA	TTGTGGGCAT	GGCCATCTTT	TTATGTGTCT	GTAACGGGTT
22197887	CTTGTCATGT	GCTTAACGTT	TGCATTGCTA	CCTGCTAATT	GCATACACAT	CTTATTGGTG
22197947	TTCTCATGGA	TCTGTGGCTA	CAGAAGTGAA	AAAGTCAAAA	TGGTTCTAAA	AATAATGATA
22198007	GCTATTTGTA	ATTTTCGAGA	TAAGATAAAA	CGCCATTGAG	TAATGTACAG	TGAATTATGC
22198067	ATAAATTATA	AATGTATATG	TTAATAGATT	CGCAATGCAT	CATACTTTAA	ATTTAAATTA
22198127	ACATTTTACC	CTATTTGTTA	TTAGCTACTC	ACAATAGAAA	TGAATTCCAT	TGAACTTCTT
22198187	TGGCCACACC	TACATATATG	ATTGAAATGT	GTTTAGGCTA	AAATGTTTTT	ATTGTAACCT
22198247	ATTATTGTAG	AGGCATTTCT	ATATTAACC	TCCAGTGGCA	TGTCCAACCTC	AGCATATCAC
22198307	TGGGAGAGTA	ATCCGTGGCA	ATCACCGCTA	GGGTTTCGAC	ACGCAATCCG	AGCGTTGACT
22198367	GCCACGTCGT	TTGTGTTTCG	TTAATTGCAC	CAACTAGATA	AACCTTCAAAA	GAAGCAAACC
22198427	AACATTGTGT	ATTCTTTTTT	TTCCTTTCTT	TGTGTGAACC	AATTTACATG	TATGCAACAC
22198487	ACTGCTATAC	AAACACGATG	CAGCAGCCCA	CCCCGAACCTC	CACCAATAGC	TCCTGCCCTT
22198547	CCCACAACAC	AGCCACGATA	GCTAAGTCCA	AGATCAACCTC	GAATATTCTG	AGCACGTGCA
22198607	CGTCCCTTGAC	ATCGACCAAC	GAATACTGTT	TCACCAACAC	GAACACCACA	ACAGCCTCCA
22198667	CACCAAGTGC	CCCTCCAAGT	GCCACTCCTT	CCTCCGCCCC	TGCCTTAGCC	TCTGCCACGC
22198727	CCCCCAGCAC	GTGCACGCC	TCGTTACGC	AAATAGCTCC	TTCTGCAACA	GCTCCGGCTA
22198787	CCAGTACAAC	CTGTACAACA	TCAGCCGAGT	TCTATGATGG	CGATCATAAA	ACAACAAGCA
22198847	CATCAACAAC	AACAACATCC	AATGCGATAT	CCTCCGCAAC	AACAACAACC	GCGACAACGA
22198907	CAACAGCAAT	CGTAAACTA	AATGTCCATG	CTAATGCCAT	TCCTTCGCAG	AACCAGAGTC
22198967	AGAGTAGCCA	GAACAACACC	TACACGATCC	AGTCGCTCAT	TGACAACAGC	AACGTTCCGG
22199027	TAAAGATCGC	CGACTTGGGG	AACGCCTGCT	ACGACGTGAG	TATCCTTTTA	GATGCTTAAA
22199087	GCTTCAAATA	TATATATTTT	CGCGTCAGAT	AAACACATCA	TCATGATTTT	ACTCGTAGAT
22199147	TATGACTCAG	TATGACTCAA	TAAAGTATAT	ATGTATGTAT	ATTCATAATC	AGGAATGCAA
22199207	ACTAGAAAAT	TTCAATATCC	AAAATTGTTT	TATTTGCGCG	TGGCAGTTTT	GATTATTGGC
22199267	AACATCTGGA	ATCAGCCTAA	TCTCAACATT	CGAGCTTTTA	TAGGTCCTGA	GATCGAGTAG
22199327	TTCATACGGA	CAGAAGAACA	AACGAACATG	GCTATATGGC	ATCCAAAATA	ACACTTCACT
22199387	CTACCTGTTA	CATACTTTTC	AATGATTCTA	GTGAACCCTT	TTACTTTACT	TTAAAGGGGG
22199447	TATGGAGTTA	TTTGTACTTT	AGATTCTTCC	GATTCGGTAT	AAACCAATTT	TTTGCCATTA
22199507	TTCTATTACG	GTTTTTATTT	TATTAGAATG	GGACCAATTG	TCTATAGAAA	ATGCAAATCA
22199567	GAAAATTTCA	AGAAATCAGG	TCTACCTAAA	TAGTGGACGT	GGGAGGGATA	ATTTTCCGAA
22199627	TTGAGGGCGT	GACAGTTTTT	TGTGGTTTTGT	AGGCATTAGA	GTGGGCAAAA	TGTTTTGGCA
22199687	TATCAATAGA	AATTGCAAGG	CAGAAGGACA	TGGCCAGATA	AACTCTTCTA	GTAATCCTGA
22199747	CCGAGAATAT	ATACCTTTTA	AGGTCGAAA	CACGACCCCG	CACATGGTTT	TCAAAAGTAA
22199807	TAAGTCCGTT	TTCCGGCTTT	TATGAATTCT	CAGTACCATC	ACTTTACTGA	GGACATTAG
22199867	ACTCGCCAGT	ATCGATCAAT	CGAGGTTCTT	TTGGGAGCGC	CGTACAATTA	TACCGCCGAC
22199927	ATCTGGAGCA	CAGCCTGTTT	GGCCTTCGAG	CTGGCCACCG	GCGACTACCT	GTTGACCCTT
22199987	CACGCCGGAG	AGTCTTACAG	TCGGGACGAG	GACCACTTGG	CGCATATTGT	GGAGCTGCTG
22200047	GGCTCCATAC	CGCAGTCGGT	GATCTTCCGC	GGTAAGCAGC	GGCTGAAGTA	CTTACCAGC
22200107	TATG GTAGGT	ATCAAATCGA	ATTTAGCTCA	AGGAATGGTG	TGTGATGTGT	GACCCCTGTT

Anhang

```

22200167 GATTCCCATT TGCAGGTAGC CTGAGGAACA TCACCAAGCT GAAGCCCTGG AGTCTAATGA
22200227 ACGTGCTGGT GGAGAAGTAC GACTGGGACC CGGTGGAGGC CAAGAAGTTC TCCGACTTTC
22200287 TGCTGCCCAT GCTTGAGTAC AATCCGGTTA TACGGGCGTC GGCAGCGGAG TGCCTGCAGC
22200347 ATCCGTGGTT GGAGCAGGAG GAGTTCGTCT AAGAGGCTCA TGGAGTGACT AGACAGCCAG
22200407 AGAGACACAG GCATAGGCAC AGTAAAATAT TGCATACATA ACATACGTAT TTCGTACTION
22200467 TATTGTATTT CTAGGCTTAA CTTTTATATG CAAACAATTT GCCATAAAGA GGAGGTAGCA
22200527 GGAAAATGGG ATGAGGAGCT AGCATTAAAG GACTCGATCG AAGCACACAC ATTTTACTACT
22200587 TACGAAATGC GGACGATGTG GGGGCGTTCC GCGTCGAATT TTTTAAGCTT TTTAATTTTT
22200647 GTACTTGAGA GCTTTAAAAT GTAATTACTA AAGAAGCGAT TTTACTTTTA ACGACAAAAG
22200707 CAAACGAGAG AAGTAGCGCA AATGTTTTTC AAGTTTTATT TCGACGACGT GCATATAAGT
22200767 ATATACATAC ATATACACAT ATATTTTTTA TTAAGTGA AACAACAAACA AAAGACAATG
22200827 ACGACAATTT TTAGTCAACA GATGCCTAAA CTGACTGACT GAAAAGGAAT ACATTTTTCAT
22200887 GCGAAACCAA GTAAAACCAA ATCAGTGAGA AATGCTAAAT AGATTGTACG AACTAGCAAAA
22200947 ATATTCAGCA TCACATAAAT AACAATACCT TCTATAATAT TAATAAGCAA GTATGTGTAT
22201007 AATTAACGAA ACCCCATTGT AGATATCGAG AATGTTTACA AATACAGATG TAAACTCAAAA
22201067 TATTGACAGC TTTTGTAGCAG AGTGTAGTGA TTTTGGTACA TTTAACCGAA CCCATTTGTA
22201127 GATGTTTAGG CCTATGTTGA TTACGAGCAG ATTTGAAAAG ATGCCCTACT TACCCGATTT
22201187 CGGTTTGCAA AACTTATCAT TTAACCATCC GTGAAAAGA ACCTATCCCA GATCATGTAA
22201247 TTCAAAAAGA ATTAAAAACA ATAATAAATC ATTGCATAAA AGTCTTTGTA TCGGAATTGA
22201307 AAACCTCAAAA TCGAAATTTA AATACTACCA ATGATAACTA CTGAGAAATC ATATTACAAA
22201367 ATAACGAAAA CATATTTTAC TACTTGCCTA CAAGTATTTG TACACAAGCC TACAAAGTAA
22201427 CATTGAACGT GACCAAATAA TTTAATATTTG CGGAAGATTT TTCCCCAAA CTCATATTTA
22201487 ATATACACAC ACGTGTGCGC ATGTGTCCAA ATGAAATTTA ACAGAAATTTG AAGCGGAGGA
22201547 GCTGCACGTT CGCGGGAGTG GACACATATT TCAATAAGCC GAAATAAAGA ATATACATAC
22201607 CGATCCGA

```

10.3 Rohdaten

Bestimmung der Lebensdauer

Durchschnittliche Anzahl der Tage, an denen noch 50% der Fliegen leben: Signifikante Werte sind grau markiert

WT	40,3	1,7
SrpK79D-IVN	24,6	1,79
GAL4;VN	11,4	1,40
RB;VN	19,4	2,2
RF;VN	17,25	2,4
RB-Rescue	18,9	2,98
RF-Rescue	16,65	1,42

WT-VN	WT-GAL4	WT-RB	WT-RF	WT-RB Rescue	WT-RF Rescue
4,2E-6	8,6E-07	5,5E-28	7,0E-06	1,2E-04	5,5E-08
	VN-GAL4	VN-RB	VN-RF	VN-RB Rescue	VN-RF Rescue
	6,2E-03	1,7	0,7	2,0	0,07
RF-RB Rescue	RF-RF Rescue		RB-RF	RB-RB Rescue	RB-RF Rescue
6,9	8,7		5,5	9,5	3,3
		GAL4-RB	GAL4-RF	GAL4-RB Res	GAL4-RF Res
		0,34	1,35	0,89	0,39

Quantifizierung der Aktiven Zonen

	Muskelpaar 6/7	Muskelpaar 12/13
Mittelwert w^{1118}	42,4	275
SEM	1,9	31,8
Mittelwert $SrpK79D^{VN}$	43,4	222
SEM	3,9	27,9
T-Test	0,26	0,14

Real Time PCR

Bruchpilot-Transkript	RF	RH, RD, RG und RE
Anzahl der Versuche	6	11
Mittelwert	0,15	0,40
SEM	0,09	0,22

10.4 Sequenzierergebnis des Hefeklons

TTTAAGCTTCTAGAGCTTACTAGTATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCCAGCCAGCGC
 CGGTCTAGAGAATTCGGCACGAGGCAATGCTGACGATGCCAAAAAGGCTTTGGAACAGCTGAACG
 GCTTTGAACTGGCCGGTCGGCTCATGAAAGTGGGCAATGTGACGGAGCGACTGGACATGAATACCA
 CCTCGCTGGACACCGACGAGTGGATCGTACGGGCATCGATCTGGGTGCCACGGGACGTCTGCAGC
 TGATGTTCAAGCTGGCGGAAGGAGCCGGTTTGGCAGTGCCCCAGGCGGGCTGCCAATGCGCTGCTG
 GCTACAGCACCTCAACCGGCGCCGTTGCAGCAGCAGGAGGTGGCACCATCGATAGCCACACAGTG
 CTTCATACTGTCCAATATGTTTATCCGCGTACCGAGACAAATCCTACCTGGGACGTTGAGATCCGC
 GACGATGTGCTGGAGGAGTGCGCCAAACACGGCGGGGTGCTGCACATCCACGTGGACACCATTTC
 GCACACGGGAACCGTGTATGTCAAGTGCCCAGCACAACGACCGCAGTGCTGGCAGTGAATGCAC
 TGCATGGACGCTGGTTTGGCCGGTCGAGTGATCACGGCGGCCTACGTGCCCGTGATCAACTATCACA
 CCATGTTTCCGGACTCCATCAACGCCGTCGATCTGGTGACGTCCACGCGCAAGAACACCGACGATT
 GAGCTGAATGCGTGGGCAAAAATATTGTTAATATTCGTTACAAGAACTAATTTTTGGTCAAAACATT
 TTCAATTTTTTTAAAGACTCGACGCAAGCTGAAAATTAGGGGCACATATTTAAAATACAATTAATAC
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGTCGACTAATTGAATAATAAGCTCTAGAGGGCCGCATCATG
 TAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAACGA

10.5 Proteindomänen für die SMART-Vorhersage

CG11266-PC

MVQHTQAEKNRLQNAAPAFQPKSHTGPMRLYVGSLSHFNITEDMLRGIFEPFGKIDAIQLIMDTETGRSK
GYGFITYHNADDAKKALEQLNGFELAGRLMKVGNVTERLDMNTTSLDTDEMDRTGIDLGATGRLQLM
FKLAEGAGLAVPQAAANALLATAPQPAPLQQQEVAPSIATQCFILSNMFDPRTEETNPTWDVEIRDDVLEE
CAKHGGVLIHIVDTISHTGTVYVKCPSTTTAVLAVNALHGRWFAGRVITAAYVPVINYHTMFPDSINAV
DLVTSTRKNTDD

Quelle: www.flybase.org; SR-Sequenzen sind hellgrau markiert

CG11266-PA

MAEDFDVEAMLEAPYMKNNVSAGSGGSGGRKRS~~SSPGGGGGHDDDYAENGPRNGSGGGSSHKKQSK~~
~~RSRSRSGSRD~~GKSRDRGNERS~~SHRDKDKERDRNRDGGDRDRHRREGGDRDRERERERERERDRSRRSRS~~
~~RDERGGGGRYGDRDKDRSRDRRGGS~~SLQVDRSRDKRRRSRSRDQQRKRLSPIRERKRSHSRSRDRN
SRRRGTNSPRRRSPPNGADRTTPTELSPEERDARTVFCIQLSQRVRARDLEEFFSSVGKVRDVRLITCNKT
KRFKGIAYIEFDDPESVALALGLSGQRLLGVPIMVQHTQAEKNRLQNAAPAFQPKSHTGPMRLYVGSLSH
FNITEDMLRGIFEPFGKIDAIQLIMDTETGRSKGYGFITYHNADDAKKALEQLNGFELAGRLMKVGNV
ERLDMNTTSLDTDEMDRTGIDLGATGRLQLMFKLAEGAGLAVPQAAANALLATAPQPAPLQQQEVAPS
IATQCFILSNMFDPRTEETNPTWDVEIRDDVLEECAXHGGVLIHIVDTISHTGTVYVKCPSTTTAVLAVNA
LHGRWFAGRVITAAYVPVINYHTMFPDSINAVDLVTSTRKNTDD

Quelle: www.flybase.org; SR-Sequenzen sind hellgrau markiert

Publikationen

Nieratschker V., **Schubert A.**, Jauch M., Bock N., Bucher D., Dippacher S., Krohne G., Asan E., Buchner S., Buchner E.; 2009. *Bruchpilot in Ribbon-Like Axonal Agglomerates, Behavioral Defects, and Early Death in SRPK79D Kinase Mutants of Drosophila*, PLoS Genetics 5 1000700

Schubert A., Juge F., Racic S., Jauch M., Taiz J., and Buchner E.; The serine/arginine protein kinase 79D (SRPK79D) and splicing factor 2 (SF2) in *Drosophila melanogaster*, in Vorbereitung

Ausgewählte Konferenzbeiträge

Schubert A., Jauch M., Nieratschker V., Asan E., Dippacher S., Buchner E.; 2008, Neurofly Meeting, Würzburg; Poster: SRPK3 – a new serine/threonine protein kinase in *Drosophila melanogaster*

Schubert A., Jauch M., Nieratschker V., Dippacher S., Asan E., Buchner E.; 2009, 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen; Poster: SRPK79D – a new serine/threonine protein kinase in *Drosophila melanogaster*

Schubert A., Nieratschker V., Jauch M., Buchner E.; 2009, Neurobiology of *Drosophila*, Cold Spring Harbor, NY, USA; Poster: Bruchpilot in Ribbon-Like Axonal Agglomerates, Behavioral Defects, and Early Death in SRPK79D Kinase Mutants of *Drosophila*

Schubert A., Jauch M., Nieratschker V., Bucher D., Buchner E.; 2010; Neurofly Meeting, Manchester, England, Poster: Bruchpilot in Ribbon-Like Axonal Agglomerates, Behavioral Defects, and Early Death in SRPK79D Kinase Mutants of *Drosophila*

12. Danksagung

- Ein ganz großes Dankeschön an Prof. Dr. Erich Buchner für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können. Danke auch für die Unterstützung, die Betreuung und vieles mehr!
- Vielen Dank an Prof. Dr. Georg Krohne für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Versorgung mit Schokolade, die über schlechte Zeiten bestens hinweg getröstet hat.
- Danke an die gesamte Buchner-Gruppe: Mandy, Tulip, Nidhi, Partho und Alex. Ohne euch wäre es nicht so eine schöne Zeit gewesen. Besonderer Dank gilt Mandy, die mir eine gute Freundin geworden ist.
- Danke an meinen Lieblings-HiWi Sonja, die immer so fleißig und motiviert gearbeitet hat und mir immer ein Lächeln aufs Gesicht gezaubert hat. Du bist die Beste!
- Danke an meine F2-Studentinnen Adriana, Daniela und Fang, die den Alltag bunter gestaltet haben. Ebenfalls ein großes Dankeschön an Till für die Hilfe beim *in vivo* Imaging und merci beaucoup François.
- Danke an Dieter, Gertrud, Barbara und Susanne für die Präparate. Danke auch an Fr. Mohr und Irina im Sekretariat und alle Anderen am Lehrstuhl für die tolle Arbeitsatmosphäre.
- Danke an Uli, Daniela und Andrea für eure Freundschaft. Ohne Euch wäre das Studium öde gewesen. Ihr seid Menschen, die man bis zum Rest des Lebens um sich haben möchte.
- Danke an meine Familie und Freunde. Besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich immer unterstützt hat, immer für mich da war und noch für so vieles mehr. Danke Mama!
- Danke an meinen Mann Andreas, dafür dass du mich immer unterstützt und bedingungslos an mich glaubst und meine schlechte Laune erträgst. Danke dass du da bist und immer zu mir stehst!

Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 08.12.2010