

**Die Serin/Arginin Proteinkinase 79D (SRPK79D)  
von *Drosophila melanogaster* und ihre Rolle bei der  
Bildung Aktiver Zonen von Synapsen**



Dissertation zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Mandy Jauch**  
geboren am 09.01.1979 in Pirna

Würzburg, Dezember 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Raabe

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung  
für die Fakultät für Biologie  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vom 15. März 1999,  
zuletzt geändert durch Satzung vom 12. August 2009:

Hiermit erkläre ich, Mandy Jauch, die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Des weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 08. Dezember 2010

---

Mandy Jauch

Erst wenn der letzte Baum gefällt,  
der letzte Fluss vergiftet,  
das letzte Tier getötet ist,  
erst dann werdet ihr merken, dass man Geld nicht essen kann.  
Indianische Weisheit

Gewidmet  
meinen geliebten Kindern  
und meiner Familie  
zum Dank für Eure Liebe und Unterstützung

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus	1
1.2	Molekulare Prozesse in Neuronen und an Synapsen	3
1.3	Struktur und Funktion Aktiver Zonen	9
1.4	Das Bruchpilot-Protein von <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.5	Mechanismen konstitutiven und alternativen Spleißens	16
1.6	Struktur und Funktion der SR-Proteine	20
1.7	Struktur und Funktion der SR Proteinkinasen (SRPKs)	23
1.8	Die SR Proteinkinase 79D (SRPK79D) aus <i>Drosophila melanogaster</i>	26
1.9	Neuropeptide und das Median/Transvers-Nervensystem von <i>D. melanogaster</i>	30
1.10	Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
2.1	Antibiotika	34
2.2	Antikörper	34
2.3	Bakterien	35
2.4	Chemikalien	35
2.5	<i>Drosophila</i> -Zucht	35
2.6	Fliegenlinien	35
2.7	Marker	36
2.8	Oligonukleotide	37
2.9	Kits	38
2.10	Restriktionsenzyme	39
2.11	Methoden auf DNA-Ebene	39
2.11.1	Isolation genomischer DNA aus einer adulten Fliege	39
2.11.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.11.3	Linker-PCR	40
2.11.4	Restriktionsverdau	40
2.11.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung	41
2.11.6	DNA-Gelelektrophorese	41
2.11.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	42

---

2.11.8 Ligation von DNA-Fragmenten	42
2.11.9 DNA-Sequenzierung	43
2.12 Methoden auf RNA-Ebene	43
2.12.1 Isolierung der gesamten RNA aus adulten Fliegen	43
2.12.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA	43
2.13 Methoden auf Protein-Ebene	44
2.13.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.13.2 Western Blot und Immuno-Detektion	45
2.13.3 Detektion mittels ECL-System (Enhanced Chemiluminescence)	46
2.14 Arbeiten mit Bakterien	47
2.14.1 Hitzeschock-Transformation	47
2.14.2 Bakterien-Plattenkulturen	47
2.14.3 Bakterien-Flüssigkulturen	48
2.14.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien	48
2.15 Immuno-Histochemie an Larven	48
2.16 Elektronenmikroskopische Methoden	50
2.16.1 Standard-Elektronenmikroskopie	50
2.16.2 Immuno-Elektronenmikroskopie	51
2.16.2.1 Post-embedding Immuno-Gold-Färbung	51
2.16.2.2 Pre-embedding Immuno-Gold-Färbung	52
2.17 Verhaltensversuche	54
2.17.1 Larvale olfaktorische Konditionierung	54
2.17.2 Flugversuch nach Benzer (1973)	55
2.18 Genetische Methoden	56
2.18.1 Verwendung von Balancer-Chromosomen	56
2.18.2 Das Gal4/UAS-System	57
2.18.3 RNA-Interferenz	58
2.18.4 Ortsspezifische Rekombination	59
2.19 Weitere verwendete Geräte und Materialien	61
2.20 Datenbanken	61

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>62</b>
3.1 Ultrastrukturelle Charakterisierung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven der <i>Srpk79D<sup>FN</sup></i> Nullmutante von <i>Drosophila melanogaster</i>	62
3.1.1 Standard-Elektronenmikroskopie	62
3.1.2 Immuno-Elektronenmikroskopie	66
3.1.2.1 Post-embedding Immuno-Gold-Färbung	66
3.1.2.2 Pre-embedding Immuno-Gold-Färbung	66
3.2 Expressionsstärke des Bruchpilot-Proteins in Köpfen und larvalen Gehirnen der <i>Srpk79D<sup>FN</sup></i> Nullmutante von <i>Drosophila melanogaster</i>	72
3.3 Mutation des <i>Srpk79D</i> -Gens als Ursache für die Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven	74
3.4 Untersuchung der Expression und des Spleißmusters der synaptischen Proteine Synapsin, Sap47 und CSP in Fliegenlinien mit Mutation des <i>Srpk79D</i> -Gens	78
3.5 Experimente mit dem Antikörper $\alpha$ -SRPK (A-17)	80
3.5.1 Immuno-Histochemie an Larven	81
3.5.2 Western Blot Analysen	82
3.6 Re-Etablierung einer homozygoten Fliegenlinie <i>w<sup>+</sup>;UAS-Srpk79D-RBeGFP;Srpk79D<sup>FN</sup></i> für Rescue-Experimente	82
3.6.1 Einzelkreuzungen und Ermittlung des Genotyps mittels PCR	83
3.6.2 Rescue-Versuche durch Expression der SRPK79D-PB-EGFP-Isoform	85
3.7 Klonierung der <i>UAS-Srpk79D-REeGFP</i> -cDNA	86
3.7.1 Restriktionsverdau und Re-Ligation	86
3.7.2 Reverse Transkription plus Linker-PCR	88
3.7.3 MultiSite Gateway® Cloning	90
3.7.3.1 Erzeugung eines Entry-Klons für die <i>Srpk79D-RE</i> -cDNA	90
3.7.3.2 Schaffung eines Entry-Klons für die <i>eGFP</i> -cDNA	92
3.7.3.3 Herstellung eines Expressions-Klons	94
3.8 Knock-down von SR-Proteinen durch RNA-Interferenz	95
3.8.1 Knock-down von SC35	95
3.8.2 Knock-down von X16/9G8	96
3.8.3 Knock-down von B52/SRp55	97
3.9 Larvales Lernen	98
3.10 Herstellung einer Fliegenlinie <i>w<sup>+</sup>;UAS-RNAi-Brp(C8),Srpk79D<sup>FN</sup></i>	99
3.10.1 Bruchpilot-Agglomerate trotz Knock-down von BRP	100

<b>Inhalt</b>	<b>IV</b>
3.10.2 Flugversuch	101
3.11 Bruchpilot ist möglicherweise an der Ausschüttung von Neuropeptiden beteiligt	103
3.11.1 Bruchpilot ko-lokalisiert mit den CAPA-Peptiden im Median/Transvers-Nervensystem	104
3.11.2 Ko-Lokalisation von Bruchpilot mit mCD8-GFP im Median/Transvers-Nervensystem	107
3.11.3 Die <i>Srpk79D<sup>FN</sup></i> Nullmutante zeigt ein normales Bruchpilot-Muster im Median/Transvers-Nervensystem	108
3.11.4 Knock-down von Bruchpilot in den Median- und Transvers-Nerven durch RNA-Interferenz	109
<b>4 Diskussion</b>	<b>110</b>
4.1 Präsynaptische Proteine	110
4.2 Die SR Proteinkinase 79D von <i>Drosophila melanogaster</i>	120
4.3 SR-Proteine	125
4.4 Neuropeptide	126
<b>5 Ausblick</b>	<b>128</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>130</b>
<b>7 Summary</b>	<b>132</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>134</b>
<b>9 Abkürzungen</b>	<b>152</b>
<b>10 Anhang</b>	<b>154</b>
10.1 Genomische Sequenz des <i>Srpk79D</i> -Genlokus	154
10.2 Vektoren	162
10.2.1 pP[UAST]	162
10.2.2 MultiSite Gateway® Pro Donor-Vektoren	163
10.3 Aminosäure-Sequenz des SRPK79D-PE-EGFP Fusionsproteins	164
10.4 Signifikanz-Werte für den Flugversuch	165
<b>Danksagung</b>	<b>166</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>168</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

*Drosophila melanogaster* gehört zur Familie der Taufliegen (Drosophilidae) und wurde erstmals 1830 vom deutschen Entomologen Johann Wilhelm Meigen beschrieben.

Als einer der ersten nutzte um 1900 der Zoologe William Ernest Castle die „schwarzbäuchige“ Taufliege, wie sie im Deutschen heißt, und studierte an *Drosophila*-Stämmen die Auswirkungen von Inzucht über mehrere Generationen (Castle et al., 1906).

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts machten die Forschungen des amerikanischen Zoologen und Genetikers Thomas Hunt Morgan die Fliege zum Forschungsobjekt der klassischen Genetik. In seinen Kreuzungsversuchen klärte er die grundlegende Struktur der Chromosomen auf. Er entdeckte, dass die Gene nacheinander auf den Chromosomen liegen und Kopplungsgruppen bilden. Auch ermittelte TH Morgan die Reihenfolge und Abstände der Gene zueinander, wodurch Genkarten erstellt werden konnten. Nach ihm ist die Einheit centiMorgan benannt.

Ein großer Teil des heutigen Wissens über genetische Prozesse, wie zum Beispiel das Crossing over bei der Rekombination oder die Entstehung von Mutationen durch Röntgenstrahlen, stammt aus diesen frühen Studien an *Drosophila melanogaster*.

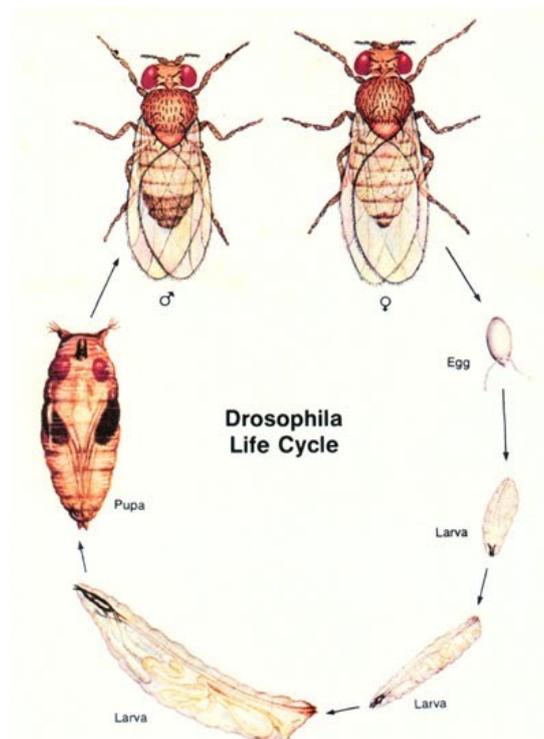
In den 1970er Jahren begann Christiane Nüsslein-Volhard, sich mit der Entwicklungsbiologie von *Drosophila melanogaster* zu beschäftigen. Zusammen mit anderen Forschern beschrieb sie die Wirkungsweise verschiedener Gruppen von Entwicklungsgenen, wobei wie in einer Kaskade die früher exprimierten Gene die jeweils zeitlich nachfolgenden Gene beeinflussen.

Im Jahr 2000 wurde die Sequenzierung des Genoms von *Drosophila melanogaster* abgeschlossen und ergab, dass die Fliege in etwa 13.600 Gene hat (Adams et al., 2000). Diese verteilen sich auf insgesamt vier verschiedene Chromosomen, ein Paar Geschlechtschromosomen und drei Paar Autosomen, die als zweites, drittes und viertes Chromosom bezeichnet werden, wobei das vierte Chromosom sehr klein ist und nur wenige Gene enthält.

In jüngerer Zeit gewinnt auch die neurobiologische Forschung an *Drosophila melanogaster* zunehmend an Bedeutung. Obgleich die Fliege nur ein kleines Gehirn mit etwa 200.000 Neuronen besitzt, ist sie doch zu sehr komplexen Verhaltensweisen fähig. Beim Mensch dagegen ist das Gehirn aus circa  $10^{11}$  einzelnen Nervenzellen mit  $10^{14}$  Synapsen aufgebaut, was bedeutet, dass ein Neuron im Schnitt mit 1000 anderen Neuronen vernetzt ist. Diese enorme Anzahl an Nervenzellen ist zu hochkomplexen Systemen verbunden, die dem Mensch die Wahrnehmung seiner Umwelt

ermöglichen und sein Handeln steuern, jedoch schwer zu erforschen sind. Mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), einem neuen nichtinvasiven bildgebenden Verfahren, ist es heutzutage möglich, aktive Bereiche im menschlichen Gehirn zu identifizieren, die mit geistigen Tätigkeiten wie Lesen, Sprechen oder Denken verknüpft sind. In *Drosophila* existiert das sogenannte 'In vivo Calcium Imaging', das es ermöglicht, unter Verwendung des Gal4/UAS-Systems einen Calcium-Sensor in einer Gehirnregion, beispielsweise den Pilzkörpern, zu exprimieren und die Aktivität von Neuronen in diesen Bereichen durch den Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels zu messen (Fiala und Spall, 2003). Durch ihre genetische Manipulierbarkeit ist *Drosophila* optimal geeignet, um die Funktion von Nervenzellen zu erforschen, denn die Expression von Neurotoxinen zum Beispiel erlaubt es, einzelne Nervenzellen in der Fliege auszuschalten, und die Auswirkungen auf ein bestimmtes Verhalten zu analysieren (Keller et al., 2002). Umgekehrt ist es aber auch möglich, bestimmte Nervenzellen durch Expression von Channelrhodopsin-2, einem durch Blaulicht aktivierten Ionenkanal, anzuschalten (Schroll et al., 2006). Auch auf klinisch relevanten Gebieten wird die Grundlagenforschung an *Drosophila* betrieben. So dient die Fliege als Modell zur Erforschung der molekularen Ursachen für menschliche Krankheiten wie Parkinson (Auluck et al., 2002; Botella et al., 2009), Alzheimer (Iijima-Ando und Iijima, 2010; Iijima et al., 2010) oder Chorea Huntington (Steffan et al., 2001; Marsh et al., 2003).

Als Versuchsobjekt ist *Drosophila melanogaster* aufgrund ihrer einfachen und vor allem kostengünstigen Haltung und Zucht auf Futtergläsern sehr geeignet. Gegenüber anderen Modellorganismen, wie beispielsweise der Maus, hat sie den großen Vorteil, dass sehr viele Nachkommen in sehr kurzer Zeit entstehen, denn die Generationszeit beträgt bei einer Temperatur von 25°C gerade mal neun Tage (siehe Abbildung 1). Die Verfügbarkeit genetischer Werkzeuge wie des bereits erwähnten Gal4/UAS-Systems, sowie der P-Element-Mutagenese, der Enhancer-Trap-Technik, und die Existenz von Balancer-Chromosomen machen *Drosophila* zu einem idealen Modellorganismus zur Beantwortung der unterschiedlichsten biologischen Fragestellungen.



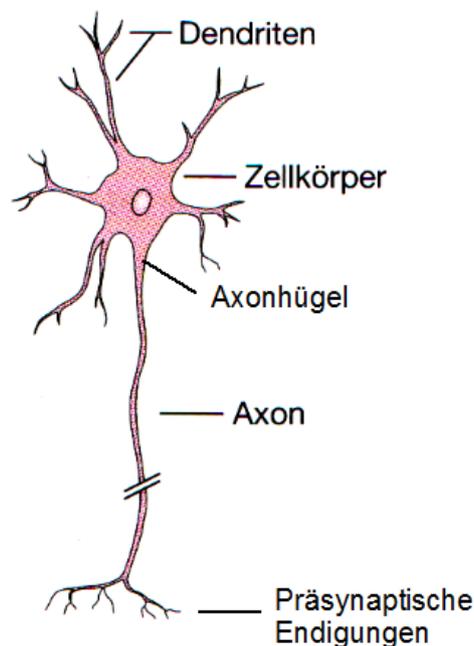
**Abbildung 1: Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster*.** Aus einem Ei schlüpft eine Larve, die sich nach zwei Häutungen verpuppt. Aus der Puppe schlüpft nach 3,5 bis 4,5 Tagen die adulte Fliege. Quelle: [https://sites.google.com/site/neuroscienceresearchmethodslab/\\_/rsrc/1264022150888/drosophila-culturing-2/drosophila-life-cycle/drosophila.jpg](https://sites.google.com/site/neuroscienceresearchmethodslab/_/rsrc/1264022150888/drosophila-culturing-2/drosophila-life-cycle/drosophila.jpg)

## 1.2 Molekulare Prozesse in Neuronen und an Synapsen

Nervenzellen sind die elementaren Signalübertragungseinheiten jedes Nervensystems. Diese Grundbausteine sind recht einfach gebaut. Ein typisches Neuron gliedert sich in vier morphologisch unterscheidbare Bereiche mit definierten Funktionen, nämlich die Dendriten zur Rezeption von Signalen anderer Nervenzellen, das Perikaryon mit dem Axonhügel zur Auslösung eines Aktionspotentials, das Axon zur Signalweiterleitung und die präsynaptischen Endigungen zur Übertragung des Signals auf postsynaptische Nervenzellen (siehe Abbildung 2).

Die Kommunikation zwischen zwei Nervenzellen beziehungsweise zwischen Nervenzellen und den Erfolgsorganen wie Muskel oder Drüsen findet entweder an elektrischen oder an chemischen Synapsen statt. Während bei der elektrischen Synapse die Übertragung an Gap Junctions durch einen Ionenstrom erfolgt, wodurch das Signal praktisch ohne Zeitverzögerung von einem Neuron zum nächsten weitergeleitet wird, geschieht die Übertragung bei chemischen Synapsen mit einer

Verzögerung, da das die Präsynapse erreichende elektrische Signal in ein chemisches Signal umgewandelt wird. Elektrische Synapsen kommen dort zum Einsatz, wo Fluchtreaktionen koordiniert werden müssen, wie zum Beispiel bei der lateralen Riesenfaser und der postsynaptischen motorischen Faser des Flusskrebses. Auch die Meeresschnecke *Aplysia* bedient sich eines solchen Mechanismus, um bei Bedrohung mit dem Ausstoß einer Tintenwolke zu reagieren. Dennoch sind chemische Synapsen weit häufiger als elektrische. Synapsen mit chemischer Übertragung haben zum einen den Vorteil, dass sie neuronale Signale verstärken können, zum anderen weisen sie Plastizität auf, die Grundvoraussetzung für Lernen und Gedächtnis ist.

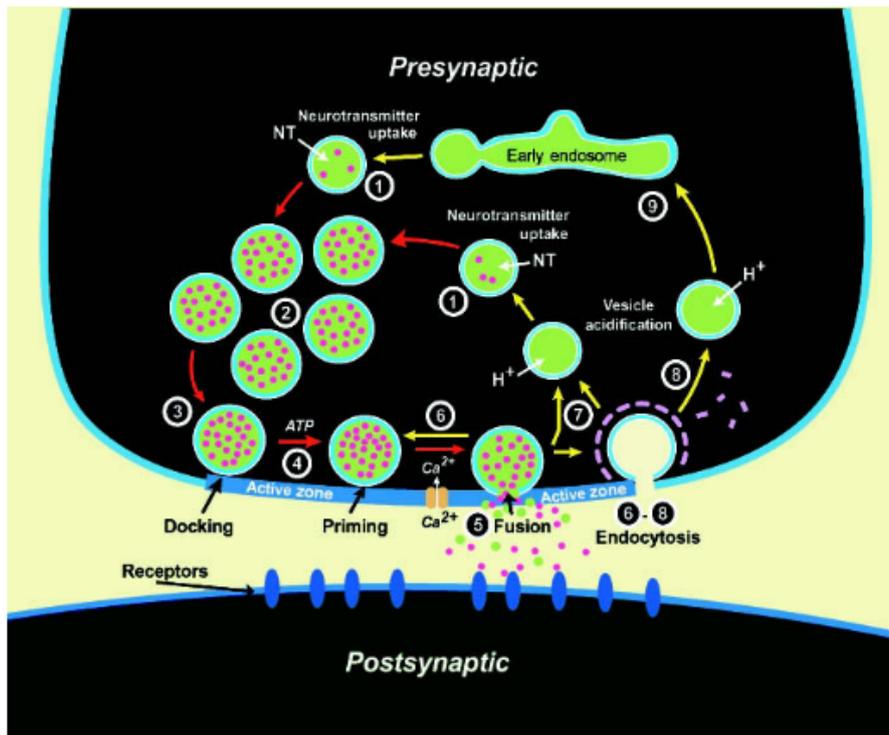


**Abbildung 2: Schema eines Neurons.** Entnommen aus und modifiziert nach Kandel et al. – Neurowissenschaften, Eine Einführung, 1996.

Erreicht ein Aktionspotential die präsynaptische Endigung, bewirkt dies die Öffnung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle in der Plasmamembran, wodurch es zu einem Einstrom von Calcium-Ionen aus dem Extrazellularraum in das Cytoplasma kommt. Die Folge ist die Freisetzung von Quanten an Neurotransmittermolekülen aus den synaptischen Vesikeln (SVs) in den synaptischen Spalt. Dieser als Exocytose bezeichnete Prozess erfolgt durch die Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Membran der präsynaptischen Endigung in spezialisierten Regionen, die als Aktive Zone bezeichnet und im nächsten Unterpunkt genauer behandelt werden.

Die synaptischen Vesikel, welche die Speicherorganellen für Neurotransmitter darstellen,

durchlaufen in den synaptischen Endknöpfchen, auch Boutons genannt, einen Zyklus (siehe Abbildung 3; Südhof, 2004).



**Abbildung 3: Der Zyklus synaptischer Vesikel in einem Bouton.** Entnommen aus Südhof, 2004. Erklärungen zu den einzelnen Schritten siehe Text. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Copyright Clearance Center.

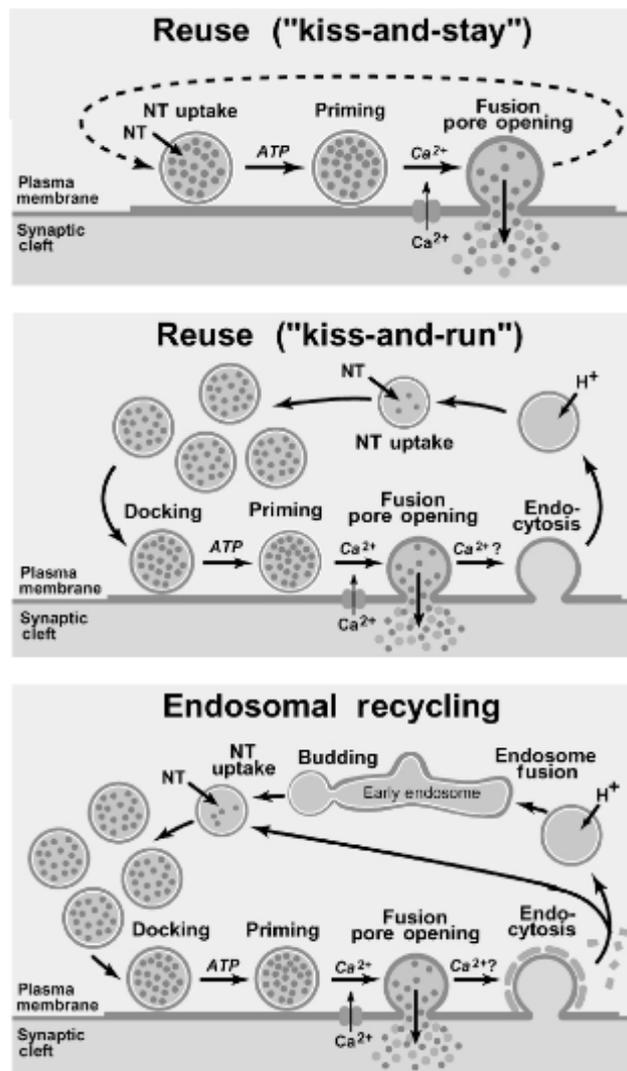
Zunächst werden sie über vesikuläre Transporter mit den entsprechenden Transmittern beladen (Schritt 1 in Abbildung 3) und bilden dann in der Präsynapse zwei Populationen. Die zahlenmäßig wenigen SVs des 'readily releasable pools' sind genau an den Aktiven Zonen zu finden und fusionieren bei Eintreffen eines Aktionspotentials zuerst mit der Plasmamembran. Die weitaus größere Gruppe von SVs bildet den 'reserve pool' (Schritt 2), einen Speicherort für synaptische Vesikel, aus dem der 'readily releasable pool' wieder aufgefüllt wird. Die synaptischen Vesikel des Speicherkompartiments sind über das vesikel-assoziierte Protein Synapsin mit den Aktinfilamenten des Cytoskeletts verknüpft (Cesca et al., 2010). Der Phosphorylierungszustand von Synapsin ist entscheidend für die Lokalisation der SVs. Synapsin ist Substrat mehrerer Proteinkinasen, darunter der von zyklischem AMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMK) (Fornasiero et al., 2010), deren Aktivierung durch Depolarisation der präsynaptischen Membran und den nachfolgenden Einstrom von Calcium-Ionen die Phosphorylierung von Synapsin zur Folge hat, was letztendlich dazu führt, dass sich die

synaptischen Vesikel vom Cytoskelett ablösen und mit Hilfe der Rab-GTPasen zur Aktiven Zone transportiert werden können.

Die nachfolgende Positionierung der synaptischen Vesikel an der präsynaptischen Membran wird als 'Docking' bezeichnet (Schritt 3) (Verhage und Sorensen, 2008). In Säugern soll ein trimere Komplex aus dem Unc-13 Homolog (Munc13), Rab3 und dem Rab3-interacting molecule (RIM) für die Rekrutierung der SVs zur präsynaptischen Membran verantwortlich sein (Dulubova et al., 2005). Eine Vielzahl von weiteren Proteinen ist ebenfalls an diesem Prozess beteiligt. So bildet sich ein als SNARE (soluble *N*-ethylmaleinimide-sensitive factor attachment protein receptor) bezeichneter Komplex aus dem in der Vesikelmembran lokalisierten Synaptobrevin/VAMP (vesicle-associated membrane protein) mit den in der präsynaptischen Membran verankerten Proteinen Syntaxin und SNAP25, der über die cytoplasmatischen *N*-Ethylmaleinimid-sensitiven Fusionsproteine (NSF), sowie die löslichen NSF-Anheftungsproteine (soluble NSF attachment proteins, SNAP) zusammengehalten wird.

Das nächste Stadium – Priming genannt – umfasst ATP-abhängige Reaktionen, während derer die angedockten SVs für die Fusion mit der Plasmamembran kompetent gemacht werden (Schritt 4). Dazu gehört unter anderem die Entfernung des NSF und der SNAPs aus dem SNARE-Komplex durch die AAA+-ATPase (Chua et al. 2010). Complexin, ein weiteres kleines Protein, bindet an die Oberfläche verknüpfter SNARE-Komplexe. Schließlich überführt eine Munc-13-abhängige Konformationsänderung Syntaxin von einer geschlossenen in eine offene Konformation.

Letztendlich zur Fusion der synaptischen Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran kommt es, wenn sich bei Eintreffen eines Aktionspotentials an der Präsynapse spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle öffnen (Catterall und Few, 2008). Die einströmenden Calcium-Ionen binden an Synaptotagmin, ein als Calcium-Sensor fungierendes Protein der Vesikelmembran. Synaptotagmin enthält zwei C<sub>2</sub>-Domänen, welche die Calcium-abhängige Bindung sowohl an Membranlipide, als auch an die SNARE-Proteine Synaptobrevin auf den synaptischen Vesikeln bzw. Syntaxin und Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25) an der präsynaptischen Membran vermitteln (Jahn und Scheller, 2006). Fusion findet statt, wenn sich Synaptotagmin und die SNARE-Proteine reißverschlussartig zusammen lagern. Es wird angenommen, dass die Energie, die bei dieser Komplexbildung frei wird, ausreicht, um die Energiebarriere für die Fusion zu überwinden. Nach der Verschmelzung beider Membranen diffundieren die freigesetzten Neurotransmittermoleküle durch den synaptischen Spalt (Schritt 5) und binden entweder an ionotrope oder metabotrope Rezeptoren in der postsynaptischen Membran und lösen dadurch postsynaptische Rezeptor-Signalkaskaden aus.

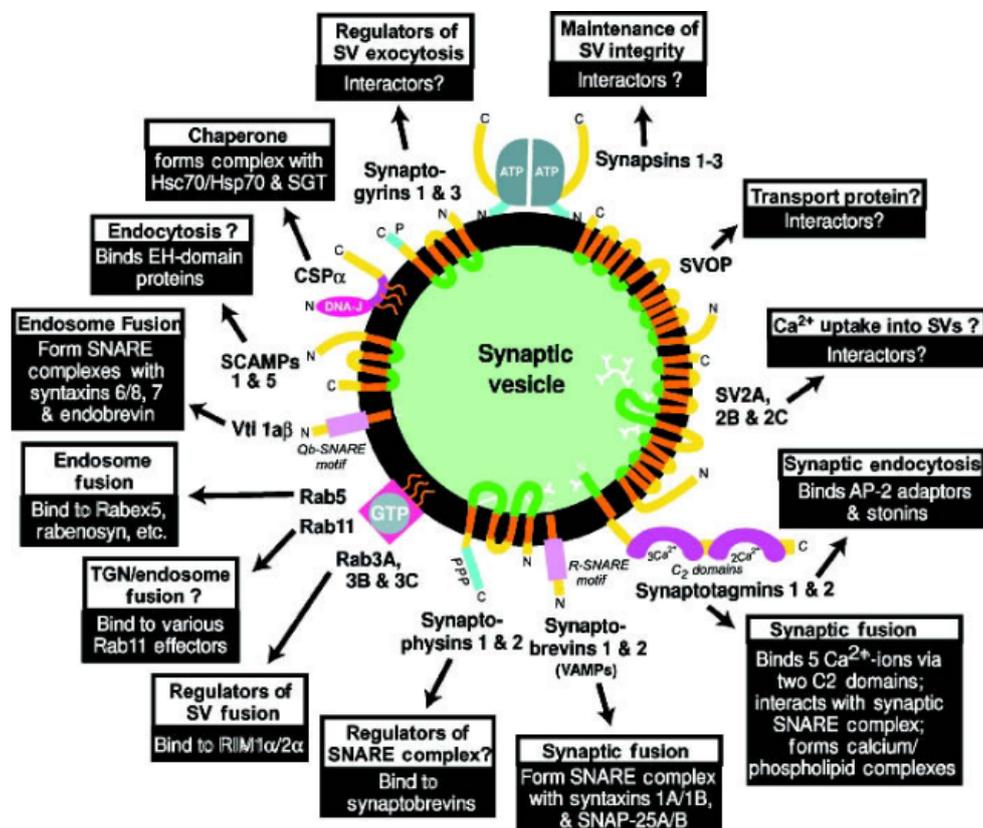


**Abbildung 4: Recycling synaptischer Vesikelmembranen.** Drei mögliche Szenarien sind denkbar. Entnommen aus Südhof, 2004. Erläuterungen zu den einzelnen Schritten siehe Text. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Copyright Clearance Center.

Nach der Transmitter-Ausschüttung werden die synaptischen Vesikel auf einem von drei Wegen recycelt, wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt wird (Südhof, 2004). Die Wiederverwertung durch den 'kiss-and-stay'-Mechanismus beinhaltet die sofortige Rückgewinnung der Vesikelmembran vom Ort der Fusion und die erneute Befüllung der Vesikel mit Neurotransmittern ohne deren Entfernung von der präsynaptischen Membran. Beim sogenannten 'kiss-and-run'-Mechanismus, dessen molekulare Basis unklar ist, wird die Vesikelmembran ebenfalls direkt an der Fusionsstelle wiedergewonnen, von der präsynaptischen Membran gelöst und mit Neurotransmitter wiederbefüllt. Bei der Clathrin-vermittelten Endocytose wird die Vesikelmembran recycelt, indem sich zunächst mit Clathrin umhüllte Gruben, sogenannte Coated Pits, bilden, die sich im weiteren

Verlauf als 'coated vesicles' abschnüren. Nach Entfernung des Clathrin-Gitters können die Vesikel entweder direkt mit Neurotransmittern beladen werden, und so zu funktionellen SVs reifen, oder sie fusionieren mit Endosomen, bevor aus diesen Kompartimenten neue SVs in einem als 'budding' bezeichneten Prozess regeneriert werden.

Ein einzelnes Vesikel durchläuft im Laufe seiner Existenz mehrere Stadien, die allesamt durch Funktionen der verschiedensten Proteine in der Vesikelmembran vermittelt werden. Abbildung 5 fasst schematisch die Vielzahl der involvierten Proteinklassen und deren mutmaßliche Funktionen zusammen, und zeigt mögliche Interaktionen auf (Südhof, 2004).



**Abbildung 5: Struktur eines einzelnen synaptischen Vesikels.** Entnommen aus Südhof, 2004. Proteine mit unterschiedlichen Aufgaben im synaptischen Zyklus liegen dicht gepackt in der Vesikelmembran vor. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Copyright Clearance Center.

Das Cysteine String Protein (CSP), ein Mitglied der DNA-J-Familie von Co-Chaperonen, wird an seinen 14 Cysteinresten palmytyliert. Durch die Palmytylreste, welche sich in die Vesikelmembran einfügen, wird CSP als peripheres Protein an der Membran synaptischer Vesikel verankert. Im Komplex mit den Proteinen Hsc70 (Heat shock cognate protein 70), einer ATPase zur Entfernung der Clathrin-Hülle endocytierter Vesikel, und SGT (small glutamine-rich tetra-trico-peptide-

containing protein) arbeitet CSP als molekulares Chaperon zur Bergung beschädigter Komponenten der präsynaptischen Maschinerie zur Neurotransmitter-Ausschüttung (Tobaben et al. 2001).

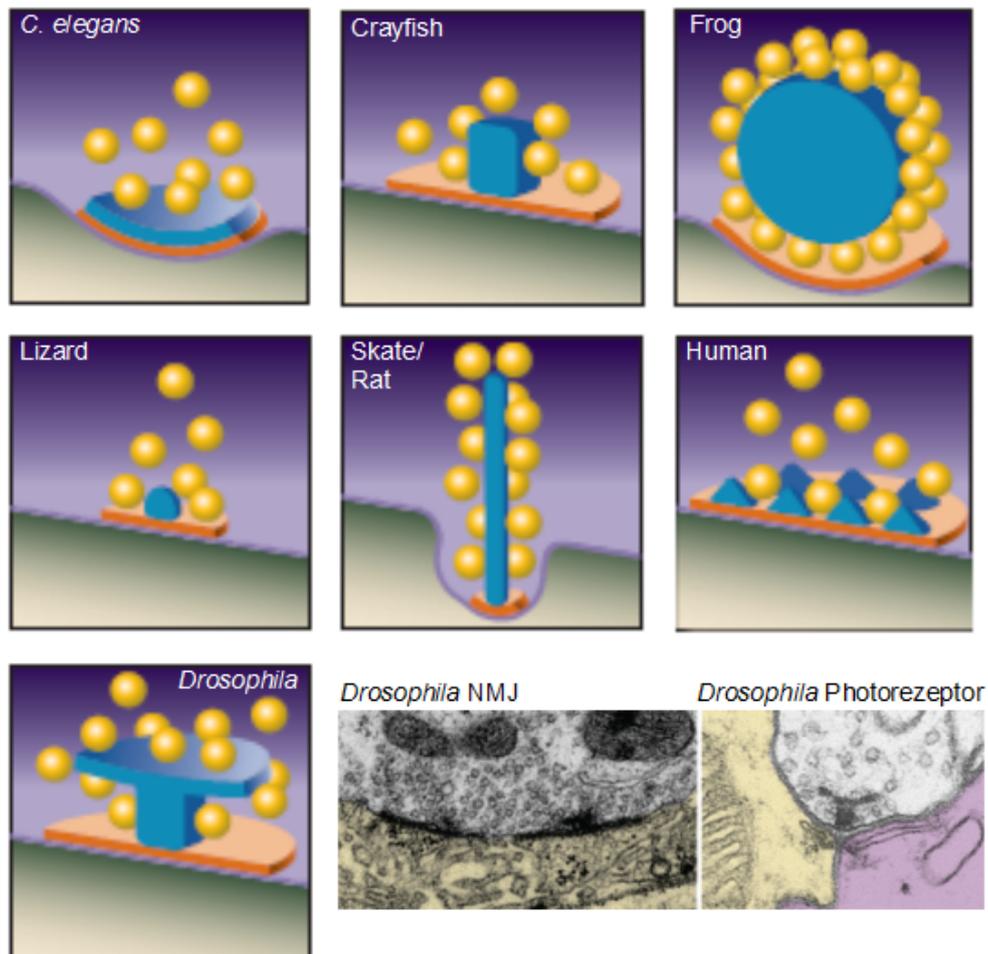
Ein weiteres synaptisches Protein mit ungeklärter Funktion, das bisher nur bei *Drosophila* untersucht wurde, ist das Synapsen-assoziierte Protein von 47 kDa (Sap47) (Reichmuth et al., 1995; Funk et al., 2004). Durch alternatives Spleißen entstehen vom *Sap47*-Gen acht Transkripte. Vergleiche der Gensequenz zeigten eine hochgradige Konservierung im Laufe der Evolution von der Fliege bis hin zum Menschen.

### 1.3 Struktur und Funktion Aktiver Zonen

Der Begriff Aktive Zone wurde 1970 von Couteaux und Pecot-Dechavassine geprägt, die Studien zur Ultrastruktur der neuromuskulären Synapse des Frosches durchführten. Aktive Zonen (AZ) sind hochspezialisierte Bereiche der präsynaptischen Nervenendigungen, die morphologisch gesehen zum Andocken und zur Fusion synaptischer Vesikel dienen, und physiologisch betrachtet Stellen zur Ausschüttung von Neurotransmittern darstellen. Obgleich sich Aktive Zonen bei Betrachtung von Synapsen verschiedener Organismen in Größe und Form unterscheiden (siehe Abbildung 6, entnommen aus und modifiziert nach Zhai und Bellen, 2004), erfüllen sie doch alle bestimmte Voraussetzungen für die effiziente Signalübertragung.

Ein wichtiges Kriterium zur effektiven Kommunikation zwischen Zellen ist die Positionierung der Aktiven Zone direkt gegenüber der sogenannten 'postsynaptic density' (PSD), jener Region in der postsynaptischen Membran, welche die Rezeptoren für die Neurotransmitter enthält. Diese präzise Anordnung von Aktiver Zone gegenüber PSD wird über trans-synaptische Interaktionen zwischen Zell-Adhäsionsmolekülen (cell adhesion molecules, CAMs) wie Cadherinen, Nectinen, Neurexinen und Neuroliginen bewerkstelligt, um nur einige der beteiligten Proteine zu nennen. Alle Adhäsionsmoleküle besitzen die gleichen Motive, nämlich eine extrazelluläre Domäne zur Bindung der postsynaptischen Gegenstücke oder der extrazellulären Matrix, eine Transmembrandomäne, sowie eine intrazelluläre Domäne zur Verknüpfung mit dem Cytoskelett oder mit intrazellulären Gerüstproteinen. Mit Ausnahme von Neurexin, das präsynaptisch exprimiert wird und seinen postsynaptischen Partner Neuroligin bindet, werden alle anderen CAMs sowohl in der Prä-, als auch in der Postsynapse exprimiert und lagern sich über homophile Interaktionen zusammen. Abgesehen von ihrer Funktion der Stabilisierung synaptischer Kontakte, regulieren CAMs auch Prozesse wie beispielsweise axonales Wachstum, wie für Ephrin und die Ephrin-Rezeptor-Tyrosinkinasen gezeigt werden konnte (Lai und Ip, 2009). In ähnlicher Art und Weise sind Neuroligine mit Mitgliedern der

'postsynaptic density protein of 95 kDa' (PSD-95)-Familie vernetzt, die als wichtige Regulatoren postsynaptischer Signalkaskaden gelten (Kim und Sheng, 2004). Weitere wichtige Proteine Aktiver Zonen sind die in die Plasmamembran eingebetteten Calcium-Kanäle und die mit ihnen in Wechselwirkung tretenden SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP25.

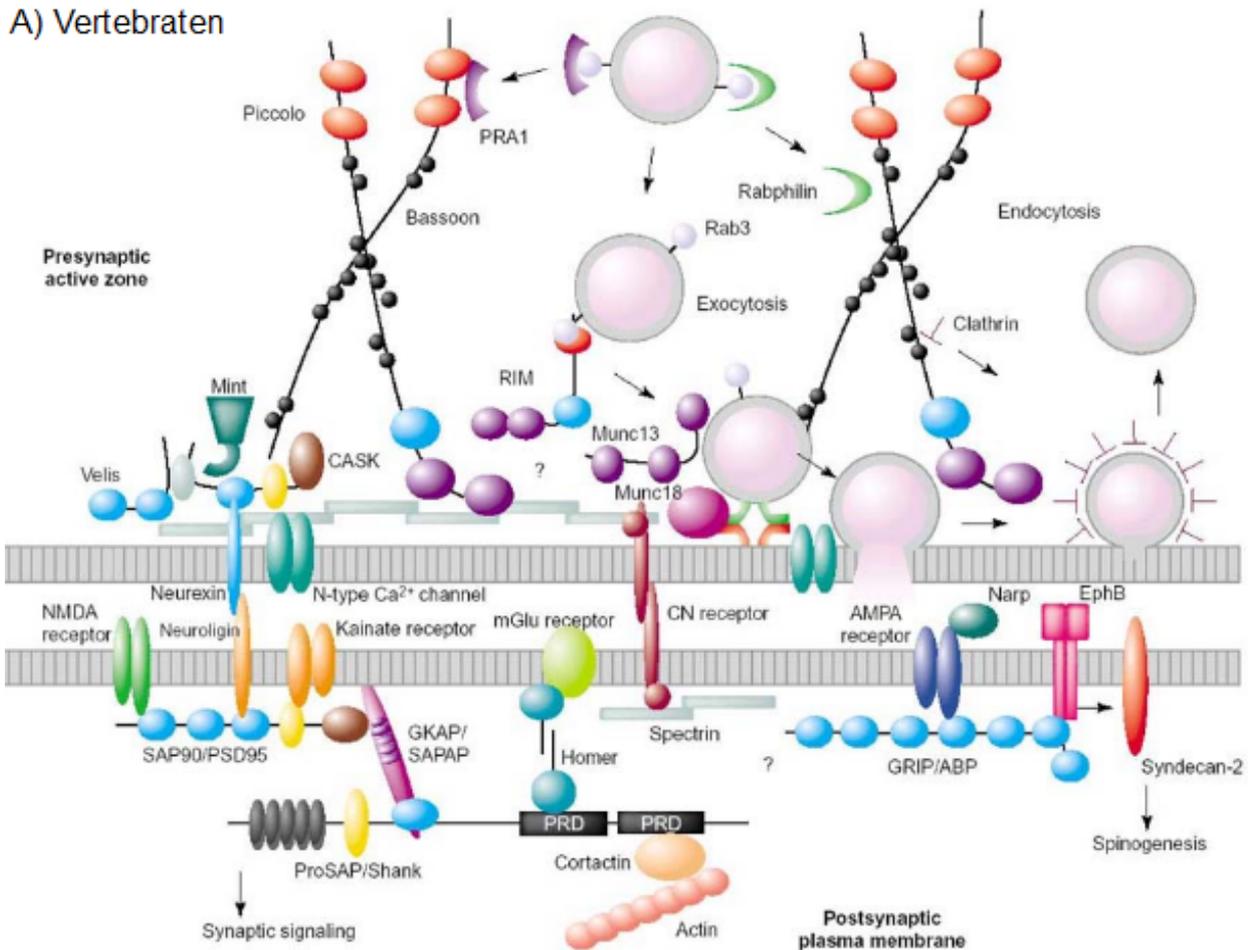


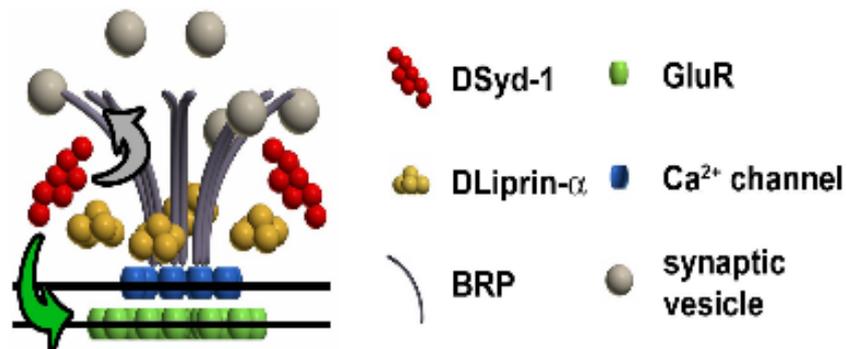
**Abbildung 6: Schematische Darstellung der charakteristischen Strukturen Aktiver Zonen verschiedener Organismen.** Entnommen aus und modifiziert nach Zhai und Bellen, 2004. Aktive Zonen dienen dem Andocken und der Fusion synaptischer Vesikel. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Copyright Clearance Center.

Die zweite Gemeinsamkeit Aktiver Zonen ist die auf die Plasmamembran aufgelagerte, elektronendichte Cytomatrix (cytomatrix at the active zone, CAZ), die einen hohen Proteingehalt vermuten lässt. Zahlreiche Proteine konnten als Komponenten der CAZ identifiziert werden, darunter klassische Cytoskelett-Proteine wie Actin, Tubulin oder Myosin. Die zweite Klasse umfasst Gerüstproteine wie SAP90/PSD95/Dlg und CASK (Hata et al., 1996), deren Vorkommen nicht auf die Aktive Zone beschränkt ist. Die für die Aktive Zone spezifischen Proteine bilden die

dritte Gruppe. Bei den Vertebraten zählen dazu RIM (Rab3-interacting molecule), Munc13, Bassoon, Piccolo/Aczonin, Liprin- $\alpha$  und die Mitglieder der CAST/ELKS/ERC-Familie (CAST = CAZ-associated structural protein; ELKS = Glutamin-, Leucin-, Lysin- und Serin-reiches Protein; ERC = ELKS-Rab6-interacting protein CAST) (Schoch und Gundelfinger, 2006; Siksou et al., 2007; Jin und Garner, 2008). Abbildung 7A zeigt schematisch eine Auswahl an AZ-Proteinen in Vertebraten-Synapsen. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 7B eine Aktive Zone der neuromuskulären Synapse (NMJ) von *Drosophila* schematisch abgebildet. Bekannte Proteine der AZ hier sind DSyd-1, DLiprin- $\alpha$  und Bruchpilot, das im kommenden Unterpunkt konkreter beschrieben wird.

A) Vertebraten



B) *Drosophila*

**Abbildung 7: Proteine Aktiver Zonen sind zu einem dichten Netzwerk verknüpft und gegenüber der PSD mit den Rezeptoren angeordnet.** (A) Schematische Darstellung einer Aktiven Zone von Vertebraten. Entnommen aus Jin und Garner, 2008. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Copyright Clearance Center. (B) Wesentlicher Bestandteil der Aktiven Zone von *Drosophila* ist das Protein Bruchpilot. Entnommen aus Oswald et al., 2010. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Journal of Cell Biology.

Als drittes gemeinsames Merkmal Aktiver Zonen wären die elektronendichten Projektionen zu nennen, die sich von der Cytomatrix bis ins Cytoplasma hinein erstrecken und in verschiedenen Spezies ganz unterschiedliche Gestalt aufweisen, wie Abbildung 6 verdeutlicht. Die Projektionen der NMJs von *Caenorhabditis elegans* haben die Form eines Plaques, während solche von Crustaceen zylindrisch erscheinen. Bänder-artige ('synaptic ribbons') Projektionen sind bei Vertebraten wie dem Rochen und der Ratte zu finden, beim Frosch sind sie eher rund, und im menschlichen Zentralnervensystem werden die pyramidenartigen Projektionen durch dünne Fibrillen miteinander verbunden, sodass eine Gitterstruktur entsteht, deren Zwischenräume gerade groß genug sind für die Fusion eines einzelnen Vesikels von ungefähr 50 nm Durchmesser mit der Plasmamembran (Philips et al., 2001). *Drosophila* dagegen besitzt typische Projektionen in Form des Buchstaben T, die daher 'T-Bars' genannt werden.

Die Hauptaufgabe elektronendichter Projektionen ist die Verankerung synaptischer Vesikel an der Aktiven Zone, wodurch eine Vergrößerung des 'readily releasable pool' ohne Beeinflussung der Größe der Aktiven Zone an sich möglich ist.

Der Zusammenbau Aktiver Zonen ist ein hoch regulierter Prozess. Die für die Aktive Zone spezifischen Proteine werden in Transport-Vesikel verpackt und durch axonalen Transport zum Ort sich entwickelnder synaptischer Kontaktstellen gebracht. Durch Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran kommt es zur Lokalisation der Aktive Zone Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass für die Zusammensetzung einer einzelnen Aktiven Zone in kultivierten Neuronen des Hippocampus zwei bis drei Transport-Vesikel benötigt werden (Zhai et al., 2001; Shapira et al.,

2003). Auch die Dichte Aktiver Zonen innerhalb eines Boutons wird sehr stark reguliert. Es zeigte sich, dass es für benachbarte Aktive Zonen einen Minimalabstand gibt, sodass jede Aktive Zone sowohl ausreichend Zugriff auf den Pool synaptischer Vesikel, als auch genügend Raum zum Recycling der Vesikelmembranen hat (Meinertzhagen et al., 1998).

#### 1.4 Das Bruchpilot-Protein von *Drosophila melanogaster*

Bruchpilot (BRP) wurde 2006 von Wagh et al. als erstes Aktive Zone-Protein von *Drosophila* entdeckt und charakterisiert. Durch Sequenzvergleiche konnte BRP als das Homolog des Aktive Zone-Proteins ELKS/CAST/ERC von Vertebraten identifiziert werden, das an den Aktiven Zonen einen großen Komplex mit anderen Proteinen der CAZ, wie Munc-13, RIM1, Piccolo und Bassoon bildet (s. Abb. 5A). Piccolo enthält Protein-Protein-Interaktionsdomänen und soll zusammen mit Bassoon sowohl durch Bindung von RIM1, Munc-13 und den CAZ-assoziierten Strukturproteinen ELKS/CAST/ERC, als auch durch Interaktion mit Proteinen des Cytoskeletts für die Strukturierung der Aktiven Zone verantwortlich sein (Fenster et al., 2000). Für die sehr großen Proteine Piccolo mit 530 kDa und Bassoon mit einem Molekulargewicht von 420 kDa scheinen im *Drosophila*-Genom keine Homologe kodiert zu sein. Stattdessen werden offenbar zwei Funktionen von einem einzigen Protein erfüllt, denn die signifikante Sequenzhomologie der N-terminalen Domäne von BRP zu den CAST-Proteinen der Vertebraten macht es zu einem AZ-Strukturprotein, während die lange C-terminale Domäne von ca. 1000 Aminosäuren mit ihren 'coiled-coil'-Strukturen an das an Intermediärfilamente bindende Plectin erinnert und so möglicherweise die Bindung an das Cytoskelett vermittelt.

In Übereinstimmung mit der Annahme, BRP sei eine Komponente der Aktiven Zone aller präsynaptischen Terminals, zeigten *in situ* Hybridisierungen an *Drosophila*-Embryonen, dass BRP spezifisch im sich entwickelnden neuronalen Gewebe exprimiert wird (Wagh et al., 2006).

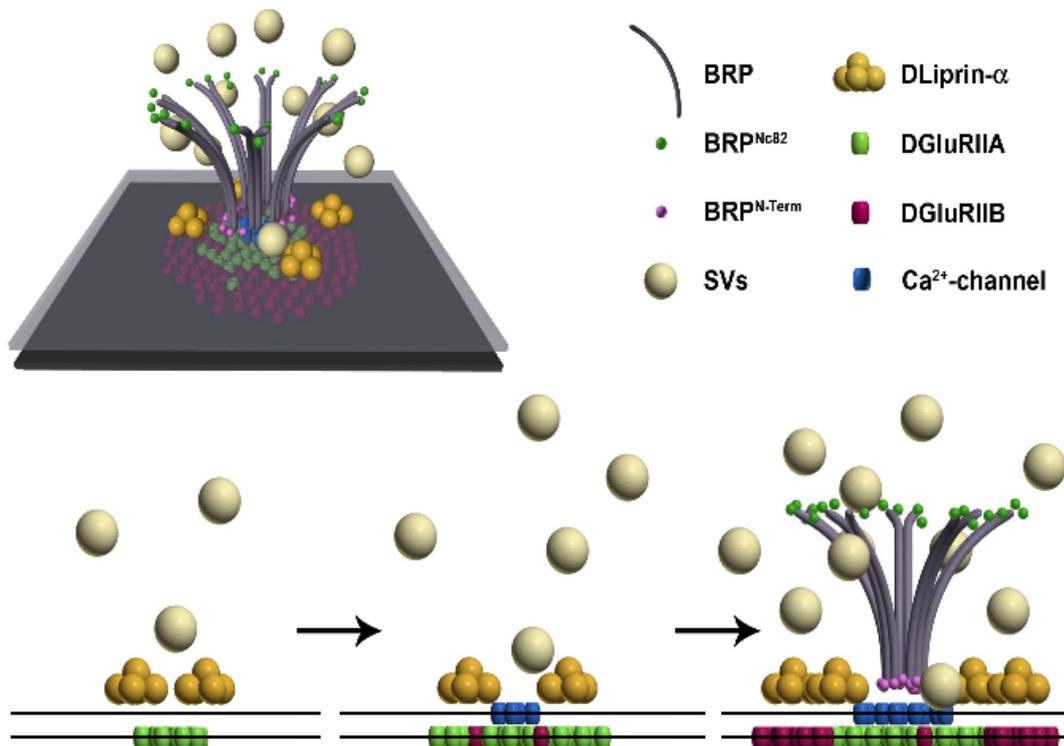
Wie Immuno-elektronenmikroskopische Studien belegten (Fouquet et al., 2009), ist BRP direkter struktureller Bestandteil der T-Bars von *Drosophila* und so orientiert, dass der N-Terminus des Proteins sich näher an der Plasmamembran befindet als der C-Terminus, welcher in das Cytoplasma ragt. Bereits früher konnte mit Hilfe der STED-Mikroskopie demonstriert werden, dass BRP in Form Donut-artiger Ringe an den Aktiven Zonen neuromuskulärer Synapsen vorliegt (Kittel et al., 2006).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Verlust von BRP durch RNA-Interferenz vermittelten Knock-down in adulten Fliegen morphologisch zu einem totalen Verlust von T-Bars in

Photorezeptor-Terminals und physiologisch zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Übertragung von den Photorezeptoren R1 bis R6 auf nachgeschaltete Interneurone in der Lamina führt (Wagh et al., 2006). Bei Studien an der neuromuskulären Synapse von Larven, welche verschiedene *brp*-RNAi-Konstrukte unter der Kontrolle des pan-neuronalen Treibers *elav-Gal4* exprimierten, stellte man fest, dass die durch ein Aktionspotential ausgelöste Neurotransmitter-Ausschüttung gestört ist. Außerdem war die Zahl an T-Bars in den Boutons dieser Larven stark vermindert. Gleichwohl verursachte der präsynaptische Verlust von BRP weder eine Reduktion der Größe oder Anzahl postsynaptischer Rezeptorfelder, noch waren Größe und Zahl präsynaptischer Boutons im allgemeinen verändert. Die Verteilung anderer synaptischer Proteine wie Synapsin, CSP, Syntaxin oder Dynamin an der NMJ war ebenfalls unverändert. Dennoch zeigten die *brp*-RNAi-Fliegen auf verhaltensanalytischer Ebene mehrere stark ausgeprägte Phänotypen. So fanden Wagh et al. einen hohen Prozentsatz flugunfähiger Tiere. Auch die negative Geotaxis, sowie die spontane Laufaktivität auf einer ebenen Fläche ist bei den Experimentaltieren im Vergleich zu den Kontrollen dramatisch reduziert.

Im gleichen Jahr erschien eine weitere Publikation zur Funktion des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot. Kittel et al. (2006) isolierten aus einer Transposon-vermittelten Mutagenese eine Mutante (*brp<sup>69</sup>*), in der nahezu das gesamte offene Leseraster des *brp*-Gens deletiert ist. Morphologisch waren in diesen Mutanten geringfügig kleinere NMJs mit weniger Synapsen zu beobachten. Auch waren auf lichtmikroskopischer Ebene einzelne postsynaptische Rezeptorfelder vergrößert, was sich auf elektronenmikroskopischer Ebene in einer Ausdehnung der PSD äußerte. Auf ultrastruktureller Ebene ist diese Mutante gekennzeichnet durch den totalen Verlust von T-Bars an präsynaptischen Aktiven Zonen. Elektrophysiologische Experimente zeigten bei Stimulation eine drastische Abschwächung der Amplitude postsynaptischer Potentiale und eine verzögerte Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran. Die Ursache für diese verminderte Synchronisierung von Entleerung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt mit dem Eintreffen eines Aktionspotentials in der präsynaptischen Endigung ist eine reduzierte Dichte von Calcium-Kanälen an der Aktiven Zone dieser *brp*-Mutanten. Bruchpilot ist also nicht nur wichtig für eine intakte Struktur Aktiver Zonen, sondern auch für eine normale Funktionsweise durch lokale Anhäufung von Calcium-Kanälen an den Aktiven Zonen, wahrscheinlich durch eine direkte molekulare Interaktion mit intrazellulären Domänen der Calcium-Kanäle (Fouquet et al., 2009). Konfokal- und STED-Mikroskopie erlaubten die Rekonstruktion der Lage von Bruchpilot und Calcium-Kanälen zueinander, wie aus Abbildung 8 hervorgeht. Auf ähnliche Weise wurde nicht nur die Anordnung weiterer AZ-Komponenten wie DLiprin- $\alpha$  und DSyd-1 in Bezug auf beide Proteine bestimmt, sondern auch ein Raum-Zeit-Modell der Organisation der AZ und ihrer Entstehung entwickelt

(Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010; s. auch Abb. 7B).



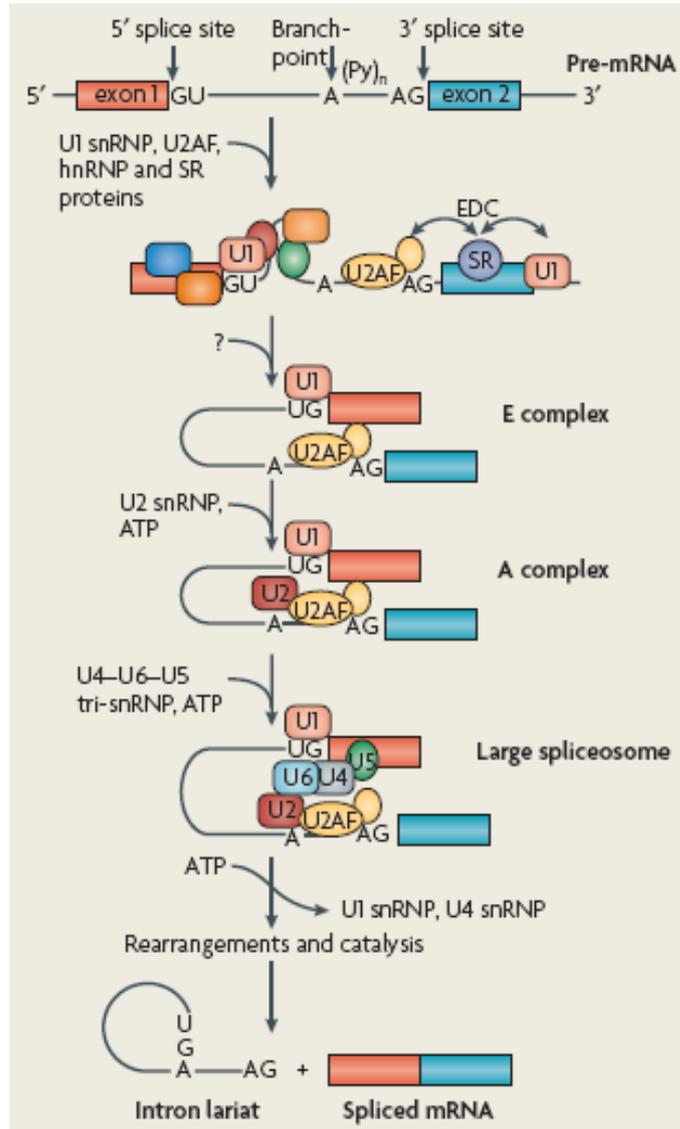
**Abbildung 8: Die Aktive Zone von *Drosophila*.** Entnommen aus Fouquet et al., 2009. Obere Reihe: Am Aufbau beteiligte Komponenten und ihre Orientierung zueinander. Die N-Termini von Bruchpilot befinden sich näher an der Plasmamembran als die C-Termini. Untere Reihe: Raum-Zeit-Modell der AZ-Entwicklung. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Journal of Cell Biology.

Inzwischen wurden Mutationen mehrerer anderer Gene beschrieben, die eine Fehlverteilung von BRP zur Folge haben. Der Verlust von *wishful thinking* (*wit*), eines auch in Motoneuronen exprimierten BMP Typ II-Rezeptors zur Bindung des 'bone morphogenetic protein' (BMP) 'Glass bottom boat' (*Gbb*) (Marqués, 2005), führt beispielsweise zu frei beweglichen T-Bar-Strukturen im Cytoplasma (Aberle et al., 2002; Marqués et al., 2002). Ist die kleine GTPase Rab3 nicht vorhanden, sind Schlüsselkomponenten der präsynaptischen Maschinerie zur Transmitter-Ausschüttung wie Bruchpilot, Calcium-Kanäle und T-Bars an sogenannten Super-Aktiven Zonen konzentriert, während der Mehrzahl der Fusionsstellen diese Proteine und Strukturen fehlen (Graf et al., 2009). Das zeigt, dass Rab3 nicht nur im synaptischen Zyklus eine Rolle spielt, sondern zusätzliche Funktionen bei der Lokalisierung präsynaptischer Proteine an Aktiven Zonen erfüllt. Bei Fehlen der Serin/Threonin-Kinase Unc-51 kommt es einerseits zur Bildung aberranter Synapsen ohne Bruchpilot und T-Bars, und andererseits zur Akkumulation von BRP in larvalen Axonen

(Wairkar et al., 2009), ähnlich dem Phänotyp, der bei Mutation des *Srpk79D*-Gens von *Drosophila* auftritt, welches eine SR Proteinkinase kodiert (Nieratschker et al., 2009). Bei den SR Proteinkinasen handelt es sich um eine Familie evolutionär hochkonservierter Kinasen, die auf die Phosphorylierung von SR-Proteinen spezialisiert sind. Die SR-Proteine bilden ebenfalls eine Familie hochkonservierter Proteine und sind am Prozess des Spleißens beteiligt. Da die SRPK79D Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, sollen im folgenden Kapitel zunächst die Vorgänge beim Spleißen erläutert werden, bevor in Paragraph 1.7. auf die Struktur und Funktion von SR Proteinkinasen näher eingegangen wird. Die SR-Proteine als Substrate der SR Proteinkinasen sind Thema des Absatzes 1.6.

## 1.5 Mechanismen konstitutiven und alternativen Spleißens

Eukaryotische Gene sind aus Exons, die 5' und 3' nicht-translatierte Sequenzen und die kodierenden Regionen enthalten, und nicht-kodierenden Bereichen, den Introns, aufgebaut. Bei der Transkription im Zellkern entsteht zunächst eine prä-messenger RNA, die exakt die im Genom vorgegebene Abfolge von Exons und den dazwischen liegenden Introns widerspiegelt. Dieses Primärtranskript durchläuft einige Prozessierungsschritte, bevor es als reife mRNA in das Cytoplasma transportiert und an Ribosomen translatiert werden kann. Neben dem 5'-Capping und der 3'-Polyadenylierung wird die prä-mRNA dem Spleißen unterzogen, einem Prozess, bei dem durch zwei Umesterungen die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die Exons zu einer durchgängig kodierenden Sequenz verknüpft werden. Dafür ist zuerst die Bildung des Spleißosoms notwendig, eines großen Komplexes aus Ribonucleoproteinpartikeln (snRNPs), der neben Proteinen auch RNA-Moleküle, die snRNAs (small nuclear RNAs) enthält. Die Enden nukleärer Introns sind durch die GT-AG-Regel definiert, die besagt, dass ein Intron zu 100% mit dem Dinukleotid GT (GU auf RNA-Ebene) beginnt und ebenso mit dem Dinukleotid AG endet. Diese Consensussequenzen werden auch als 5'- bzw. 3'-Spleißstelle bezeichnet. Die 'branch site' (Verzweigungsstelle) ist eine weitere konservierte Sequenz und enthält unter anderem die invariante Base Adenin. Der nahe der 3'-Spleißstelle und stromabwärts der 'branch site' gelegene Pyrimidintrakt stellt einen Abschnitt von zehn Pyrimidinen dar, an den der U2 Hilfsfaktor (U2 auxiliary factor, U2AF) bindet. Wie Abbildung 9 verdeutlicht, erfolgt die Spleißreaktion in mehreren abgrenzbaren Schritten, in denen sich das Spleißosom nach und nach zusammenlagert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Vorgänge beim Spleißen.** Entnommen aus Li et al., 2007. Beschreibung der einzelnen Schritte siehe Text. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch Nature Reviews Neuroscience.

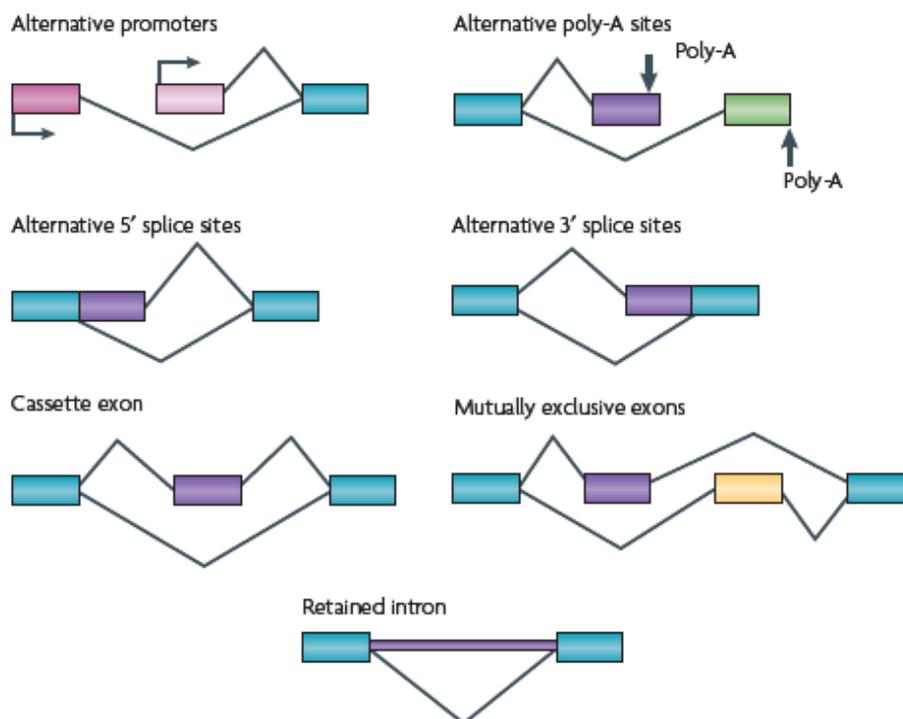
Zuallererst lagert sich das U1 snRNP durch Basenpaarungen der U1 snRNA an die 5'-Spleißstelle an, und der Spleißfaktor U2AF bindet an den Pyrimidintrakt. Dieser E-Komplex ('early presplicing complex') geht dann in den A-Komplex über, wenn das U2 snRNP an die Verzweigungsstelle bindet. Auch bei diesem Schritt spielen komplementäre Basenpaarungen zwischen der U2 snRNA und der Sequenz der 'branch site' eine Rolle. Der A-Präspleiß-Komplex enthält auch Spleißfaktoren aus der Familie der SR-Proteine, deren Aufgabe es ist, das U1 snRNP mit dem U2 snRNP und dem U2AF in räumliche Nähe zueinander zu bringen, denn deren Bindungsstellen auf der prä-mRNA können im Falle eines langen Introns sehr weit auseinander liegen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung des B-Komplexes durch die Anlagerung eines Trimers aus den snRNPs U4/U6-U5.

Auch hierbei kommt den SR-Spleißfaktoren eine bedeutende Rolle zu (Roscigno und Garcia-Blanco, 1995). Ab diesem Stadium spricht man vom eigentlichen Spleißosom. Zur Durchführung der katalytischen Reaktionen ist im folgenden eine Reihe von Umordnungen im Spleißosom nötig. Das U1 snRNP wird aus dem Komplex entlassen, und an seiner Statt bindet das U6 snRNP an die 5'-Spleißstelle. Die katalytische Reaktion wird durch die Freisetzung des U4 snRNPs aus dem Komplex ausgelöst. Durch Hydrolyse von ATP wird die nötige Energie bereitgestellt, um die Basenpaarung zwischen dem U6 snRNP und dem U4 snRNP aufzulösen, sodass das U6 snRNP nach Konformationsänderung eine Basenpaarung mit dem U2 snRNP eingehen kann. Das U6/U2-Dimer katalysiert die erste Umesterung, bei der das 5'-Guanin des Introns über eine 5'-2'-Bindung mit dem Adenosin der 'branch site' verbunden wird, wodurch eine Lariat-Struktur entsteht. Zwischenzeitlich ist das U5 snRNP an die 3'-Spleißstelle gewandert. Nun erfolgt der nucleophile Angriff des freien 3'-OH-Endes des stromaufwärts gelegenen Exons auf das 5'-Phosphat des stromabwärts liegenden Exons. Diese Reaktion stellt die zweite Umesterung dar, aus der die ligierten Exons und das Intron in Form eines Lassos hervorgehen. Die Lariatstruktur wird aufgelöst und das lineare RNA-Molekül abgebaut.

Das Spleißen verläuft nicht zwangsläufig prozessiv vom 5'- zum 3'-Ende einer prä-mRNA. Außerdem bietet es vielfältige Möglichkeiten zur posttranskriptionellen Genregulation, denn neben dem konstitutiven Spleißen, bei dem alle Introns aus dem Primärtranskript entfernt und alle Exons zusammengefügt werden, gibt es eine Reihe von alternativen Optionen, wie Introns herausgeschnitten und Exons verbunden werden können. Die verschiedenen Alternativen sind in Abbildung 10 zusammengefasst. In jedem Fall entscheidet die Bildung des Lariats an der 'branch site' über die Wahl der 3'-Spleißstelle, da die in 3'-Richtung am nächsten liegende Stelle für die zweite Umesterung benutzt wird.

Neben der Möglichkeit der Benutzung unterschiedlicher Promotoren zum Transkriptionsstart oder verschiedener Terminationsstellen zur Beendigung der Transkription führt auch die Verwendung alternativer 5'- bzw. 3'-Spleißstellen zur Entstehung diverser mRNAs. Bei der E1A-Region des Adenovirus erfolgt Spleißen wechselnder 5'-Stellen mit einer 3'-Stelle (Yomoda et al. 2008), ebenso bei den T/t-Antigenen von SV40 (Ge und Manley, 1990), die zur Regulation der Transkription und der Initiation der Replikation des Virus-Genoms vonnöten sind. Das Spleißen einer 5'-Stelle mit alternativen 3'-Stellen gibt es beispielsweise bei der *transformer (tra)*-prä-mRNA von *Drosophila*, einem zur Festlegung des Geschlechts benötigten Protein (Penalva und Sánchez, 2003). Beim 'Exon Skipping' wird statt der nächstgelegenen 3'-Spleißstelle die übernächste benutzt, wodurch das Exon als ganze Kasette mit den angrenzenden Intronsequenzen entfernt wird, sodass eine gegebene Sequenz entweder exonischer oder intronischer Natur sein kann. Dieser Mechanismus wird

wiederum bei der Geschlechtsdetermination von *Drosophila* verwendet, wo das Spleißen der *doublesex (dsx)*-prä-mRNA geschlechtsspezifisch erfolgt. Bei Weibchen ist das Exon 4 Bestandteil der *dsx*-mRNA, während es in Männchen herausgespleißt wird, wodurch Proteine mit unterschiedlichen C-Termini entstehen, deren Funktion die Unterdrückung geschlechtsdifferenzierender Gene des jeweils anderen Geschlechts ist. Den gegenseitigen Ausschluss von Exons ('Mutually exclusive exons') findet man zum Beispiel beim  $\alpha$ -Tropomyosin der Ratte (Wieczorek et al., 1988), wo in verschiedenen Geweben unterschiedliche Protein-Isoformen entstehen. 'Intron Retention' bedeutet alternativen Ein- oder Ausschluss eines Introns.

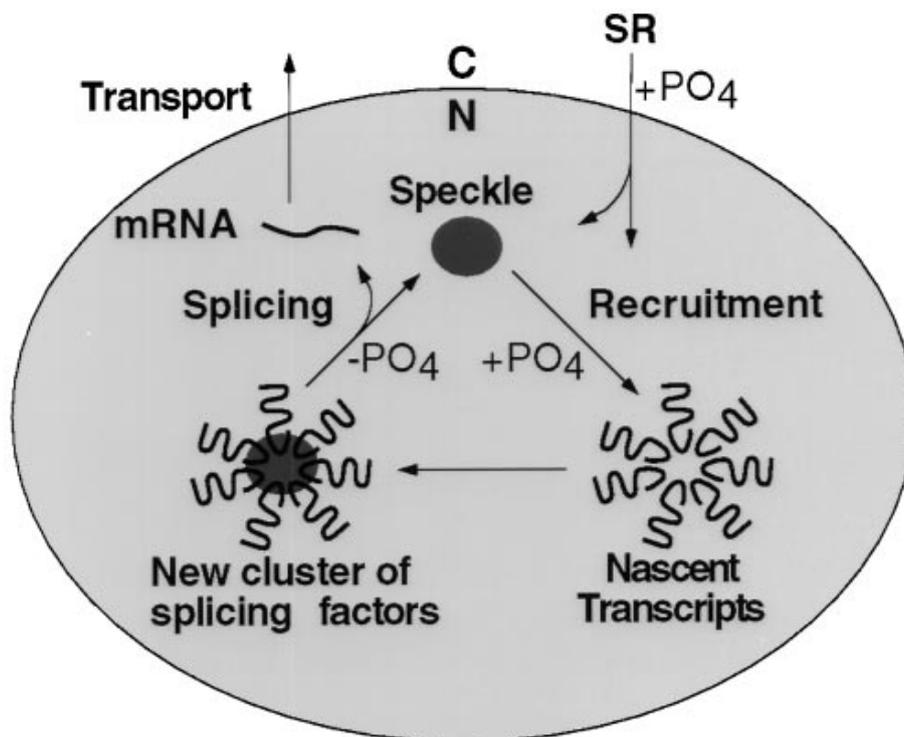


**Abbildung 10: Möglichkeiten zur Erzeugung verschiedenartiger Transkripte.** Entnommen aus Li et al., 2007. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch Nature Reviews Neuroscience.

Das Ergebnis des alternativen Spleißens ist in allen Fällen die Bildung verschiedener Protein-Isoformen mit möglicherweise unterschiedlichen Funktionen. Somit ist das alternative Spleißen ein geeigneter Regulationsmechanismus zur Expression einzelner Isoformen eines Proteins in bestimmten Zellen oder Geweben, oder zu einem genau definierten Zeitpunkt der Entwicklung beispielsweise.

## 1.6 Struktur und Funktion der SR-Proteine

Am Spleißen von prä-mRNA sind eine ganze Reihe von Spleißfaktoren beteiligt. Neben den Kern-Proteinen, die allen snRNPs gemeinsam sind, enthalten diese auch Proteine, die spezifisch für ein einzelnes snRNP sind (Mount und Salz, 2000). Daneben ist eine Gruppe von Proteinen am Spleißvorgang beteiligt, die als SR-Proteine bezeichnet werden und nicht Bestandteil der snRNPs sind. Dabei handelt es sich um eine Familie hochkonservierter nukleärer Phosphoproteine (Roth et al., 1991; Zahler et al., 1992; Fu, 1995; Manley und Tacke, 1996). Allen diesen Proteinen gemeinsam ist eine Domänenstruktur, bestehend aus einer oder zwei N-terminalen RNA-Bindungsdomänen ('RNA recognition motif, RRM') und einer C-terminalen RS-Domäne variabler Länge mit einer Abfolge alternierender Arginin/Serin-Dipeptide, welche zur Namensgebung führte und Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Kohtz et al., 1994; Manley und Tacke, 1996; Graveley, 2000; Ma et al., 2008).

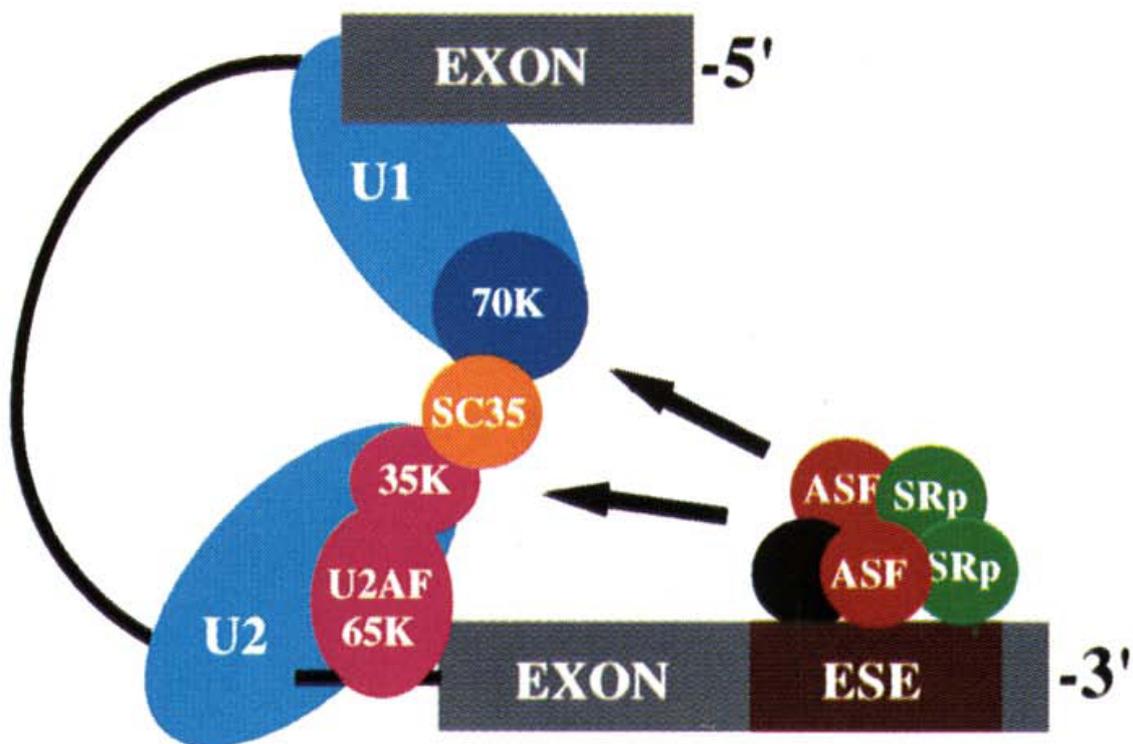


**Abbildung 11: Modell für zelluläre Bewegungen von SR-Proteinen in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand.** Entnommen aus Yeakley et al., 1999. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Journal of Cell Biology.

Die Serin-Reste der RS-Domäne dieser SR-Proteine sind Substrat für die SR Proteinkinasen, die

eine ebenfalls hochkonservierte Familie von Proteinen bilden, deren Mitglieder auf die Phosphorylierung der SR-Proteine spezialisiert sind (Gui et al., 1994a; Gui et al., 1994b). Auf der einen Seite beeinflusst der Phosphorylierungszustand der SR-Proteine ihre Lokalisation in der Zelle, wie Abbildung 11 zeigt (Yeakley et al., 1999), denn im Cytoplasma vorliegende SR-Proteine werden nach Phosphorylierung in den Zellkern transportiert und entweder direkt zu Stellen aktiver Transkription rekrutiert (Roth et al., 1991), oder an speziellen Speicherorten ('nuclear speckles') deponiert, von denen sie – wiederum durch Phosphorylierung gesteuert – freigesetzt und zu Transkriptionsorten gebracht werden (Gui et al., 1994b; Colwill et al., 1996b; Misteli et al., 1998). Auf der anderen Seite werden Interaktionen der SR-Proteine mit anderen Proteinen und RNA durch die Phosphorylierung der RS-Domäne gesteuert (Kohtz et al., 1994; Manley und Tacke, 1996; Xiao und Manley, 1997; Yeakley et al., 1999). So wurde gezeigt, dass die unspezifische Bindung der nicht-phosphorylierten RS-Domäne des alternativen Spleißfaktors/Spleißfaktor2 (ASF/SF2, 'alternative splicing factor/splicing factor 2) durch das Anfügen von Phosphatresten aufgehoben wird (Xiao und Manley, 1997; Yeakley et al., 1999).

In zahlreichen weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass SR-Proteine wesentlich die Abläufe beim Spleißen regulieren. Sie sind nötig bei generellen Prozessen wie der Bildung und Stabilisierung des sehr frühen Prä-Spleißosom-Komplexes (Krainer et al., 1990a). Der erste Schritt im Aufbau des Spleißosoms, nämlich die Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP, erfolgt in Zusammenarbeit mit SR-Proteinen (Jamison et al., 1995; Zahler und Roth, 1995). Dabei bindet das SR-Protein ASF/SF2 an das SR-verwandte U1-70K-Protein, ein für das U1 snRNP spezifisches Protein (Kohtz et al., 1994). Diese direkte Interaktion erfolgt über die RS-Domänen beider Proteine und findet auch in Abwesenheit von prä-mRNA statt. Auch für den Spleißfaktor SC35 ('spliceosome component of 35 kDa') konnte belegt werden, dass er in Wechselwirkung mit dem U1-70K-Protein des U1 snRNPs tritt und somit bei der Erkennung der 5'-Spleißstelle mitwirken könnte (Wu und Maniatis, 1993). Außerdem ist SC35 in der Lage, an die 35 kDa-Untereinheit des U2AF zu binden, der als essentieller Spleißfaktor für die Bindung des U2 snRNPs an die Verzweigungsstelle im Intron wichtig ist. U2AF ist ein Heterodimer aus einer 35 kDa und einer 65 kDa großen Untereinheit, die auch zur Familie der SR-verwandten Proteine gehören (Blencowe, 2000). Durch die mannigfaltigen Protein-Protein-Interaktionen werden so 5'- und 3'-Spleißstelle miteinander verknüpft (siehe Abbildung 12 aus Manley und Tacke, 1996). Auch beim Übergang vom Prä-Spleißosom zum Spleißosom spielen SR-Proteine eine wichtige Rolle, indem sie das U4/U6-U5 snRNP-Trimer zum Spleißosom eskortieren (Roscigno und Garcia-Blanco, 1995).



**Abbildung 12: Beteiligung von SR-Proteinen an der Spleißosom-Bildung.** Entnommen aus Manley und Tacke, 1996. Durch die gleichzeitige Bindung an Proteine der 5'- und 3'-Spleißstelle schlägt SC35 eine Brücke und überführt so den Spleißapparat in eine reaktive Konformation. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch Genes and Development.

SR-Proteine regulieren auch alternative Spleißvorgänge, indem sie die Wahl alternativer 5'- bzw. 3'-Spleißstellen steuern (Ge und Manley, 1990; Krainer et al., 1990b; Fu et al., 1992; Eperon et al., 1993; Zahler et al., 1993; Zahler und Roth, 1995). So können sie die Wahl einer schwachen Spleißstelle begünstigen, indem sie an Sequenzen im Exon binden, die als exonische Spleißverstärker ('exonic splicing enhancer', ESE) bezeichnet werden (Blencowe, 2000). Auf die gleiche Art und Weise funktionieren abschwächende exonische Sequenzen ('exonic splicing silencer', ESS), wobei die Bindung von SR-Proteinen hier die Verwendung proximaler Spleißstellen inhibiert (Wang et al., 2006). Die Funktion der SR-Proteine scheint redundant zu sein, denn *in vitro* kann jedes Mitglied der SR-Proteinfamilie einen Spleißdefekten Zellextrakt, dem jegliche SR-Proteine fehlen, komplementieren (Zahler et al., 1993). Dennoch wurde festgestellt, dass bestimmte SR-Proteine verschiedene Funktionen beim alternativen Spleißen erfüllen. So haben einzelne SR-Proteine unterschiedliche Fähigkeiten, die Interaktion des U1 snRNPs mit alternativen 5'-Spleißstellen zu vermitteln (Zahler und Roth, 1995), was auf eine gewisse Substratspezifität der SR-Proteine hinweist (Fu, 1993). Das bedeutet, dass verschiedene Kombinationen von SR-Proteinen für

das Spleißen unterschiedlicher prä-mRNAs erforderlich sind. Zusätzlich weicht die Expression der SR-Proteine in den einzelnen Geweben voneinander ab, sodass die absolute Menge eines bestimmten SR-Proteins und die relativen Mengen der SR-Proteine untereinander die bevorzugten Spleißstellen in einer gegebenen Zelle festlegen und so zur Regulation der Genexpression beitragen (Zahler et al., 1993).

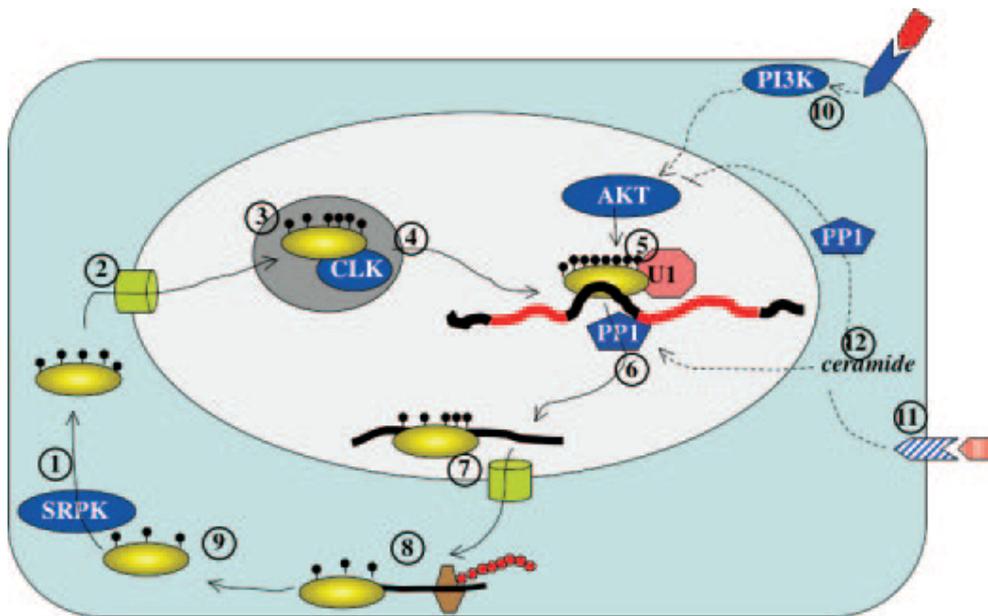
Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Drosophila melanogaster* führte zur Identifizierung von sieben SR-Proteinen (SC35, ASF/SF2, B52/SRp55, 9G8/DX16, RBP1, RBP1-like und SRp54), die allesamt Homologe in Säugern haben (Adams et al., 2000; Mount und Salz, 2000). Diese starke Konservierung im Laufe der Evolution gibt einen Hinweis auf die fundamentale Rolle, die SR-Proteine bei der Regulation von konstitutivem und alternativem Spleißen innehaben.

### 1.7 Struktur und Funktion der SR Proteinkinasen (SRPKs)

In der Vergangenheit konnten zwei Kinasefamilien identifiziert werden, deren Aufgabe die Phosphorylierung von SR-Proteinen ist. Es handelt sich dabei um die Familie der SR Proteinkinasen und die der LAMMER-Kinasen. Die Clk/Sty Proteinkinase aus Säugern ist der Prototyp der LAMMER-Kinasen mit der besonderen Eigenschaft, sowohl Serin- und Threonin-, als auch Tyrosinreste phosphorylieren zu können. Abgesehen von der Homologie, die sich über die gesamte Kinasedomäne erstreckt, besitzen die einzelnen Familienmitglieder ein hochkonserviertes Motiv (EHLAMMERILGPLP) in einer Subdomäne der Kinasedomäne, woher der Name dieser evolutionär konservierten Familie von Proteinkinasen herrührt (Colwill et al., 1996b). Die für SR-Proteine spezifische Kinase Clk/Sty wurde in einem Yeast two-hybrid Screen entdeckt, in dem mehrere Mitglieder der SR-Proteinfamilie isoliert wurden. Clk/Sty gehört zur Superfamilie der SR-Proteine, da die Kinase N-terminal selbst eine RS-Domäne besitzt, die für die Assoziation mit den SR-Spleißfaktoren wichtig ist. Während die Clk/Sty Kinase *in vitro* Serin-Arginin-, Serin-Lysin- oder Serin-Prolin-Stellen phosphorylieren kann, zeigt die SRPK1 eine starke Präferenz für Serin-Arginin-Stellen, was bedeuten könnte, dass beide Kinasefamilien möglicherweise unterschiedliche Rollen bei der Regulation der SR-Spleißfaktoren spielen, da das Spektrum möglicher Substrate im Falle von Clk/Sty größer ist (Colwill et al., 1996a). Untersuchungen zur Funktion der Clk/Sty ergaben, dass eine katalytisch inaktive Form der Kinase mit SR-Proteinen in den 'nuclear speckles' ko-lokalisiert, wohingegen die Expression einer aktiven Clk/Sty Kinase zu einer normalen Verteilung der SR-Proteine im Zellkern führt. Somit reguliert die Clk/Sty Kinase Aktivität und Lokalisation von SR-Spleißfaktoren. Zur LAMMER-Familie gehört auch die Kinase Doa von

*Drosophila melanogaster* (Yun et al., 1994).

Die SRPKs bilden die zweite Familie evolutionär konservierter SR-Protein-spezifischer Kinasen. Obgleich es nur eine 32%ige Übereinstimmung zwischen den Kinasedomänen der SRPK1 und der Clk/Sty Kinase gibt (Colwill et al., 1996), erfüllen SRPKs ähnliche Funktionen und erkennen und phosphorylieren die RS-Domäne der SR-Proteine, wodurch es zur Auflösung der 'nuclear speckles', den Speicherorten der Spleißfaktoren, kommt.



**Abbildung 13: Modell zur Phosphorylierung und zum Transport von ASF/SF2.** Entnommen aus Stamm, 2008. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Journal of Biological Chemistry. Zunächst wird das RS1-Motiv von ASF/SF2 (gelbes Oval) im Cytoplasma (hellblau) durch die SRPKs phosphoryliert (1). Dieses hypophosphorylierte Protein wird durch Transportin-SR (grüner Zylinder), einen ebenfalls zur Überfamilie der SR-Proteine gehörenden Transporter (Allemand et al., 2002), in den Zellkern (hellgrau) transloziert (2) und in 'nuclear speckles' (dunkelgrau) deponiert (3). Die Entlassung aus den Speicherorten erfordert die Hyperphosphorylierung durch die Clk/Sty Kinase (4). Nach Dephosphorylierung durch PP1 (6) wird ASF/SF2 aus dem Kern exportiert (7). In manchen Fällen bleibt ASF/SF2 mit der mRNA assoziiert und erleichtert so deren Translation (8). Nach Freisetzung des Spleißfaktors kann der Zyklus von Neuem beginnen. Bekannte Signal-Transduktionskaskaden regulieren diese Phosphorylierungsereignisse. Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase-Weges durch Wachstumshormone oder Insulin-Rezeptoren führt zu Stimulierung von Akt, das SF2/ASF phosphoryliert (10). Der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) erhöht den zellulären Spiegel an Ceramiden (11), die ihrerseits die PP1 aktivieren, die sowohl SF2/ASF, als auch Akt dephosphoryliert (12).

Ein Überfluss an SRPK1 inhibiert das Spleißen allerdings *in vitro*, ebenso eine Blockierung aller Phosphatasen, da Dephosphorylierung für die Umesterung wichtig ist (Stamm et al., 2008). Das zeigt, dass Dephosphorylierung ebenfalls einen entscheidenden Mechanismus bei der Regulation

von Spleißvorgängen darstellt (Gui et al., 1994a; Gui et al., 1994b). Einem Modell zufolge bestimmt das Zusammenspiel der Kinasen SRPK1 und Clk/Sty, sowie der Proteinphosphatase 1 (PP1) den Phosphorylierungsstatus und die subzelluläre Lokalisation des Spleißfaktors ASF/SF2, wie in Abbildung 13 dargestellt ist (Ngo et al., 2005; Stamm et al., 2008).

Auf die Identifizierung der humanen SRPK1 folgte die Entdeckung und Charakterisierung weiterer SR-Protein-spezifischer Kinasen. Die SRPK1 und 2 der Maus sind zu 92% bzw. 58% identisch mit der humanen SRPK1. Die SRPK1 des Menschen wird im Pankreas und die SRPK2 im Gehirn stark exprimiert, obwohl in anderen menschlichen Geweben Ko-Expression beider Kinasen vorliegt (Wang et al., 1998). Northern Blot-Analysen der Maus zeigten eine ubiquitäre Expression der mSRPK1 in allen Geweben, mit verstärkter Expression in den Hoden, und eine gewebespezifische Expression der mSRPK2 in Gehirn, Lunge und Hoden (Kuroyanagi et al., 1998). In den Hoden soll SRPK1 während der Spermatogenese das sehr basische Protein Protamin 1 innerhalb seiner RS-Domäne phosphorylieren. Protamine ersetzen die Histone im Chromatin, was eine extreme Chromatin-Kondensation ohne jegliche transkriptionelle Aktivität zur Folge hat (Papoutsopoulou et al., 1999b). Eine weitere Kinase, die SRPK3 (Stk23) der Maus ist eine Muskel-spezifische Kinase, deren Verlust zum Krankheitsbild der Zentronukleären Myopathie führt (Nakagawa et al., 2005).

*In vitro* Kinase-Assays deuteten auf eine weitere neue Funktion der SRPK1 hin, denn die humane Kinase modifiziert den Lamin B-Rezeptor (LBR) mit der gleichen Kinetik und an genau denselben Stellen wie die LBR-assoziierte Kinase. Der Lamin B-Rezeptor ist ein integrales Protein der inneren Kernmembran, über das die aus Laminen bestehende Kernfaserschicht an der Membran verankert wird, was wesentlich zur Stabilität beiträgt. Auch LBR enthält einen Abschnitt von RS-Dipeptid-Wiederholungen in der N-terminalen Region, die spezifisch von der LBR-assoziierten Kinase phosphoryliert werden (Papoutsopoulou et al., 1999a).

In HeLa-Zellen wurden SRPK1 und 2 als Bestandteile des Spleißosoms beschrieben. Dabei ist SRPK1 mit dem U1 snRNP und SRPK2 mit dem U4/U6-U5 snRNP-Trimer assoziiert, was für dessen Integration ins Spleißosom vonnöten ist (Mathew et al., 2008).

Ähnlich den LAMMER-Kinasen bilden auch die SR-Protein-spezifischen Kinasen eine evolutionär von der Hefe bis zum Menschen konservierte Familie (Takeuchi und Yanagida, 1993; Gui et al., 1994a; Kuroyanagi et al., 1998; Tang et al., 1998; Wang et al., 1999; Siebel et al., 1999; Tang et al., 2000; Tang et al., 2007; Lukasiewicz et al., 2007). Strukturell zeigt sich das an der hoch konservierten zweigeteilten Kinasedomäne, die bei allen Mitgliedern durch eine nicht konservierte Spacer-Sequenz unterbrochen ist. Dieser Spacer ist für die Lokalisation der Kinase im Cytoplasma notwendig, denn seine Entfernung aus SRPK1 hatte zwar keine Auswirkungen auf die Kinaseaktivität, bewirkte jedoch die Translokation der Kinase in den Zellkern (Ding et al., 2006).

Kristallisierungsexperimente zeigten außerdem eine große Ähnlichkeit der dreidimensionalen Strukturen von humaner SRPK1 und ihrem Homolog aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Sky1p, was auf einen ähnlichen Mechanismus der Substraterkennung hinweist (Lukasiewicz et al., 2007). Auf funktioneller Ebene zeigt sich der hohe Verwandtschaftsgrad zwischen den Kinasen verschiedener Spezies daran, dass die Expression der humanen SRPK1 in *Schizosaccharomyces pombe* den Verlust der Dsk1-Kinase kompensieren kann (Tang et al., 2000). Umgekehrt ist Sky1p, das SRPK1-Ortholog aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, in der Lage, den SR-Spleißfaktor ASF/SF2 aus Säugern prozessiv zu phosphorylieren (Lukasiewicz et al., 2007).

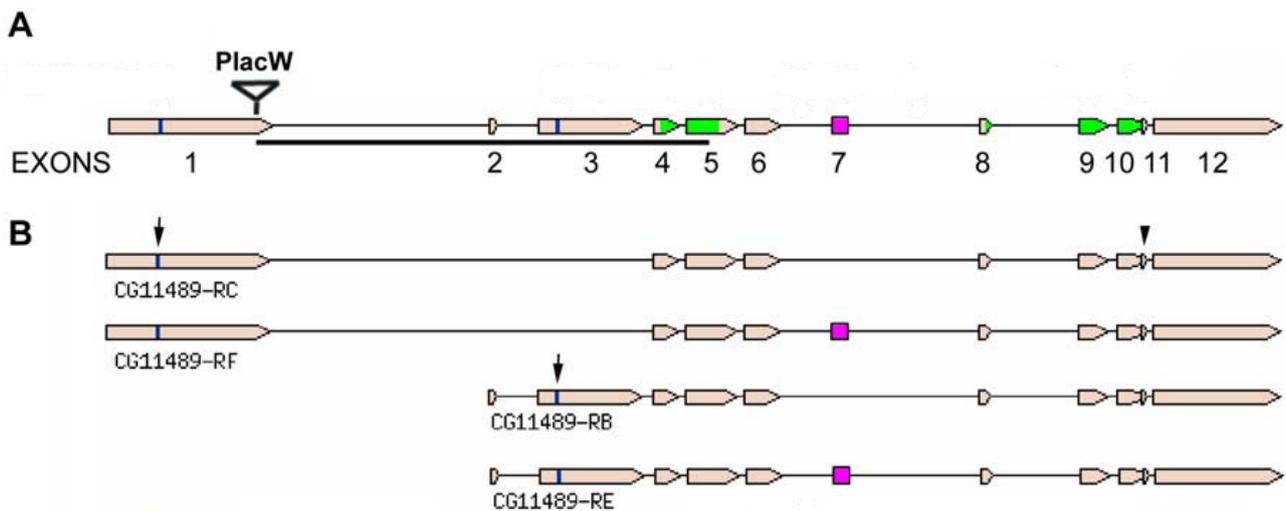
Basierend auf mehreren Arbeiten entstand ein Modell zur Arbeitsweise der SRPK1, welches besagt, dass die SRPK1 eine Andockfurchen zur Erkennung eines Andockmotivs im Substrat ASF/SF2 besitzt. Ist ASF/SF2 erst einmal an SRPK1 gebunden, phosphoryliert das Enzym die RS1-Domäne des Substrats prozessiv von C-terminal nach N-terminal, wobei der Spleißfaktor währenddessen fest mit der Kinase verbunden bleibt (Aubol et al., 2003; Ma et al., 2008; Mao et al., 2008; Ngo et al., 2008; Hagopian et al., 2008; Ma et al., 2009).

Im Genom von *Drosophila melanogaster* gibt es neben der bereits erwähnten Doa-Kinase drei weitere Gene, die für SR-Protein-spezifische Kinasen kodieren (Adams et al., 2000; Mount und Salz, 2000). Eine davon ist die SRPK79D, die im folgenden genauer beschrieben wird, da sie Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

## 1.8 Die SR Proteinkinase 79D (SRPK79D) aus *Drosophila melanogaster*

In einem Screen nach Mutanten, welche die Verteilung des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot beeinflussen und damit mögliche Interaktionspartner darstellen, ist man auf die SRPK79D gestoßen. Mutation des *Srpk79D*-Gens führt zu charakteristischen Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven (Nieratschker et al., 2009; Johnson et al., 2009). Das Gen *CG11489* für die Kinase liegt auf dem linken Arm des dritten Chromosoms an der Position 79D downstream vom *Csp*-Gen. Die Suche nach Homologien offenbarte ein hohes Maß an Verwandtschaft zwischen der Kinasedomäne der SRPK79D und denen der SRPKs aus Säugern. So gibt es 65% identische Aminosäuren bei Vergleich der Kinasedomänen von SRPK79D aus *Drosophila* und humaner SRPK3 (MSSK1). Zwischen *Dm* SRPK79D und SRPK2 des Menschen beläuft sich die Identität der Aminosäuren in der Kinasedomäne auf 54%. Das typische Merkmal der zweigeteilten Kinasedomäne, die durch eine Spacer-Region unterbrochen wird, ist auch bei der *Dm* SRPK79D vorhanden. Abbildung 14 fasst die Struktur des *Srpk79D*-Gens zusammen. Grün unterlegt sind

dabei die beiden Teile der Kinasedomäne (siehe Abbildung 14A). Dass es sich tatsächlich um eine SR-Protein-spezifische Kinase handelt, wurde *in vitro* mit Hilfe von Kinase-Assays bewiesen, denn die SRPK79D ist in der Lage, das synthetische Peptid SRPK1tide, welches den Aminosäuren 204 bis 218 des humanen SR-Proteins ASF-1/SF2 entspricht, signifikant zu phosphorylieren.

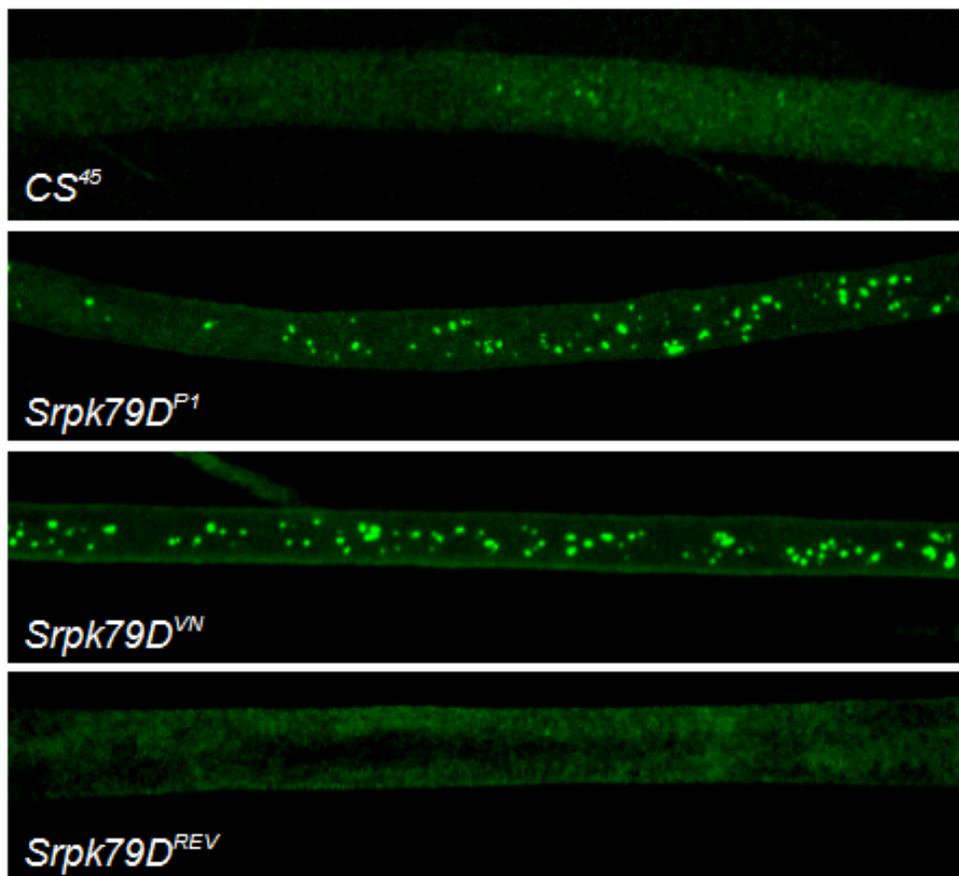


**Abbildung 14: Organisation des *Srpk79D*-Gens von *Drosophila melanogaster*.** Entnommen aus und modifiziert nach Nieratschker et al., 2009. (A) Das Gen enthält 12 Exons. Das alternative Exon 7 ist in magenta dargestellt, und die kodierenden Sequenzen für die Kinasedomäne sind in grün abgebildet. Der Sitz des P-Elements, sowie die Größe der Deletion (schwarze Linie) sind erkennbar. (B) Das *Srpk79D*-Gen wird in vier mRNAs transkribiert. Transkriptionsstartpunkte in Exon 1 und 3 sind durch Pfeile gekennzeichnet; die Pfeilspitze markiert das Stoppkodon aller mRNAs.

Bei Expression des Gens sind durch die Verwendung alternativer Transkriptionsstartpunkte in Exon 1 bzw. 3 und das Vorhandensein eines alternativen Exon 7, das in beide Transkripte gespleißt werden kann, schlussendlich vier verschiedenartige Transkripte und damit Protein-Isoformen möglich (siehe Abbildung 14B). Beginnt die Transkription in Exon 1, entstehen die Transkripte RC ohne und RF mit alternativem Exon 7, während bei Transkriptionsstart in Exon 3 die Transkripte RB ohne bzw. RE mit alternativem Exon 7 gebildet werden. Die resultierenden Isoformen PC (816 aa; 88,5 kDa), PF (869 aa; 94 kDa), PB (749 aa; 84,6 kDa) und PE (802 aa; 90,2 kDa) haben demzufolge variable N-Termini und verschieden lange Spacer, da das alternative Exon 7 einen Teil dieses Bereiches kodiert. In Abbildung 14 ebenfalls angegeben ist die Position des P-Elements im ersten Exon des Gens der Fliegenlinie *Srpk79D<sup>Pl</sup>*, wodurch der 'Open Reading Frame' (ORF) für die Protein-Isoformen PC und PF zerstört wird. Da der ORF der Isoformen PB und PE von dieser Mutation nicht betroffen ist, handelt es sich hierbei um eine hypomorphe Mutation. Durch P-

Element Jumpout-Mutagenese konnte von V. Nieratschker eine Nullmutante *Srpk79D<sup>VN</sup>* generiert werden. Die Deletion von 3861 bp umfasst die Transkriptions- und Translationsstartpunkte der RB/RE-Transkripte und entfernt die ersten 85 Kodons der hoch konservierten Kinasedomäne (schwarze Linie in Abb. 14A).

Wie bereits erwähnt, führt die Mutation des *Srpk79D*-Gens in den Fliegenlinien *Srpk79D<sup>P1</sup>* und *Srpk79D<sup>VN</sup>* zur Akkumulation von Bruchpilot in larvalen Nerven. Den gleichen Effekt hat die panneuronale Expression eines gegen alle *Srpk79D*-Transkripte gerichteten RNAi-Konstrukts. Im Vergleich dazu ist das für die Aktive Zone von *Drosophila* spezifische Protein in den Nerven von Wildtyps *CS<sup>45</sup>* und Revertante *Srpk79D<sup>REV</sup>*, die sich durch eine präzise Exzision des P-Elements auszeichnet, homogen entlang der Axone verteilt. Die Phänotypen der einzelnen Linien (ausgenommen RNAi) sind aus Abbildung 15 ersichtlich.



**Abbildung 15: Verteilungsmuster von Bruchpilot in larvalen Nerven.** Mutation des *Srpk79D*-Gens in den Fliegenlinien *Srpk79D<sup>P1</sup>* und *Srpk79D<sup>VN</sup>* führt zur Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten unterschiedlicher Größe. Durch präzises Ausschneiden des P-Elements aus dem Gen wird dieser Phänotyp zur wildtypischen Situation revertiert. Vergleiche dazu *Srpk79D<sup>REV</sup>* und *CS<sup>45</sup>*.

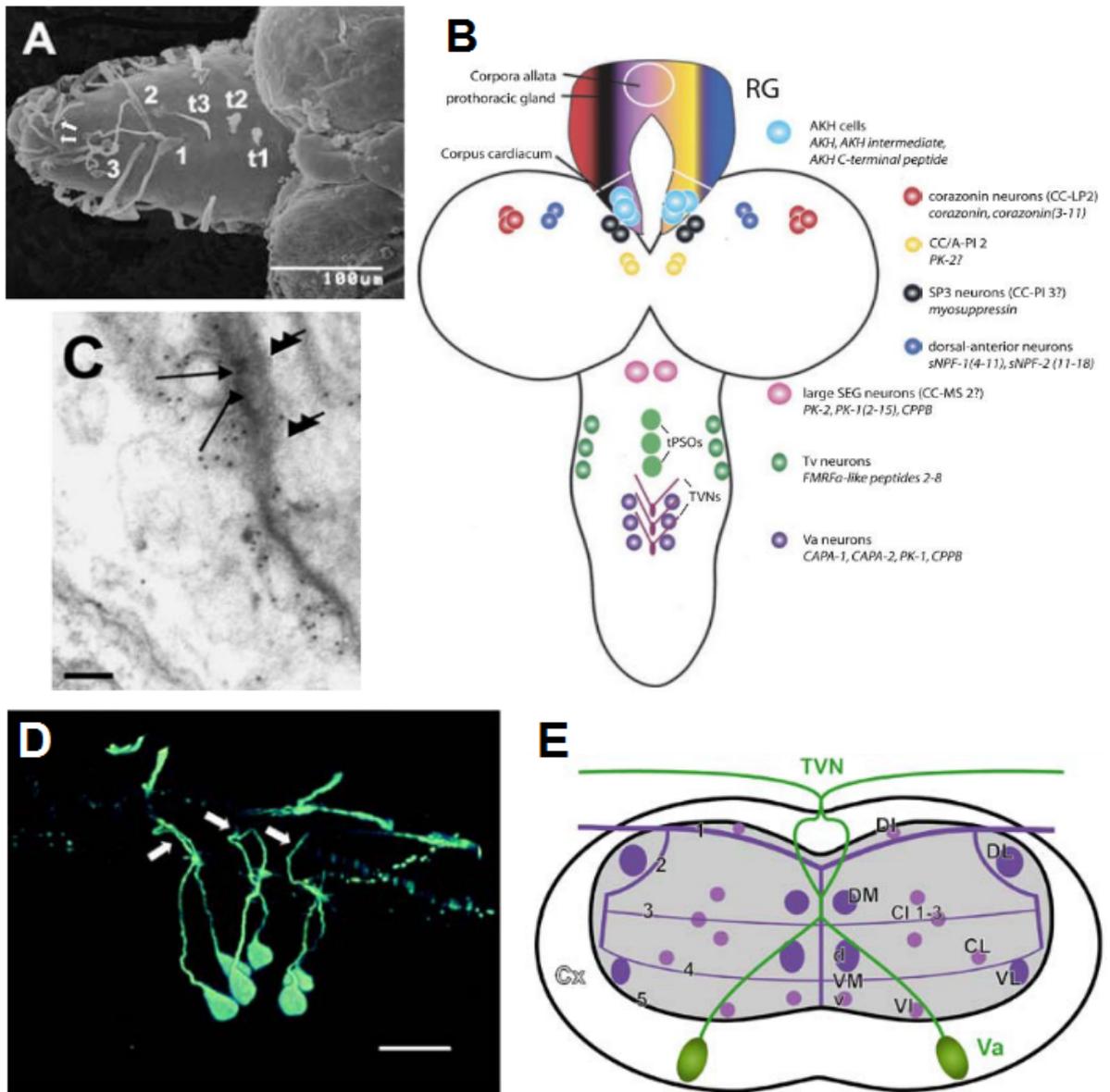
Die Agglomerat-Bildung von Bruchpilot ist nicht auf larvale Nerven beschränkt. Auch in den Antennalnerven adulter Fliegen der Nullmutante *Srpk79D<sup>VN</sup>* wurde diese Anhäufung beobachtet (Nieratschker et al., 2009). Bemerkenswerterweise hat die Überexpression von BRP die Entstehung ähnlicher Agglomerate zur Folge. Im Falle der Mutation des *Srpk79D*-Gens konnte die Überexpression des *brp*-Gens, sowie ein genereller Defekt im axonalen Transport als Ursache für den beobachteten BRP-Phänotyp ausgeschlossen werden, denn andere synaptische Proteine wie CSP, Synapsin, Synaptotagmin oder Synaptobrevin zeigten in Immunfluoreszenzfärbungen eine normale Verteilung in larvalen Nerven der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante. Auch bei Betrachtung der Morphologie synaptischer Boutons, ihrer Anzahl oder der Anzahl Aktiver Zonen pro Bouton war kein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp feststellbar. Elektrophysiologische Experimente zeigten weiterhin, dass neben der Struktur auch die Funktion der Signalübertragung in Synapsen der Nullmutante intakt ist, denn weder die durch ein Aktionspotential ausgelöste Vesikelfusion ('evoked excitatory junction potential', eEJP), noch die spontanen Fusionsereignisse einzelner Vesikel ('miniature excitatory junction potential', mEJP) waren beeinträchtigt (Bucher, 2008). Des Weiteren konnte in Rescue-Versuchen demonstriert werden, dass die jeweilige Expression der Isoformen SRPK79D-PC, -PF und -PB ausreicht, um den Phänotyp der Bruchpilot-Agglomeration in larvalen Nerven aufzuheben. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der SRPK79D wurden GFP-getagte Fusionsproteine der Isoformen SRPK79D-PC und -PB mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems pan-neuronal im wildtypischen Hintergrund exprimiert. Dabei stellte man fest, dass die PB-Isoform in ganz bestimmten Bereichen des Perikaryons akkumuliert, wohingegen die PC-Isoform gleichmäßig über das Cytoplasma verteilt ist und zusätzlich an die Aktiven Zonen transportiert wird und dort mit Bruchpilot ko-lokalisiert. Die Tatsache, dass die SRPK79D-PC und BRP im gleichen zellulären Kompartiment vorliegen, und dass der Ausfall der SRPK79D zu axonalen Bruchpilot-Aggregaten führt, lässt die Hypothese einer direkten Wechselwirkung beider Proteine wahrscheinlich erscheinen. Der Versuch, eine direkte Interaktion zwischen der SR Proteinkinase und Bruchpilot durch Ko-Immunopräzipitation beider Proteine nachzuweisen, schlug allerdings fehl (Nieratschker, 2008).

## 1.9 Neuropeptide und das Median/Transvers-Nervensystem von *Drosophila melanogaster*

Zur Kommunikation untereinander verwenden Neurone neben den niedermolekularen Neurotransmittern auch kleine Proteine, die Neuropeptide. Neuropeptid-Hormone spielen in allen Lebewesen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Körperfunktionen, wie Herzschlag, Nahrungsaufnahme, Wachstum oder auch Lernen und Gedächtnis. Im Gegensatz zu den niedermolekularen Neurotransmittern, welche durch Enzyme in allen Teilen des Neurons synthetisiert werden können, stammen Neuropeptide von Proteinen ab, die zunächst im Endoplasmatischen Reticulum modifiziert, anschließend im Golgi-Apparat weiter verändert und schließlich in sekretorischen Vesikeln durch schnellen axonalen Transport zu den Endigungen transportiert werden. Oft kodiert eine einzelne mRNA ein großes Vorläuferprotein, von dem die Peptide durch spezifische Proteasen abgespalten werden. Dabei wird von der Art der Proteinspaltung festgelegt, welches Peptid von welchem peptidergen Neuron freigesetzt wird, was wiederum davon abhängt, welche Protease in einem gegebenen Neuron aktiv ist.

Gespeichert werden Neuropeptide häufig in sogenannten Neurohämal-Organen. Ihre Freisetzung aus großen elektronendichten Vesikeln ('dense-core vesicles', DCV) erfolgt an spezialisierten neurohämalen Zonen. Die Abgabe von Neurotransmittern und Neuropeptiden wird unterschiedlich reguliert. Neurotransmitter beeinflussen generell vor allem die Erregbarkeit anderer Nervenzellen, indem sie diese de- oder hyperpolarisieren. Neurotransmitter und Neuropeptide können jedoch auch einen Effekt auf die Genexpression haben.

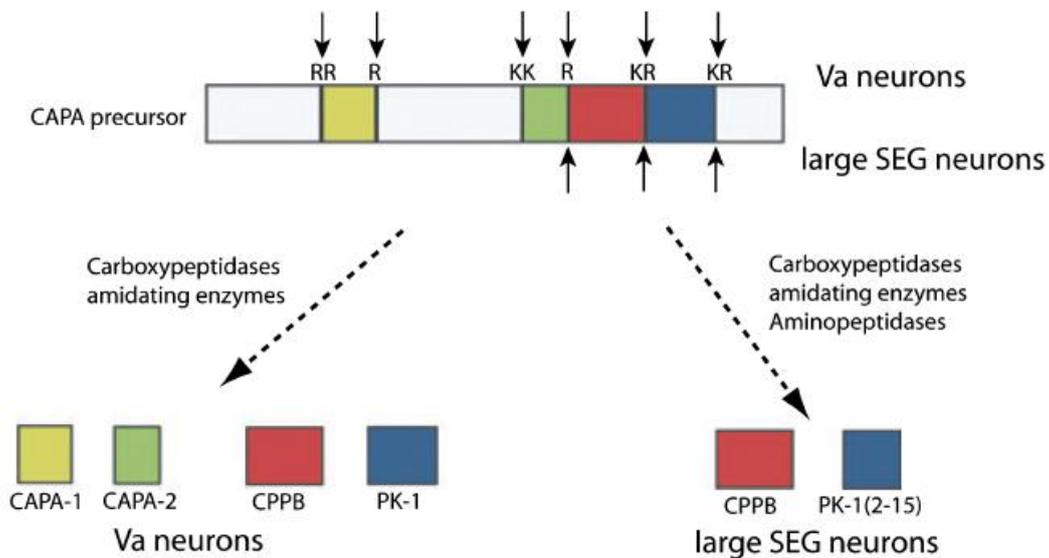
Die mit Neurohämal-Organen assoziierten Bereiche im Zentralnervensystem von *Drosophila* sind der Retrocerebral-Komplex in der Kopffregion, sowie die perisymphathischen Organe des Thorax ('thoracic perisymphathetic organs', tPSOs) und des Abdomens ('abdominal perisymphathetic organs', aPSOs), die in den Median- (MeNs) und Transversalnerven (TVNs) des Ventralganglions liegen (Santos et al., 2006) (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Anordnung der Va-Neurone und Verlauf des Median/Transvers-Nervensystems in *Drosophila*-Larven.** Entnommen aus und modifiziert nach Santos et al., 2006 (A, C-E) und Wegener et al., 2006 (B). Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Copyright Clearance Center. (A) Dorsalansicht des Ventralganglions einer L3-Larve. Drei PSOs des Thorax (t1-t3) und die ersten drei abdominalen MeNs (1-3) zeigen eine Schwellung an der Basis. Weiter posterior gelegene MeNs (Pfeile) besitzen keine solche Schwellung, gabeln sich aber ebenfalls und bilden die TVNs. (B) Schematisches Modell des mit dem Zentralnervensystem assoziierten Neurohämals-Systems der *Drosophila*-Larve, ermittelt durch Massenspektrometrie. Erkennbar ist die Segment-spezifische und nicht-überlappende Expression von Neuropeptiden. Die CAPA-Peptide werden nur von den Va-Neuronen exprimiert. (C) Ultradünnschnitt durch einen TVN, gefärbt gegen PRX-Amid. Zu sehen ist die Fusion eines Vesikels an einer sehr elektronendichten Stelle der Plasmamembran. (D) Seitenansicht des Ventralganglions (dorsal oben, ventral unten, anterior links, posterior rechts): die Zellkörper der Va-Neurone liegen ventral und projizieren nach dorsal. Dendritische Verzweigungen sind nicht erkennbar. (E) Schematischer Querschnitt durch ein Neuomer. Die Neuriten beider Hemisphären verlaufen Richtung Mitte und bilden eine Schleife, bevor sie das Neuropil entlang der Mittellinie verlassen.

In der Larve von *D. melanogaster* werden die ersten drei abdominalen MeNs/TVNs jeweils von einem Neuronen-Paar gebildet. Diese Va-Neurone (Ventral-abdominal) exprimieren zwei Arten von Neuropeptiden: zum einen die zur Periviscerokinin-Peptidfamilie gehörenden CAPA-Peptide CAPA-1 und -2 und zum anderen das zur Pyrokinin-Peptidfamilie gehörende PK-1 (Wegener et al., 2006). Das gemeinsame Merkmal dieser CAPA-Peptide, die auch im aPSO/TVN-System anderer Insekten vorkommen (Wegener et al., 2002), ist die C-terminale Sequenz PRXa. Das Antiserum anti-Pea-PVK-2 erkennt spezifisch die Periviscerokinine mit dem C-Terminus PRV-Amid (Prolin-Arginin-Valin-Amid), sowie die auf PRL-Amid (Prolin-Arginin-Leucin-Amid) endenden Pyrokinine.

Auch die aktiven CAPA-Peptide von *Drosophila* entstehen durch posttranslationale Prozessierung aus einem großen Vorläufermolekül. Wie Abbildung 17 zeigt, entstehen CAPA-1 und CAPA-2 aus dem CAPA-Vorläufer nur in den Va-Neuronen durch Vorhandensein spezieller Peptidasen.



**Abbildung 17: Modell der differentiellen Prozessierung des CAPA-Vorläufers.** Entnommen aus Wegener et al., 2006. Genehmigung zur Reproduktion erteilt durch das Copyright Clearance Center. Das *capa*-Gen wird in den Va-Neuronen und einem Paar großer Neurone des Suboesophagus exprimiert, aber durch verschiedene Peptidasen gespalten.

## 1.10 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

Mutation des *Srpk79D*-Gens, welches eine vermutlich an Spleißvorgängen beteiligte Kinase kodiert, führt zur Bildung charakteristischer Agglomerate des Aktive Zone-Proteins Bruchpilot in larvalen Nerven und in den Antennalnerven adulter Fliegen. BRP ist als struktureller Bestandteil der elektronendichten T-Bars an den präsynaptischen Endigungen der Photorezeptoren und der neuromuskulären Synapse notwendig für eine intakte Neurotransmission. Mutation im *brp*-Gen hat morphologisch den Verlust der T-Bars zur Folge, während es auf physiologischer Ebene zu einer gestörten Signalübertragung an Synapsen kommt (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006). Daher sollte zunächst eine elektronenmikroskopische Analyse larvaler Nerven von Wildtyp und *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten durchgeführt werden. Dabei sollte nach auffälligen elektronendichten Strukturen gesucht werden, die spezifisch in der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante vorkommen und im Wildtyp nicht auftreten.

Um die Diversität unter Proteinen zu erhöhen, werden viele prä-mRNAs alternativ gespleißt, sodass ein einzelnes Gen Grundlage für mehrere unterschiedliche Protein-Isoformen sein kann (Graveley, 2001). Die *Synapsin*-, *Sap47*- und *CSP*-prä-mRNAs werden ebenfalls dem Prozess des alternativen Spleißens unterzogen, sodass mehrere Isoformen dieser Proteine zu beobachten sind. Daher sollte anhand von Western Blots getestet werden, ob Spleißmuster und Expressionsstärke der drei Proteine in der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante von der Situation im Wildtyp abweichen.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob RNAi-vermittelter Knock-down von potentiellen Substraten der SRPK79D zum gleichen Phänotyp der BRP-Agglomerate in larvalen Nerven führt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei der sieben bekannten SR-Proteine von *Drosophila* bearbeitet werden.

Da die *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten eine verkürzte Lebensdauer zeigen und Defizite in Verhaltensversuchen wie Flugfähigkeit, Laufaktivität und negative Geotaxis haben, sollten die Larven der Mutante durch klassische Konditionierung im etablierten Zwei-Duft-Paradigma auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, einen bestimmten Duft mit der Belohnung durch Zucker zu assoziieren.

Durch Kombination eines gegen Bruchpilot gerichteten UAS-RNAi-Konstrukts mit dem *Srpk79D<sup>VN</sup>* Allel sollte die Frage geklärt werden, ob durch die Reduktion der Menge an Bruchpilot-Protein der Phänotyp der Nullmutation abgeschwächt wird. Diese Fliegen sollten außerdem in ihrer Flugfähigkeit getestet werden, da sowohl die *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante, als auch *brp*-RNAi-Fliegen im Vergleich zum Wildtyp vermindert flugfähig sind (Wagh et al., 2006; Nieratschker et al., 2009). So kann festgestellt werden, ob Bruchpilot und die SRPK79D vermutlich Bestandteile der gleichen Signalkaskade sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Antibiotika

Ampicillin	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	Roth
Kanamycin	10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	Sigma

### 2.2 Antikörper

#### Primäre Antikörper:

$\alpha$ -Bruchpilot (MAK nc82, Maus)	1:100	Hofbauer et al., 2009
$\alpha$ -Sap47 (MAK nc46, Maus)	1:200	Hofbauer et al., 2009
$\alpha$ -CSP (MAK ab49, Maus)	1:100	Hofbauer et al., 2009
$\alpha$ -Synapsin (MAK 3C11, Maus)	1:50	Hofbauer et al., 2009
$\alpha$ -SRPK (A-17) (Ziege polyklonal)	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.
$\alpha$ -PVK-2 (Kaninchen polyklonal)	1:5000	Eckert et al., 2002 (C. Wegener)
$\alpha$ -Tubulin (Maus monoklonal)	1:1000	Santa Cruz Biotechnoloy Inc.

#### Sekundäre Antikörper:

Goat $\alpha$ -mouse IgG-12 nm colloidal gold	1:10	Dianova
Alexa Fluor®488 FluoroNanogold™ $\alpha$ -mouse Fab'	1:20	Nanoprobes; Yaphank; NY; USA
Alexa488 Fluor goat $\alpha$ -mouse IgG	1:1000	Invitrogen GmbH Darmstadt
Alexa488 Fluor goat $\alpha$ -rabbit IgG	1:1000	Invitrogen
Cy3-conjugated goat $\alpha$ -mouse IgG	1:1000	Invitrogen
Cy3-conjugated goat $\alpha$ -rabbit IgG	1:1000	Invitrogen
Cy3-conjugated $\alpha$ -HRP	1:1000	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.
Donkey $\alpha$ -goat IgG-FITC	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Goat $\alpha$ -mouse IgG-HRP-conjugated	1:10.000	Invitrogen
Donkey $\alpha$ -goat IgG-HRP-conjugated	1:100.000	Santa Cruz Biotechnology Inc.

## 2.3 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> JM109	Promega
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	Stratagene

## 2.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nichts anderes angegeben ist, von den Firmen Applichem GmbH Darmstadt, Merck KG aA Darmstadt, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg oder Sigma-Aldrich GmbH & Co. KG bezogen.

## 2.5 Drosophila-Zucht

Die Haltung der Fliegen erfolgte auf durchsichtigen großen oder mittleren Gläsern aus Plexiglas oder echtem Glas, die mit einem Anti-Milben-Stopfen verschlossen wurden, um eine Kontamination mit diesen Parasiten zu verhindern. Die Gläser waren mit einem Nährmedium befüllt. Zur Herstellung dieses Nährmediums wurden 212 g Maismehl mit 750 ml Wasser aufgekocht und über Nacht zum Quellen stehen gelassen. Am folgenden Tag wurde die Mischung unter Zugabe von 40g Malz und Zuckerrübensirup erneut aufgekocht. Währenddessen wurde eine Mischung aus 18,5 g Trockenhefe, 7 g Agar und 10 g Sojamehl in 150 ml Wasser eingerührt. Sobald der Brei auf 80°C abgekühlt war, wurde dem Gemisch ein Teelöffel Methyl-4-hydroxybenzoat zugefügt, welches als Fungizid wirkt. Der fertige Brei wurde anschließend etwa zwei cm hoch in die Gläser gefüllt und mit Hefe versehen. Bis zum Gebrauch wurden die Kulturgläser auf 4°C gelagert. Die Fliegenkulturen wurden in Klimakammern mit konstanter Temperatur (18°C oder 25°C), 60% – 70% relativer Luftfeuchtigkeit und einem 14/10 h Hell/Dunkel-Rhythmus.

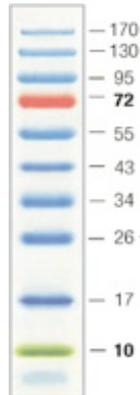
## 2.6 Fliegenlinien

<i>w</i> <sup>1118</sup>	Wildtyp, Stocksammlung Würzburg
<i>Srpk79D</i> <sup>PI</sup>	K. Eberle, 1995
<i>Srpk79D</i> <sup>PI</sup> ( <i>outcrossed</i> )	V. Nieratschker
<i>Srpk79D</i> <sup>VN</sup>	V. Nieratschker
<i>Srpk79D</i> <sup>VN(CS)/TM3</sup>	M. Jauch
<i>Srpk79D</i> <sup>REV</sup>	V. Nieratschker
<i>w</i> ; <i>elav-Gal4</i> ; +; +	S. Sigrist, FU Berlin
<i>w</i> ; <i>elav-Gal4</i> ; +; <i>Srpk79D</i> <sup>VN</sup>	V. Nieratschker
<i>w</i> ; <i>UAS-Dicer</i> ; +; <i>UAS-elav-Gal4</i>	S. Sigrist, FU Berlin
<i>w</i> ; +; <i>Va-Gal4/TM3</i>	S. Thor, Linköping (C. Wegener, Marburg)
<i>w</i> ; +; <i>Va-Gal4/TM6</i>	M. Jauch
<i>w</i> ; <i>UAS-RNAi-Brp(B12)</i> ; +; +	S. Sigrist, FU Berlin
<i>w</i> ; +; <i>UAS-RNAi-BRP(C8)</i>	S. Sigrist, FU Berlin
<i>w</i> ; +; <i>UAS-RNAi-Brp(C8), Srpk79D</i> <sup>VN</sup>	M. Jauch
<i>w</i> ; <i>UAS-RNAi-B52/SRp55</i> ; + (ID 38860)	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center
<i>w</i> ; <i>UAS-RNAi-SC35</i> ; + (ID 40590)	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center
<i>w</i> ; <i>UAS-RNAi-X16/9G8</i> ; + (ID 100226)	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center
+; +; <i>Syn</i> <sup>97(CS)</sup>	Godenschwege et al., 2004
+; +; <i>Sap</i> <sup>156(CS)</sup>	Funk et al., 2004
+; +; <i>TM3/TM6</i>	Bloomington
<i>w</i> ; +; <i>UAS-Srpk79D-RCeGFP</i>	V. Nieratschker
<i>w</i> ; <i>UAS-Srpk79D-RBeGFP</i> ; +	V. Nieratschker
<i>w</i> ; <i>UAS-eGFP-Srpk79D-RF</i>	V. Nieratschker
<i>y, w</i> ; <i>UAS-mCD8GFP; UAS-mCD8GFP/CyO</i> ; +	Bloomington

## 2.7 Marker

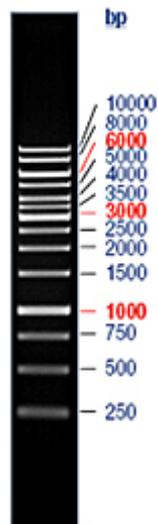
### 2.7.1 Protein-Marker für SDS-PAGE und Western Blot

PageRuler™ Pre-stained Protein Ladder (Fermentas GmbH St. Leon-Rot)



### 2.7.2 DNA-Marker für DNA-Gelelektrophorese

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)



## 2.8 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH, Ebersberg, Deutschland synthetisiert:

- 1/2r:               5' – GTA CGG TGT TGG GCT TG – 3'               (ExtraExonanti)
- 6f:                 5' – GCG ACT TCA ACT TCG TCT CC – 3'               (SRPK79D-Ex3newfwd)
- 6r:                 5' – GCG GAT TAT GTT ACG CAC CT – 3'               (SRPK79D-VN100rev)
- 7f:                 5' – CGG CCG GCA TAT GTA GTA GT – 3'               (P487sense)
- 7r:                 5' – TCA CGG ATA GCT TCC AGG AG – 3'               (6PPanti)
- 8f:                 5' – CTG GAC CAC TGG TTG GAT CT – 3'               (SRPK79D-Ex3fwd)

- 8r: 5' – ACC GGT TGT CAA ATA TGT CTC C – 3' (SRPK79D-Ex4rev)
- GFPcEcosense: 5' – GGG GGA ATT CAT GGA TGA CTT TGG CTC G – 3'
- GFPcNotanti: 5' – AAA AGC GGC CGC GAC GAA CTC CTC – 3'
- M13forward: 5' – GTA AAA CGA CGG CCA G – 3'

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma metabion synthetisiert:

- 1.Intron n.P.sense 5' – CGA TAT CGT TGT CCC TAT TTG G – 3'
- 1.Intron n.P.anti 5' – TGT GTC ACT CAG AAA TGG AAC C – 3'

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert:

- *attB1*-SrpK79D: 5' – GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA TGG ATG ACT  
TTG GCT CGA CCG C – 3'
- *attB5r*-EGFP: 5' – GGG GAC AAC TTT TGT ATA CAA AGT TGT TCC GAC GAA CTC  
CTC CTG CTC CAA CC – 3'
- *attB5*-SrpK79D: 5' – GGG GAC AAC TTT GTA TAC AAA AGT TGA TGG TGA GCA AGG  
GCG AGG AGC – 3'
- *attB2*-EGFP: 5' – GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAC TTG TAC  
AGC TCG TCC ATG CCG – 3'

## 2.9 Kits

- QIAEX II Gel Extraction Kit QIAGEN
- QIAGEN Plasmid Midi Kit QIAGEN
- QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN
- QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN
- QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN
- RNeasy Mini Kit QIAGEN
- MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination Invitrogen
  - pDONR™ 221 P1-P5r
  - pDONR™ 221 P5-P2
  - BP Clonase™ II Enzyme Mix
  - Proteinease K solution
  - LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix

- pTW-Vektor *Drosophila* Gateway Collection

## 2.10 Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen Fermentas oder New England Biolabs (NEB).

## 2.11 Methoden auf DNA-Ebene

### 2.11.1 Isolation genomischer DNA aus einer adulten Fliege

Eine adulte Fliege wurde in 50 µl Homogenisierungspuffer (10 mM Tris pH-Wert 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl in ddH<sub>2</sub>O, bei 4°C lagern), der mit 0.5 µl Proteinase K (1:100, Roche) versetzt worden war, homogenisiert. Während der 30-minütigen Inkubationszeit bei 37°C erfolgte der Proteinverdau. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde das Homogenat für zwei Minuten auf 96°C erhitzt. Nach der Zentrifugation, die der Abtrennung fester Bestandteile diente, befand sich die genomische DNA im Überstand.

### 2.11.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung geringer Mengen DNA. Dabei amplifiziert eine hitzestabile DNA-Polymerase einen DNA-Abschnitt, der von zwei synthetischen Oligonukleotiden, sogenannten Primern, flankiert wird, wobei der sense-Primer zum 5'-Ende und der anti-Primer zum 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments komplementär sein muss. Zunächst wird die DNA-Matrize für fünf Minuten bei einer Temperatur von 95°C denaturiert. Die anschließenden Zyklen, deren Zahl zwischen 20 und 40 liegen kann, dienen der DNA-Synthese. Ein Zyklus gliedert sich in drei Phasen:

1. Denaturierung: 1 Minute bei 95°C → DNA zerfällt in Einzelstränge
2. Annealing: 1 Minute zur Hybridisierung der Primer mit der DNA entsprechend der Komplementarität; Temperatur hängt von der Länge und dem GC-Gehalt des Primers ab
3. Elongation: DNA-Synthese bei 72°C; benötigte Zeit ist abhängig von der Länge des zu

synthetisierenden Abschnitts → 1 Minute pro 1000 bp

Abschließend werden die Reaktionen zur Fertigstellung aller DNA-Fragmente für zehn Minuten bei 72°C inkubiert. Die verwendete PCR-Maschine war der Mastercycler von Eppendorf.

Verwendet wurde die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase der Firma Finnzymes aufgrund ihrer Fähigkeit zur Korrektur neu-synthetisierter DNA.

Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

- 35 µl Phusion™ High Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes)
  - 1.5 µl DMSO (Finnzymes)
  - 4,5-6,5 µl ddH<sub>2</sub>O
  - 2 µl sense-Primer 10 mM
  - 2 µl anti-Primer 10 mM
  - 3-5 µl DNA
- 
- 50 µl Gesamtvolumen

### 2.11.3 Linker-PCR

Bei diesem Verfahren sind die Primer so gestaltet, dass sie neben einer komplementären Sequenz die Erkennungssequenz für ein gewünschtes Restriktionsenzym enthalten, die so an die amplifizierte DNA-Sequenz angehängt wird. Damit ist es möglich, die DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen zu schneiden, sodass sie je nach Enzym glatte oder überhängende Enden erhalten und anschließend in ebenso verdaute Vektoren inseriert werden können.

### 2.11.4 Restriktionsverdau

Mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen, einer großen Gruppe an Enzymen mit unterschiedlichen Spezifitäten, ist es möglich, eine beliebige DNA an den spezifischen Erkennungsstellen dieser Endonucleasen zu spalten.

Ein Restriktions-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- x µl DNA
- 1 µl 10x Puffer
- 1 µl Enzym 1
- 1 µl Enzym 2 (bei Doppelverdau-Ansätzen)

- $y \mu\text{l ddH}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_  
10  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen

Die Reaktionen wurden bei 37°C für eine Stunde oder länger inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Enzyme durch Erhitzen auf die von den Herstellern angegebene Temperatur inaktiviert.

#### 2.11.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt im Ultraviolett-Bereich bei 260 nm. Durch Messung der Extinktion einer in Wasser gelösten DNA bei dieser Wellenlänge wurde die Konzentration von einzel- oder doppelsträngiger DNA mit Hilfe des Spektralphotometers (Eppendorf) ermittelt. Als Referenzwert dient bei Nucleinsäuren doppelt-destilliertes Wasser. Zunächst wird mit dem Lösungsmittel der Leerwert (= 0) eingestellt. Um keine Messfehler durch Unterschiede in der Beschaffenheit der Küvetten (Eppendorf) zu erzeugen, wird die Probe danach in dieselbe Küvette pipettiert und die Konzentration bestimmt.

#### 2.11.6 DNA-Gelelektrophorese

Diese Methode erlaubt die Auftrennung von DNA-Fragmenten wie beispielsweise PCR-Produkten oder Fragmenten nach Restriktionsverdau entsprechend ihrer Größe in einem Agarose-Gel. Zur Herstellung eines Gels wird die entsprechende Menge Agarose (Peqlab) abgewogen und mit einfach konzentriertem TBE-Puffer vermischt. Für ein 1%-iges Gel wäre 1 g Agarose auf 100 ml Puffer nötig. Für höher konzentrierte Gele erhöht sich die Menge an Agarose entsprechend nach der Formel:  $x\% = x \text{ g auf } 100 \text{ ml Flüssigkeit}$ . Die Mischung aus Agarose und 1x TBE wird in der Mikrowelle aufgekocht, damit das Agarose-Pulver in Lösung geht. Ist die Lösung auf 60-70°C abgekühlt, wird eine Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, sodass diese nach der Elektrophorese unter UV-Licht betrachtet werden kann. Die Lösung wird in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen, und es werden die Kämme eingesetzt. Nach vollendeter Polymerisation ist das Gel fest und wird in die Gelkammer gelegt und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die Kämme werden wieder entfernt, und die mit Beladungspuffer (GelPilot DNA Loading Dye 5x, QIAGEN) versetzten Proben werden in die Geltaschen pipettiert. Der Beladungspuffer erhöht die Dichte der Probe, wodurch sie in die Geltasche absinkt. Um die zurückgelegte Distanz der DNA im Verlauf der Elektrophorese abschätzen zu können, enthält der Beladungspuffer die drei verschiedenen Farbstoffe Xylene-Cyanol, Bromphenol-Blau und Orange

G, die parallel zu DNA-Fragmenten bestimmter Größe laufen. Ein ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennter Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas) erlaubt die spätere Zuordnung der Größen der untersuchten DNA-Fragmente. Die DNA wandert im elektrischen Feld bei einer angelegten Spannung von 180 V aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Agarosegele werden nach Beendigung der Gelelektrophorese unter UV-Licht ausgewertet.

#### Puffer und Lösungen für DNA-Gelelektrophorese:

- 10x TBE  
60.6 g Tris/HCl (500 mM)  
31.0 g Borsäure (500 mM)  
9.3 g EDTA (25 mM)  
mit dH<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 1 l auffüllen,  
pH-Wert auf 8.0 einstellen
- Ethidiumbromid (EtBr)  
10 mg/ml in H<sub>2</sub>O, bei 4°C licht-geschützt  
lagern; in Gebrauch 0.5 µg/ml

#### 2.11.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte wurden nach der PCR entweder direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben, oder nach Gelelektrophorese unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) oder des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aus Gelfragmenten entsprechend den Protokollen des Herstellers eluiert. DNA-Fragmente aus Restriktionsverdau wurden immer zuerst über Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Agarosegel aufgereinigt.

#### 2.11.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Aufgereinigte Vektor-Fragmente wurden vor der Ligation dephosphoryliert, um eine Re-Ligation ohne eingefügtes Insert-Fragment zu verhindern. Dazu wurde der Vektor für eine Stunde bei 37°C mit dem Enzym Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP, Fermentas) inkubiert. Zur Deaktivierung der Phosphatase wurde die Reaktion für zehn Minuten auf 80°C erhitzt.

Die Ligations-Reaktion wurde gemäß folgendem Schema zusammenpipettiert:

- x µl Vektor (100-500 ng)

- y µl Insert (1-2 µg)
- 2 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer (Fermentas)
- 2 µl 50% PEG 4000 Solution (Fermentas)
- 1 µl T4 DNA Ligase (5u/µl; Fermentas)
- z µl ddH<sub>2</sub>O bis 20 µl  
20 µl Gesamtvolumen

Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 22°C oder über Nacht bei 18°C durchgeführt und danach durch Erhitzen auf eine Temperatur von 70°C für fünf Minuten abgestoppt.

#### 2.11.9 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden die DNA-Proben zum Unternehmen Eurofins MWG Operon GmbH nach Ebersberg in Deutschland geschickt. Es bestand die Möglichkeit, die gemäß den Angaben der Firma vorbereitete Probe inklusive der Primer, oder alternativ Probe und Primer separat in je einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zu übersenden.

### 2.12 Methoden auf RNA-Ebene

#### 2.12.1 Isolierung der gesamten RNA aus adulten Fliegen

Zunächst wurden 40 adulte Fliegen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolierung der RNA aus diesen Fliegen wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (QIAGEN) durchgeführt. Soweit nichts anderes angegeben ist, müssen alle Arbeitsschritte auf Eis erfolgen, um eine rasche Degradation der RNA zu verhindern. Zum Verdau der genomischen DNA wurde 1 µl DNase (1 u/µl; DNase, RNase-free, Fermentas) zugegeben und die Reaktion für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Erhitzen auf 95°C für zehn Minuten wurde der Verdau abgestoppt. Anschließend wurde die mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.

#### 2.12.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Für die reverse Transkription wurde der SuperScript® II Reverse Transcriptase Kit von Invitrogen verwendet.

Der Ansatz zur reversen Transkription enthält folgende Elemente:

- 10-20 µl RNA
- 1 µl Oligo-dT Primer (0.5 µg/µl; Fermentas)
- 1 µl dNTPs (1 mM; Fermentas)
  - 5 Minuten bei 65°C inkubieren, danach sofort auf Eis, kurz zentrifugieren
- 4 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen)
- 2 µl 0.1 M DTT (Invitrogen)
  - 2 Minuten bei 42°C vorinkubieren
- 1 µl SuperScript® II Reverse Transcriptase (200 u/µl; Invitrogen)
  - 90 Minuten bei 42°C inkubieren

Der Oligo-dT Primer hybridisiert mit dem komplementären polyA<sup>+</sup>-Schwanz der mRNAs. Die reverse Transkriptase synthetisiert ausgehend vom Primer die cDNA, die dem antisense-Strang der DNA entspricht. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz für zehn Minuten bei 70°C inkubiert. Durch Zufügen von 1 µl RNase (500 µg/ml; RNase, DNase-free, Roche) und 30-minütige Inkubation bei 37°C wurde die RNA verdaut. Zur Vervielfältigung der gewünschten cDNA wurde das gewöhnliche PCR-Protokoll (2.11.2) mit spezifischen Primern angewendet.

## 2.13 Methoden auf Protein-Ebene

### 2.13.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein diskontinuierliches, denaturierendes Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Im diskontinuierlichen System werden die Proteine zuerst in einem Sammelgel konzentriert und gelangen anschließend als sehr schmale Banden in das Trenngel. Die Elektrophorese erfolgt in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses Detergens bewirkt eine Dissoziation oligomerer Proteine in ihre Untereinheiten. Zur Reduktion vorliegender Disulfidbrückenbindungen zwischen den Monomeren ist noch ein Zusatz eines reduzierenden Agens (z. B. Mercaptoethanol) erforderlich (Denaturierung). Die Polypeptidketten binden SDS und werden durch die Sulfonsäure-Gruppen des SDS stark negativ geladen, wodurch zugleich die normalerweise vorhandenen Ladungen überdeckt werden. Somit erfolgt die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nur nach ihrem Molekulargewicht. Durch Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen bekannter Größe (Markerproteine) kann

so die Molmasse unbekannter Proteine bestimmt werden.

Für die Versuche wurden 10%- oder 12%-ige Fertiggele (NuPAGE® Bis-Tris Gel, Invitrogen) verwendet, welche entsprechend den Herstellerangaben in die Gelkammer (XCell Sure Lock Electrophoresis Cell, Invitrogen) eingesetzt wurden. Die zu untersuchenden Proben wurden in 2x Laemmli-Puffer homogenisiert, für zehn Minuten bei 70°C denaturiert und dann in die zuvor mit Puffer gespülten Geltaschen pipettiert. Nachdem die Kammer mit 1x MOPS-Puffer (Invitrogen) aufgefüllt worden war, wurde ein Strom von 125 mA angelegt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde ein Western Blot gemacht.

#### Puffer und Lösungen für SDS-PAGE:

- Laemmli-Puffer (2x)
  - 1.25 ml Tris (125 mM, pH-Wert 6.8)
  - 0.6 ml Glycerin (6.0%)
  - 1.0 ml SDS (2.0%)
  - 0.25 ml Bromphenol-Blau (0.025%)
  - 0.5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (5.0%)
  - 6.4 ml ddH<sub>2</sub>O für Endvolumen von 10 ml
- MOPS-SDS-Laufpuffer (20x)
  - 209.2 g MOPS (1.0 M)
  - 121.2 g Tris base (1.0 M)
  - 20 g SDS (69.3 mM)
  - 6.0 g EDTA (20.5 mM)
  - mit ddH<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 1 l auffüllen
  - 1x Puffer pH-Wert 7.7
- Antioxidant
  - Invitrogen; 500  $\mu$ l zwischen die Gele geben

#### 2.13.2 Western Blot und Immuno-Detektion

Bei einem Western Blot werden die im Gel aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran®, Whatman GmbH) geblottet. Die so transferierten Proteine können durch Immuno-Detektion mit Antikörpern nachgewiesen werden. Auf diese Weise können das Molekulargewicht oder die Expressionsstärke eines bestimmten Proteins ermittelt werden. Das Blotten wurde gemäß Herstellerangaben in der Mini Trans-Blot Cell (BioRad) nach dem Wet-Blot-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde für 60 bis 90 Minuten eine konstante Spannung von 100 V angelegt. In der Folge wandern die Proteine aufgrund ihrer

negativen Ladungen zur Anode und werden auf der Membran verankert. Zum Blocken, also zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran, wurde diese über Nacht bei 4°C in einer 5%igen Milchlösung inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran weiter behandelt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte mit Antikörpern fanden bei Raumtemperatur statt. Zunächst wurde die Membran dreimal zehn Minuten mit 1x TBST gewaschen, dann für eine Stunde mit dem (den) primären Antikörper(n) entsprechend der angegebenen Verdünnung (Unterpunkt 2.2) in 1x TBST inkubiert, anschließend wiederum dreimal für zehn Minuten in 1x TBST gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls wie unter 2. 2 angegeben in 1x TBST verdünnt, erfolgte. Abschließend wurde die Membran wieder dreimal mit 1x TBST gewaschen. Das Waschen dient der Entfernung unspezifisch gebundener beziehungsweise überschüssiger Antikörper-Moleküle.

#### Puffer und Lösungen für Western Blot und Immuno-Detektion:

- Transfer-Puffer (1x)
  - 3.02 g Tris (25 mM)
  - 11.26 g Glycin (150 mM)
  - 100 ml Methanol (10%)
  - mit dH<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 1 l auffüllen, pH-Wert auf 8.3 einstellen, bei 4°C lagern
- Wasch-Puffer (10x TBST)
  - 12.11 g Tris (100 mM)
  - 87.66 g NaCl (1.5 M)
  - 5.0 ml Tween® 20 (0.5%)
  - mit dH<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 1 l auffüllen, pH-Wert auf 7.6 einstellen
- Block-Puffer (5%)
  - 5 g fettfreies trockenes Milchpulver in 100 ml 1x TBST unter Erwärmen und Rühren lösen, durch Faltenfilter filtern und abkühlen lassen

#### 2.13.3 Detektion mittels ECL-System (Enhanced Chemiluminescence)

Der sekundäre Antikörper, der spezifisch die konstante Region der schweren Kette des primären Antikörper-Moleküls erkennt, ist außerdem mit dem Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt. Der Nachweis der auf der Nitrocellulose-Membran gebundenen Proteine geschieht mit dem Enhanced Chemiluminescence Detektionssystem. Zunächst werden die ECL-Lösungen

(Immobilon™ Western, Millipore oder Amersham™ ECL WB Detection Reagent, GE Healthcare) im Verhältnis 1:1 gemischt. Dann wird die Membran für eine Minute mit dieser Lösung überschichtet. Anschließend lässt man die Lösung ablaufen, platziert die Membran auf einem Röntgenfilm und umwickelt ihn mit Haushaltsfolie. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym HRP katalysiert nun unter alkalischen Bedingungen die Umsetzung von energiereichem zyklischen Luminol in die oxidierte Form. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches den aufgelegten Röntgenfilm (Contatyp, Medical X-ray film, Typon Imaging AG) an diesen Stellen schwärzt.

## 2.14 Arbeiten mit Bakterien

### 2.14.1 Hitzeschock-Transformation

Zur Transformation einer Ligations-Reaktion wurde ein Aliquot der bei -80°C gelagerten Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-5 µl Plasmid-DNA zu den Bakterien wurde die Mischung durch Schnippen vorsichtig gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock bei 42°C zur Aufnahme des Plasmids in die Zellen wurde für 50 Sekunden gegeben. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurden 950 µl vorgewärmtes SOC-Medium (Invitrogen) ohne Antibiotikum zugefügt. Zur Vermehrung der Bakterien wurde das Reaktionsgefäß für 90 Minuten bei 37°C und 150 rpm auf einem Horizontalschüttler rotiert. Zur Selektion wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

### 2.14.2 Bakterien-Plattenkulturen

Um Einzelkolonien zu erhalten, wobei jede Kolonie von einer einzigen Bakterienzelle abstammt, wurde die Bakteriensuspension auf einer LB-Agar-Platte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, mit Hilfe eines Trigalskispatels ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten können nach Verschließen mit Parafilm eine Zeit lang bei 4°C aufbewahrt werden.

#### Luria Bertani- (LB-) Medium:

- 10 g NaCl
- 10 g Select Peptone 140
- 5 g Select Yeast Extract

→ mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen, autoklavieren, bei 4°C lagern

LB-Platten: 1 l LB-Medium + 15 g Select Agar (1,5%), autoklavieren, abkühlen lassen, Zugabe von Antibiotikum in Verdünnung 1:1000, in Petri-Schalen (Greiner bio one) gießen, bei 4°C lagern

### 2.14.3 Bakterien-Flüssigkulturen

Zum Animpfen einer Flüssigkultur wurde eine einzelne Kolonie mit einer 200 µl-Pipettenspitze von einer Bakterien-Platte gepickt und in ein Glasröhrchen gegeben, welches mit 3 ml LB-Medium befüllt und dem entsprechenden Antibiotikum in einer Verdünnung von 1:1000 versetzt worden war. Die Röhrchen wurden über Nacht auf einem Rotator bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkulturen können für späteren Gebrauch bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 50 bis 100 ml LB-Medium mit 100 bis 200 µl einer Mini-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Horizontalschüttler vermehrt.

### 2.14.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Mini-Kultur wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) verwendet. Der QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) wurde zur Isolierung der Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Midi-Kultur gebraucht. In beiden Fällen wurden die Arbeitsschritte gemäß den Protokollen des Herstellers durchgeführt.

## 2.15 Immuno-Histochemie an Larven

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden larvale Filet-Präparate hergestellt. Vor Beginn der Präparation wurden die Larven auf Eis betäubt. Anschließend wurden die Larven in ein mit dunkel gefärbter Agarose gefülltes Petri-Schälchen (Hartenstein) überführt und in eiskalter Calcium-freier Saline präpariert. Dazu wurden das anteriore und posteriore Ende der Larve mit je einer Minutie (FineScienceTools) festgesteckt. Mit einer Präparierschere (FineScienceTools) wurde die Larve entlang der Mittellinie dorsal geöffnet und mit vier weiteren Minutien fixiert. Die inneren Organe wurden entfernt. Die Präparate wurden zur Fixierung für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 4%-igem Paraformaldehyd inkubiert, anschließend zweimal für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit

0.1%-igem PBST gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine einstündige Inkubation der Filets in Blocklösung. Der (die) primäre(n) Antikörper wurde(n) direkt in der unter Punkt 2.2 angegebenen Verdünnung in die Blocklösung gegeben, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird zur Entfernung überschüssiger Antikörper-Moleküle viermal für 30 Minuten mit 0.1%-igem PBST gewaschen, bevor die Inkubation mit dem (den) sekundären, fluoreszenzgekoppelten Antikörper(n) ebenfalls in der unter Punkt 2.2 angegebenen Verdünnung in 0.1%-igem PBST für eine Stunde bei Raumtemperatur stattfand. Da die fluoreszenzgekoppelten Antikörper bei Belichtung ausbleichen, musste ab diesem Schritt im Dunkeln gearbeitet werden. Danach wurden die Präparate wiederum viermal für 30 Minuten mit 0.1%-igem PBST gewaschen. Abschließend wurden die Larven auf einen Objektträger (Hartenstein) überführt, in Vectashield Mounting Medium for fluorescence (Linaris) eingebettet, mit einem Deckglas (Hartenstein) abgedeckt, ringsherum mit Nagellack versiegelt und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Aufnahme der Präparate wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, Leica Mikrosystem) verwendet. Die Prozessierung der Roh-Daten erfolgte mit Image J.

#### Puffer und Lösungen für die Immuno-Histochemie:

- Calcium-freie Saline
  - 7.6 g NaCl (130 mM)
  - 12.32 g Sucrose (36 mM)
  - 0.37 g KCl (5 mM)
  - 0.38 g MgCl<sub>2</sub> (1.9 mM)
  - 1.3 g HEPES (5.5 mM)
  - 0.19 g EDTA (0.5 mM)
  - mit ddH<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 1 l auffüllen,  
bei 4°C lagern
- 10x PBS
  - 80 g NaCl (1.37 M)
  - 2.0 g KCl (26.8 mM)
  - 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (101 mM)
  - 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (17.6 mM)
  - mit ddH<sub>2</sub>O auf Endvolumen von 1 l auffüllen,  
pH-Wert auf 7.4 einstellen, autoklavieren
- 0.1% PBST
  - 10 ml 10x PBS
  - 80 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 100 µl Triton X-100
  - lösen, pH-Wert auf 7.3 einstellen, mit ddH<sub>2</sub>O

- Fixativ
  - auf Endvolumen von 100 ml auffüllen
  - 4 g Paraformaldehyd (4% PFA)
  - 90 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 20 µl 10N NaOH
  - bei 65°C für 15 Minuten lösen, pH-Wert auf 7.2 einstellen, 10 ml 10x PBS zugeben, aliquotieren und einfrieren
- Blocklösung
  - 100 mg BSA (2%)
  - 4.65 ml 0.1% PBST
  - 250 µl Normales Ziegen Serum (5%, Linaris)

## 2.16 Elektronenmikroskopische Methoden

### 2.16.1 Standard-Elektronenmikroskopie

Larven im dritten Larvenstadium wurden, wie unter Punkt 2.15 für die Immuno-Histochemie beschrieben, in eiskalter Calcium-freier Saline präpariert und im Anschluss daran wie folgt behandelt, wobei die einzelnen Fixierungs- und Waschschrte bei 4°C durchgeführt wurden:

1. **Fixierung** mit 2.5% gepuffertem Glutaraldehyd (2.5% GA, 50 mM Cacodylat pH-Wert 7.2, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>) für 45 Minuten
2. **Waschen** 5 x für je 3 Minuten mit 50 mM Cacodylatpuffer pH-Wert 7.2
3. **Fixierung** mit 2% gepuffertem Osmium-Tetroxid (2% OsO<sub>4</sub>, 50 mM Cacodylat pH-Wert 7.2) für 90 Minuten
4. **Waschen** 5 x für je 3 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O
5. **Kontrastierung** mit 0.5% wässrigem Uranylacetat über Nacht bei 4°C
6. **Waschen** 5 x für je 3 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O
7. **Entwässerung** in aufsteigender Ethanol-Konzentrationsreihe: 30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 2 x 100% Ethanol für je 30 Minuten bei 4°C; 100% Ethanol, 3 x Propylenoxid für je 30 Minuten bei Raumtemperatur
8. **Einbettung** in Epon 812 (Serva Electrophoresis GmbH): 1:1-Mischung aus Propylenoxid und Epon für 2-4 Stunden, dann über Nacht; 2 x Epon für je 2 Stunden; dann Überführung in Gelatine-Kapseln (Plano GmbH, Wetzlar) zur Einbettung in Epon für 1 Stunde

## 9. **Polymerisation** bei 60°C für mindestens 48 Stunden

Zur Anfertigung ultradünner Längsschnitte (70 nm) der larvalen Axonbündel wurde das Mikrotom Ultracut von Reichert-Jung und ein Diamantmesser (Diatome, Provac GmbH Oestrich-Winkel) verwendet. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfer-Netze (Science Services, München) transferiert, die mit einer 0.8%-igen Pioloform-Lösung beschichtet worden waren, und anschließend für 20 Minuten mit 2% Uranylacetat in Ethanol und für 10 Minuten mit Reynolds Bleicitrat nachkontrastiert.

Aufnahmen der larvalen Axonbündel wurden mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) EM10 von Zeiss gemacht.

### 2.16.2 Immuno-Elektronenmikroskopie

#### 2.16.2.1 Post-embedding Immuno-Gold-Färbung

Wiederum wurden Larven im dritten Larvenstadium in eiskalter Calcium-freier Saline präpariert und nachher folgendermaßen behandelt:

1. **Fixierung** mit 4% Formaldehyd in PBS für 1 Stunde
2. **Waschen** 5 x für je 3 Minuten mit PBS bei 4°C
3. **Absättigung** der freien Aldehydgruppen mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur
4. **Waschen** 5 x für je 3 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O bei 4°C
5. **Entwässerung** in aufsteigender Ethanol-Konzentrationsreihe in Glasgefäßen: 30% Ethanol 2 x für je 15 Minuten bei 4°C; 50%, 70% mit 0.2% Uranylacetat, 90% mit 0.2% Uranylacetat je 2 x für jeweils 30 Minuten bei -20°C; 100% Ethanol 2 x für je 60 Minuten bei -20°C; 100% Ethanol/LR-White-Mischung im Verhältnis 1:1 über Nacht bei 4°C
6. **Einbettung** in LR-White (Science Services, München): LR-White für 1 Stunde bei 4°C, dann 3-4 Stunden bei 4°C, danach über Nacht bei 4°C; am nächsten Tag für 3-4 Stunden bei Raumtemperatur; nachfolgend Überführung in Gelatine-Kapseln (geschlossen!)
7. **Polymerisation** bei 40°C für mindestens 3 Tage

Von den in LR-White eingebetteten larvalen Präparaten wurden ebenfalls 70 nm dünne Ultradünnschnitte mit dem Mikrotom und einem Diamantmesser angefertigt. Diese wurden jedoch

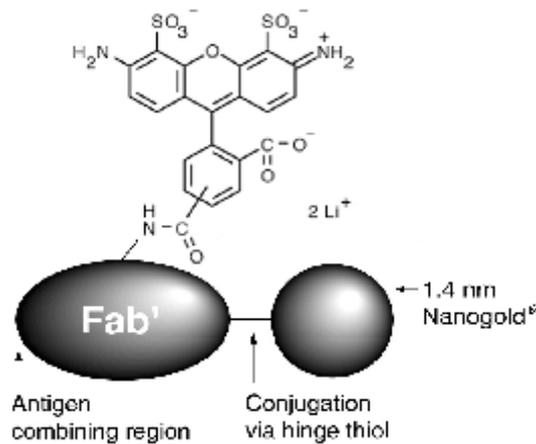
für die nachfolgende Immuno-Lokalisation auf Pioloform-beschichtete Nickel-Netze überführt. Zur Immuno-Lokalisation wurden die Netze zum Blocken je 5 Minuten auf einen Tropfen LB0 (= PBS) beziehungsweise LB1 (= LB0 + 1% BSA + 0.1% Tween® 20) gelegt und anschließend für 1 Stunde mit den primären Antikörpern (MAK nc82 oder  $\alpha$ -Tubulin) inkubiert, die wie unter Punkt 2.2 angegeben in LB1 verdünnt wurden. Nach Spülen mit LB1 wurden die Netze zum Waschen zunächst 2 x für je 10 Minuten auf einen Tropfen LB1 gelegt, dann 2 x für je 10 Minuten auf einen Tropfen LB2 (= LB0 + 0.1% BSA + 0.1% Tween® 20), bevor die Inkubation mit dem sekundären, in LB2 verdünnten Antikörper (Goat  $\alpha$ -mouse IgG-12 nm colloidal gold) für 1 Stunde folgte. Nach Spülen mit LB2 wurden die Netze zum Waschen 2 x für je 10 Minuten auf einen Tropfen LB2 gelegt, anschließend für 2 Minuten auf einem Tropfen mit 1.25% Glutaraldehyd (1 Volumen 2.5% GA mit Ionen + 1 Volumen PBS) nachfixiert, zum Waschen 3 x für je 5 Minuten auf einen Tropfen ddH<sub>2</sub>O gelegt und zuletzt mit 2% ethanolischem Uranylacetat für 20 Minuten und Reynolds Bleicitrat für 10 Minuten kontrastiert. Die Netze wurden mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Gridboxen aufbewahrt bis zur Auswertung mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop EM10 von Zeiss.

#### 2.16.2.2 Pre-embedding Immuno-Gold-Färbung

Für die ultrastrukturelle Lokalisation von Bruchpilot wurden Larven im dritten Larvenstadium in eiskalter Calcium-freier Saline präpariert und dann wie folgt behandelt:

1. **Fixierung** mit 2% Paraformaldehyd/0.06% Glutaraldehyd in 1x PEM (0.1 M PIPES, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) für 90 Minuten auf Eis
2. **Waschen** 2 x für je 15 Minuten mit 1x PEM
3. **Blocken** mit 2% BSA/5% Normales Pferdeserum (NHS) in 0.2% PBST für 1 Stunde
4. **Inkubation** mit dem primären Antikörper MAK nc82 1:100 in 0.1% PBST bei 4°C über Nacht
5. **Waschen** 4 x 1 Stunde mit 0.1% PBST
6. **Inkubation** mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 FluoroNanogold™  $\alpha$ -mouse Fab' 1:20 in 0.1% PBST (siehe Abbildung 1)
7. **Waschen** mit 0.1% PBST für 30 Minuten, bei 4°C über Nacht, am nächsten Tag 2 x für je 30 Minuten
8. **Nach-Fixierung** mit 2% Glutaraldehyd in PBS für 30 Minuten
9. **Waschen** 4 x 10 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O

10. **Silberverstärkung** für 1 Stunde mit dem AURION R-GENT SE-EM Kit (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln) entsprechend den Angaben des Herstellers
11. **Waschen** 4 x 10 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O
12. **Fixierung** mit 2% OsO<sub>4</sub> in 50 mM Cacodylatpuffer pH-Wert 7.2 für 30 Minuten
13. **Waschen** mit ddH<sub>2</sub>O über Nacht bei 4°C, am nächsten Tag 2 x für je 30 Minuten
14. **Entwässerung** in aufsteigender Ethanol-Konzentrationsreihe: 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol für je 30 Minuten auf Eis; 2 x 100% Ethanol für je 30 Minuten bei Raumtemperatur; 2x Propylenoxid für je 30 Minuten
15. **Einbettung**: 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und Epon über Nacht; am nächsten Tag 2 x Epon pur für je 2 Stunden; Überführung in Gelatine-Kapseln mit purem Epon
16. **Polymerisation** bei 60°C für 3 Tage



**Abbildung 1:** Struktur des sekundären Antikörpers Alexa Fluor®488 FluoroNanogold™ α-mouse Fab'. Der Antikörper enthält eine fluoreszierende Gruppe für die Fluoreszenzmikroskopie, und ist mit 1.4 nm Nanogold gekoppelt, sodass er nach Silberverstärkung im Transmissions-Elektronenmikroskop sichtbar ist.

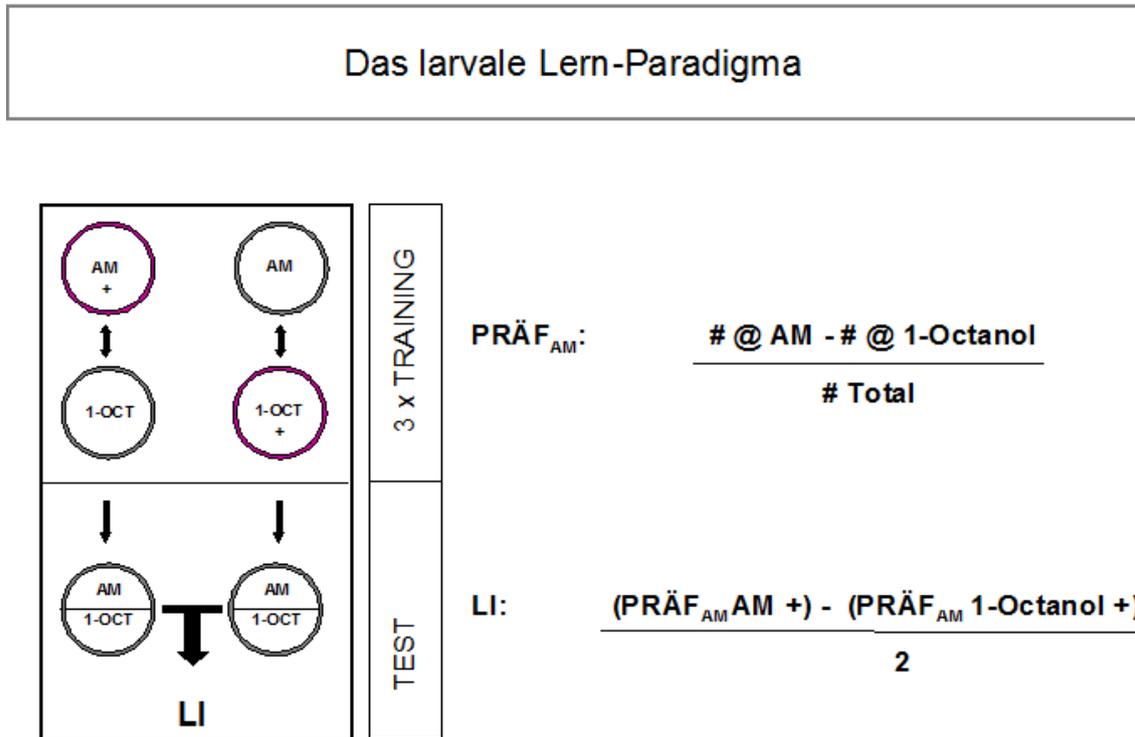
Erneut wurden die Präparate mit dem Mikrotom unter Verwendung eines Diamantmessers ultradünn geschnitten (70 nm) und die Schnitte auf Kupfer-Netze überführt, die mit einem Pioloform-Film überzogen waren. Die Netze wurden für 20 Minuten mit 2% Uranylacetat in Ethanol und für 10 Minuten mit Reynolds Bleicitrat nachkontrastiert. Auch bei diesem Versuch wurden die Aufnahmen der larvalen Axonbündel mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop EM10 von Zeiss gemacht.

## 2.17 Verhaltensversuche

### 2.17.1 Larvale olfaktorische Konditionierung

Die olfaktorische Konditionierung von Larven im dritten Larvenstadium wurde, wie in Gerber und Stocker (2007) beschrieben, durchgeführt. Eine Gruppe von 30 bis 35, fünf Tage alten, Tieren wurde aus dem Brei abgesammelt, in Wasser gewaschen und auf Petri-Schalen überführt, wo sie für fünf Minuten dem Duft N-Amylacetat ( $AM^+$ ), verdünnt 1:50 in Paraffin-Öl, ausgesetzt wurden, während sie auf 1%-iger Agarose mit 2 M Fructose umher krochen. Anschließend wurden alle Tiere auf Petri-Schalen mit purer 1%-iger Agarose transferiert, wo sie dem unverdünnten Duft 1-Octanol ausgesetzt waren. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Im anschließenden Test wurden den Larven beide Düfte auf einer Petri-Schale mit purer 1%-iger Agarose präsentiert, und nach drei Minuten wurde die Anzahl der Larven bestimmt, die sich auf der jeweiligen Seite eines Duft-Containers befanden. Der Präferenz-Index für N-Amylacetat wurde berechnet aus der Anzahl der Tiere auf der Seite mit dem AM-Container minus der Anzahl der Tiere auf der Seite mit dem 1-Octanol-Container, geteilt durch die gesamte Anzahl der Tiere. Im reziproken Experiment wurden die Tiere gleich behandelt, mit dem Unterschied, dass diesmal 1-Octanol statt N-Amylacetat in Gegenwart der Fructose präsentiert wurde. Der Lern-Index ergibt sich aus der Differenz der Präferenz-Indices für N-Amylacetat bei Belohnung von N-Amylacetat beziehungsweise 1-Octanol, geteilt durch zwei. Die Werte für die Lern-Indices können somit zwischen -1 und 1 liegen, wobei negative Werte aversives und positive Werte appetitives Lernen bedeuten.

Für den Versuch wurden die gegen den Wildtyp  $CS^{45}$  rückgekreuzte  $SrpK79D^{fN(CS)}$  Nullmutante und der für die Rückkreuzung verwendete Wildtyp-Stamm  $CS^{45}$  verwendet. Der komplette Versuch wurde für beide Genotypen zehnmals wiederholt. Die Experimente wurden in Bezug auf den Genotyp blind durchgeführt. Abbildung 2 gibt noch einmal schematisch den Ablauf von Training und Test für die jeweiligen reziproken Gruppen von Wildtyp und  $SrpK79D^{fN(CS)}$  Nullmutante wieder und zeigt, wie die Präferenz-Indizes und der Lern-Index berechnet wurden.



**Abbildung 2: Prinzip des larvalen Lern-Paradigmas.** Während des Trainings wurde den Larven einer der Düfte N-Amylacetat (AM) oder 1-Octanol (1-Oct) präsentiert, wobei sie gleichzeitig mit Zucker belohnt wurden, während der jeweils andere Duft neutral, also ohne Belohnung, präsentiert wurde. Die Tiere sollten in reziproken Gruppen die Assoziation von Duft und Zucker lernen. Im anschließenden Test wurde diese Lern-Fähigkeit abgefragt.

#### Rezept zur Herstellung von Agarose-Platten:

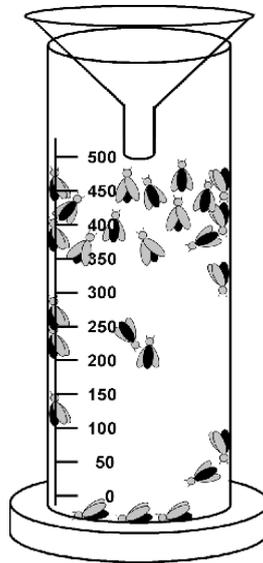
- Pur (1% Agarose): 1 g Agarose auf 100 ml ddH<sub>2</sub>O, aufkochen in Mikrowelle, in Petri-Schalen gießen
- 1% Agarose mit 2 M Fructose: 1 g Agarose auf 100 ml ddH<sub>2</sub>O, in Mikrowelle aufkochen, abkühlen lassen, 36 g Fructose zugeben, durch Schwenken lösen, in Petri-Schalen gießen

Die Platten wurden einen Tag vor dem Experiment hergestellt und bis zum Gebrauch auf Raumtemperatur gelagert.

#### 2.17.2 Flugversuch nach Benzer (1973)

Für die Bestimmung der Flugfähigkeit eines Fliegenstammes wurde der Versuchsaufbau nach Benzer (1973; siehe Abbildung 3) gewählt. Dazu wurden männliche Fliegen in Gruppen zu jeweils

50 bis 100 Tieren einen Tag vor dem Experiment gesammelt und über Nacht zur Erholung auf 18°C belassen. Als Flugarena diente ein 500 ml Glas-Zylinder von 50 mm Durchmesser, dessen Wände mit Paraffin-Öl bedeckt wurden. Die Fliegen wurden durch einen Trichter in den Zylinder geklopft und bleiben, sobald sie landen, an den Öl-beschichteten Wänden kleben. Auf diese Weise können sie ausgezählt werden. Fliegen, die zwischen 0 und 50 ml zu finden sind, gelten als flugunfähig. Pro Genotyp wurden mindestens 1000 Fliegen getestet. Die Durchführung der Experimente erfolgte blind hinsichtlich der Genotypen der untersuchten Tiere. Die Werte wurden in eine Excel-Tabelle eingetragen. Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student's T-Test mit Bonferroni-Korrektur für 45 mögliche paarweise Vergleiche ermittelt.



**Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Ermittlung der Flugfähigkeit nach Benzer (1973).** Als Flugarena diente ein solcher Glaszylinder. Beschreibung zur Durchführung sieht Text.

## 2.18 Genetische Methoden

### 2.18.1 Verwendung von Balancer-Chromosomen

Balancer-Chromosomen sind ein sehr nützliches Werkzeug in der *Drosophila*-Genetik. Da es in vielen Fällen nicht möglich ist, eine Mutation in homozygoter Konstitution in einem Stamm zu halten, da der homozygote Zustand letal, semiletal oder steril ist, und eine heterozygote Konstitution ständige Selektion zur Vermeidung des Verlustes dieser Mutation durch Crossing-over

erforderlich machen würde, werden Balancer-Chromosomen eingesetzt. Es sind für jedes Chromosom von *Drosophila* eigene Balancer-Chromosomen entwickelt worden, die es gestatten, für jede gewünschte Mutation einen stabilen Stamm aufzubauen, der die jeweilige Mutation in heterozygotem Zustand enthält, sodass sich die ständige Selektion erübrigt, ohne dass die Gefahr des Verlustes besteht. Zu diesem Zweck enthält ein Balancer-Chromosom drei Elemente:

1. eine längere einfache oder komplexe Inversion, die den größten Teil des Chromosoms abdeckt. Diese verhindert durch die entstehenden Chromosomenaberrationen, dass Nachkommen mit Crossing-over überlebensfähig sind.
2. einen dominanten Marker, der es erlaubt, dieses Chromosom leicht zu identifizieren.
3. einen rezessiven Letalfaktor, der verhindert, dass das Chromosom in einer homozygoten Konstitution vorkommt. Durch seine Anwesenheit erübrigt sich eine Selektion in jeder Generation.

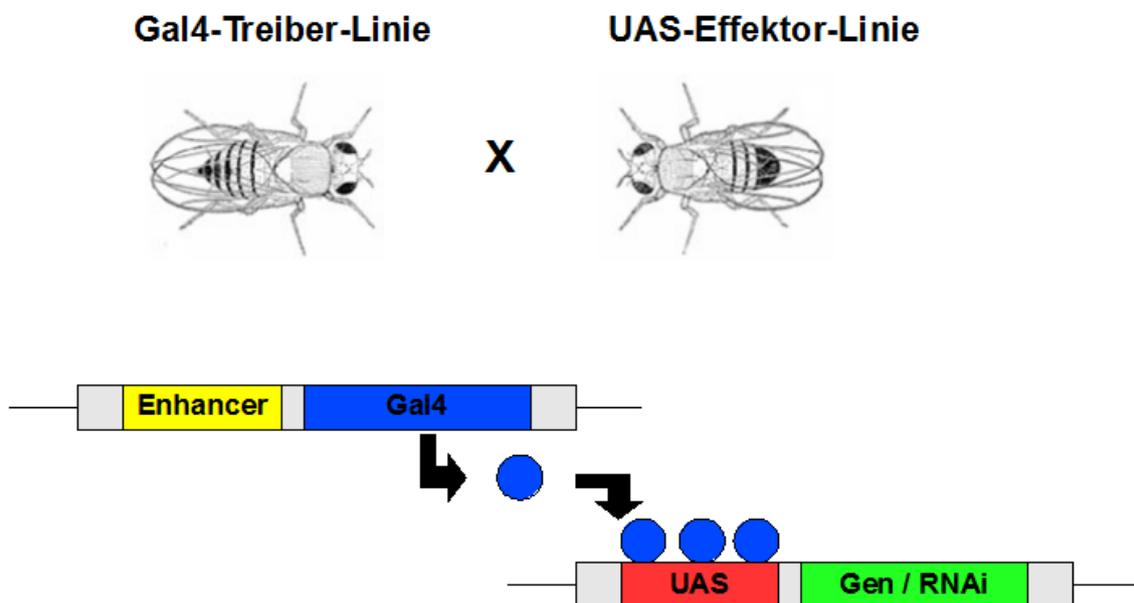
Homozygotie für das Balancer-Chromosom ist oft auch schon durch den dominanten Marker nicht möglich, da viele dominante Mutationen homozygot letal sind.

Verwendet wurden Balancer-Chromosomen für das dritte Chromosom. Das Balancer-Chromosom *TM3* ('third multiple 3') ist durch den dominanten Marker *stubble* erkennbar, welcher kurze Borsten auf dem Thorax verursacht, während das Balancer-Chromosom *TM6* den dominanten Marker *tubby* hat, der dazu führt, dass die Larven und Puppen im Vergleich zum Wildtyp gedrängener aussehen und damit leicht zu identifizieren sind. Der verwendete *TM3/TM6<sup>CS</sup>*-Stamm ist cantonisiert.

### 2.18.2 Das Gal4/UAS-System

Dieses System zur funktionellen Untersuchung von Genen stammt ursprünglich aus der Hefe. Hier kontrolliert der Transkriptionsfaktor Gal4, der aus einer DNA-bindenden und einer aktivierenden Domäne besteht, die Transkription von Genen, deren Produkte für den Galaktoseabbau zuständig sind. Die Regulation erfolgt über Bindung von Gal4 an den Enhancer UAS ('upstream activating sequence'). Die Anwendung des von Brand und Perrimon (1993) für *Drosophila* entwickelten Gal4/UAS-Systems erlaubt es, Gene gezielt zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung und in unterschiedlichen Zelltypen zu exprimieren. Voraussetzung für solche Versuche ist das Einbringen geeigneter Genkonstrukte mit den speziellen Regulationsregionen in das Genom. Zur Durchführung eines Gal4/UAS-Experiments werden zwei genetische Komponenten benötigt (siehe Abbildung 4): zum einen ein Stamm mit dem Gal4-Gen der Hefe, das unter der Kontrolle gewünschter Regulationselemente steht, die eine zell- oder gewebespezifische Expression des Gens

gestatten. Dies ist die sogenannte Gal4-Treiber-Linie. Zum anderen wird eine Transformante mit dem untersuchten Gen gebraucht, das unter der Transkriptionskontrolle einer UAS-Region steht. Diese Linie wird als UAS-Effektor-Linie bezeichnet. Bei Kreuzung von Tieren beider Stämme kann der Gal4-Transkriptionsfaktor an die UAS-Region binden und dadurch das dahintergeschaltete Gen aktivieren. Es gibt zwei Möglichkeiten für die Herstellung der Treiber-Linien. Beim sogenannten Enhancer-Trap inseriert das P-Element mit dem Gal4-Gen der Hefe zwischen genomischem Enhancer und Promotor eines endogenen Gens. Bei dieser Treiber-Linie folgt die Expression des Gal4-Proteins dem endogenen Expressionsmuster des von diesem Enhancer kontrollierten Gens. Die zweite Möglichkeit zur Erzeugung von Treiber-Linien besteht darin, das Gal4-Gen der Hefe hinter eine gewünschte Enhancer-Region zu klonieren. Dann ist die Position der Insertion dieses P-Elements nicht abhängig von einem endogenen Enhancer, und das Gen wird in denjenigen Geweben exprimiert, in denen Transkriptionsfaktoren an diese Enhancer-Sequenz binden. Es gibt bereits eine Sammlung solcher *Drosophila*-Stämme, die bei den Stockzentren bestellt werden können.



**Abbildung 4: Prinzip des Gal4/UAS-Systems in *Drosophila*.** Es werden zwei transgene Linien, eine Gal4- und eine UAS-Linie benötigt.

### 2.18.3 RNA-Interferenz

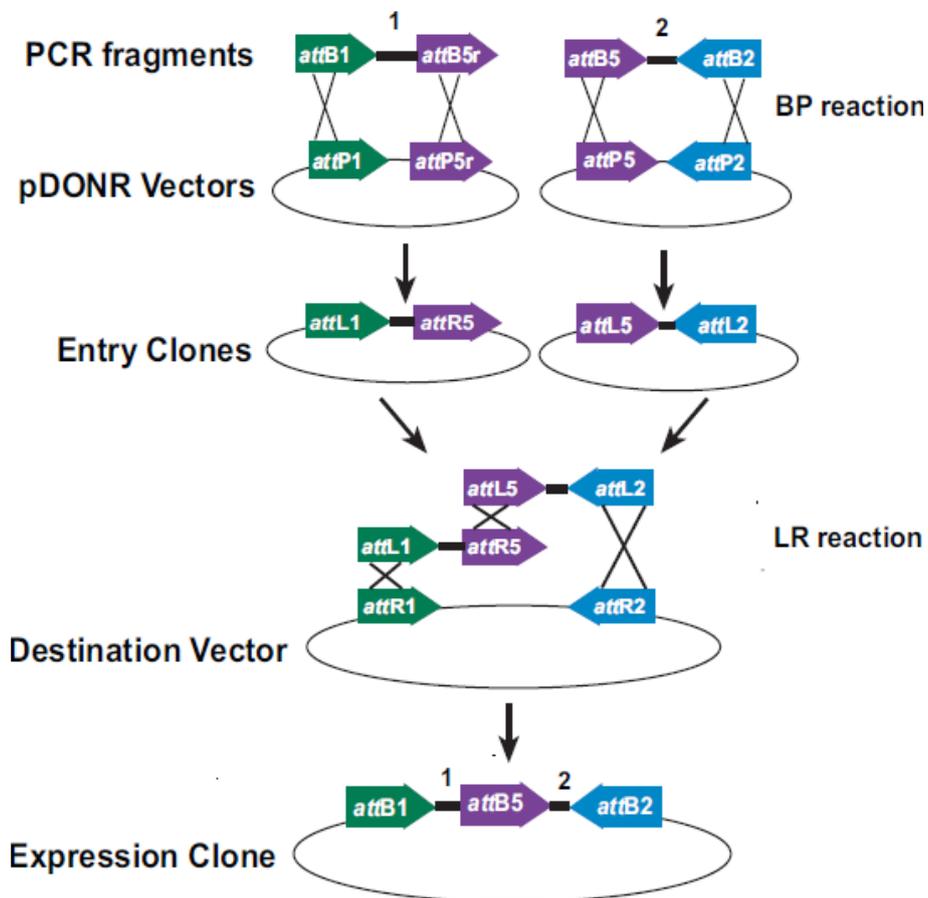
Die RNA-Interferenz (RNAi) wird durch doppelsträngige RNA-Helices ausgelöst, die entweder von außen als sogenannte 'small interfering (si)RNAs' in die Zelle eingebracht wurden, oder die

endogen als kleine 'non-coding (nc)RNAs' produziert wurden und auch als microRNAs (miRNAs) bezeichnet werden (Rana, 2007). Lange wurde angenommen, dass die nicht-kodierenden RNAs die Genexpression durch Sequenz-spezifische Interaktion mit regulatorischen Regionen kontrollieren (Zaratiegui et al., 2007). Die zelluläre RNAi-Anwort ist auch ein Abwehrmechanismus gegen RNA-Viren und Transposons (Rana, 2007). Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Spaltung langer doppelsträngiger RNA-Moleküle (dsRNA) durch die Endoribonuclease Dicer in kleinere, 21 bis 23 Nukleotide (nt) lange dsRNA-Fragmente. Dicer ist ein Mitglied der RNase III-Familie und zerlegt sowohl lineare dsRNAs, als auch RNA-Substrate mit einem Hairpin (Rana, 2007). Die RNA-Produkte dieser Spaltung besitzen einen 2-nt-Überhang an ihrem 3'-Ende und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende. Der Leitstrang der siRNA wird nachfolgend in den 'RNA-induced silencing complex' (RISC) integriert, und es entsteht ein RNA-Protein-Komplex. Der reife RISC-Komplex enthält nur noch den Antisense-Leitstrang, der die Ziel-RNA aufgrund von Komplementarität erkennt und die Genexpression drosselt, indem die Ziel-RNA abgebaut wird. Die RNA-Interferenz ist zu einem Standard-Werkzeug geworden, um die Auswirkungen des 'gene silencing' im Organismus zu studieren. Es werden Vektoren zur Expression von Hairpin-RNAs verwendet, welche RNAi induzieren. Dadurch ist es möglich, die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene zu regulieren und das entsprechende Protein auszuschalten.

#### 2.18.4 Ortsspezifische Rekombination

Die MultiSite Gateway® Technologie ist eine Klonierungs-Methode, die auf dem ortsspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda zum Einbau des Phagengenoms in das *E. coli*-Chromosom basiert (Landy, 1989). Auch das Umschalten zwischen lytischem und lysogenem Zyklus funktioniert über ortsspezifische Rekombination an spezifischen Rekombinationssequenzen, sogenannten 'attachment sites'. Die Rekombination zwischen Phagen- und *E. coli*-DNA verläuft konservativ, was bedeutet, dass es keine Zunahme an oder Verlust von Nukleotiden gibt. Auch ist keine DNA-Synthese nötig. Stattdessen kommt es zu einem zweifachen Doppelstrangbruch und zur Ligation der DNA-Moleküle von Phage und Bakterium. Daher liegen diese 'att sites' nach erfolgter Rekombination als Hybridsequenzen vor. Dieses System hat man sich zunutze gemacht, um gleichzeitig mehrere DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren. Der lysogene Zyklus wird durch das Enzym Integrase (Int) des Lambda-Phagen und den Integration Host Factor (IHF) von *E. coli* katalysiert. Beide Proteine sind Bestandteil des BP Clonase™ II Enzym-Mix von Invitrogen. Der lytische Zyklus dagegen wird katalysiert durch die Integrase sowie die Excisionase (Xis) des Lambda-Phagen und den Integration Host Factor von *E. coli*, die im LR Clonase™ II Plus Enzym-

Mix von Invitrogen enthalten sind. Bei der MultiSite Gateway® Pro 2-Fragment Rekombination werden zwei PCR-Produkte, die von spezifischen *attB* oder *attBr* Sequenzen flankiert werden, und zwei MultiSite Gateway® Pro Donor-Vektoren in separaten BP Rekombinationsreaktionen verwendet, um zwei Entry-Klone zu generieren. Diese werden zusammen mit einem Destination-Vektor in einer MultiSite Gateway® Pro LR Rekombinationsreaktion verwendet, um einen Expressions-Klon zu erzeugen, der zwei DNA-Elemente enthält. Abbildung 5 fasst die Vorgehensweise schematisch zusammen. Für die Klonierung wurde der 'MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination' von Invitrogen verwendet. Die Reaktionen wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.



**Abbildung 5: Prinzip der MultiSite Gateway® Pro 2-Fragment Rekombination.** Erklärungen zu den einzelnen Schritten siehe Text.

Die Donor-Vektoren enthalten weiterhin das von *att*-Stellen flankierte Gen *ccdB*, welches negative Selektion der Donor- und Destination-Vektoren nach Rekombination und Transformation in *E. coli* ermöglicht. Das *ccdB*-Protein beeinträchtigt die Funktion der DNA-Gyrase von *E. coli*, wodurch

die meisten *E. coli*-Stämme in ihrem Wachstum gestört sind. Wenn Rekombination zwischen einem Donor-Vektor und einem *attB*-PCR-Produkt oder zwischen einem Destination-Vektor und einem Entry-Klon stattfindet, wird das *ccdB*-Gen durch das gewünschte Gen ersetzt. Bakterienzellen, die bei der Transformation nicht-rekombinierte Vektoren oder das By-Produkt aufnehmen, können daher nicht wachsen. Ein weiteres Kriterium zur Selektion sind die unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzen der verschiedenen Vektoren. Da die Donor-Vektoren das Gen für Kanamycin-Resistenz enthalten, der Destination-Vektor aber mit dem Gen für Ampicillin-Resistenz ausgestattet ist, können nach der LR Rekombination nur Bakterienzellen auf Amp<sup>+</sup>-Platten wachsen, die bei der Transformation einen erfolgreich rekombinierten Destination-Vektor aufgenommen haben.

## 2.19 Weitere verwendete Geräte und Materialien

- |                                      |                               |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| - Aluminium-Folie                    | Hartenstein                   |
| - Binokular                          | WILD Heerbrugg                |
| - DNA-Gelkammer                      |                               |
| - Fluoreszenzmikroskop               | Leica                         |
| - Haushaltsfolie                     | übliche aus dem Handel        |
| - Heizgerät                          | Eppendorf Thermomixer comfort |
| - Horizontalschüttler Raumtemperatur | Edmund Bühler KS-10           |
| - Horizontalschüttler 37°C           | Edmund Bühler VKS-75          |
| - Kaltlicht-Quelle                   | Zeiss                         |
| - Parafilm                           |                               |
| - Power Supply                       | Pharmacia oder Biometra       |
| - Tisch-Zentrifuge                   | Eppendorf                     |
| - Ultrazentrifuge                    | Beckman J2-21                 |
| - UV-Apparatur                       | Peqlab Biotechnologie GmbH    |

## 2.20 Datenbanken

- |   |  |
|---|--|
| Flybase                                       | <a href="http://www.flybase.bio.india.edu">www.flybase.bio.india.edu</a> |
| National Center for Biotechnology Information | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>           |

### 3. Ergebnisse

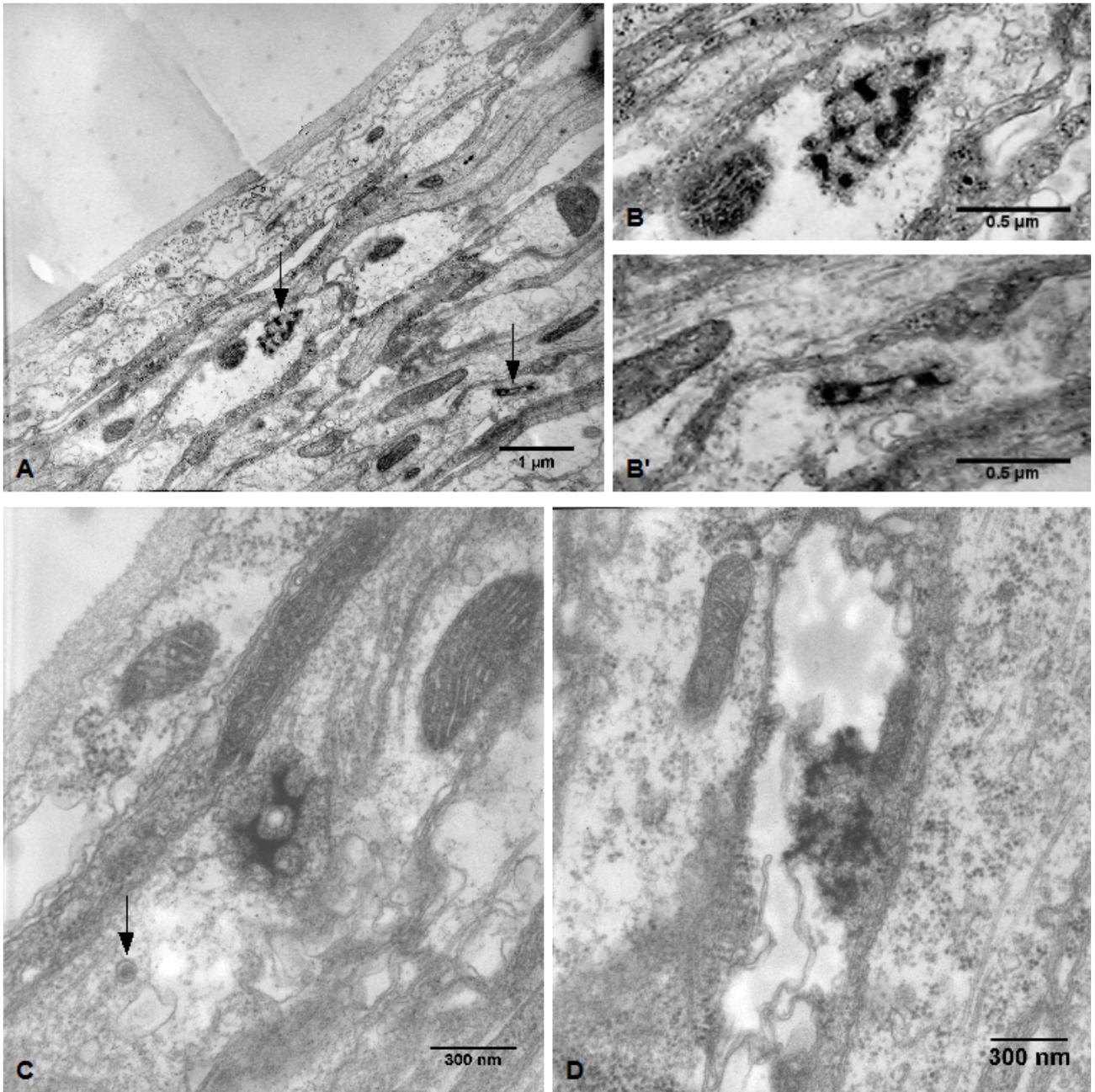
#### 3.1 Ultrastrukturelle Charakterisierung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven der *Srpk79D*<sup>VN</sup> Nullmutante von *Drosophila melanogaster*

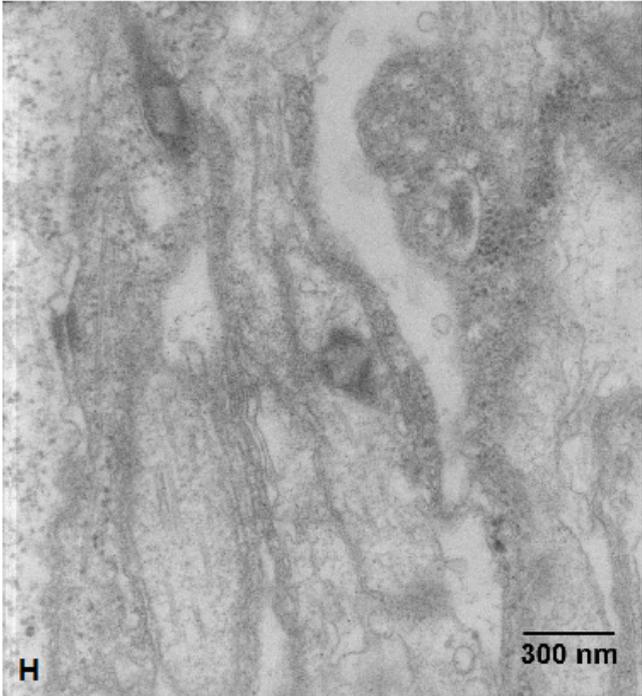
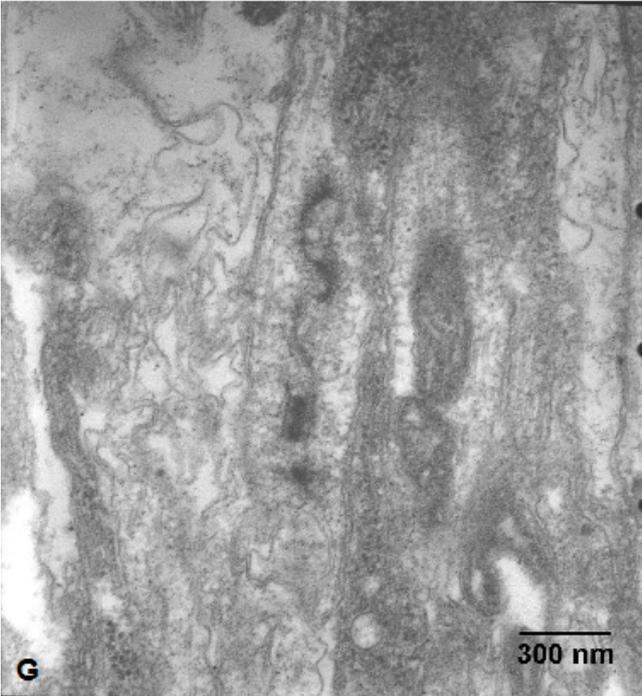
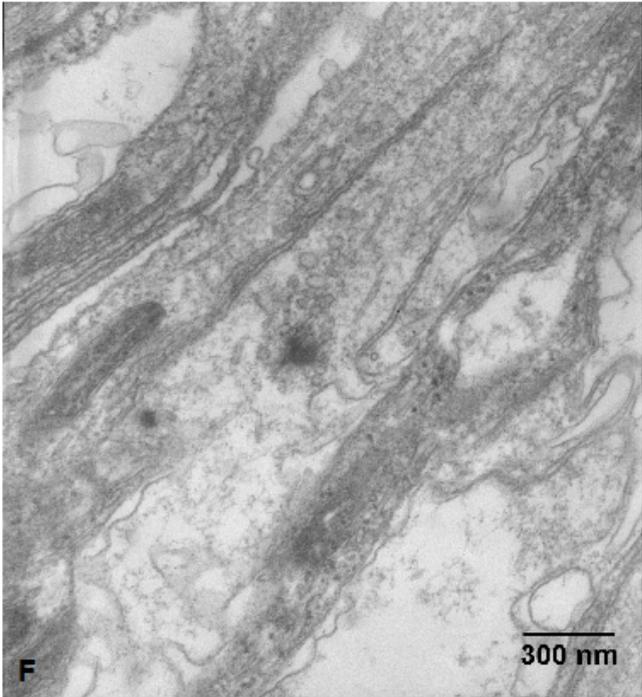
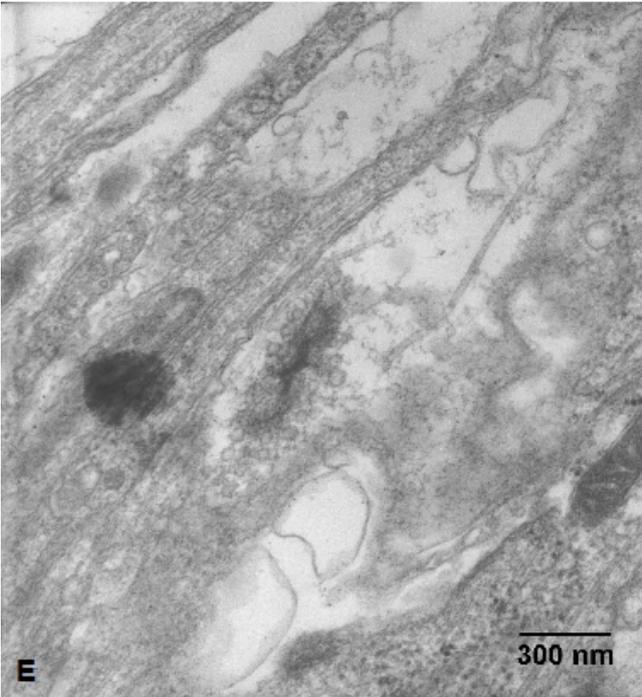
##### 3.1.1 Standard-Elektronenmikroskopie

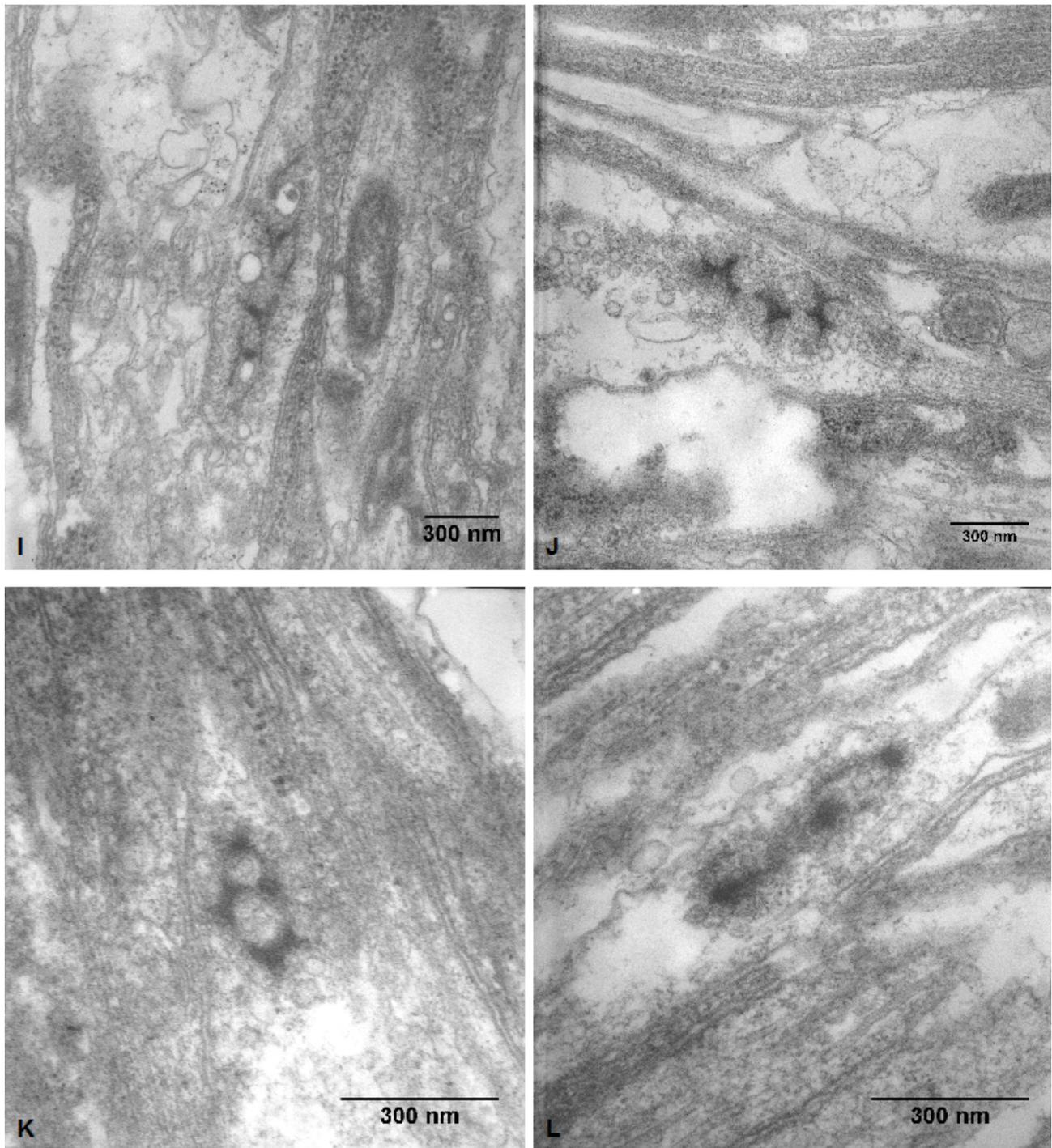
Die larvalen Segmental- und Intersegmentalnerven der Nullmutante für die SR Proteinkinase 79D (SRPK79D) von *Drosophila melanogaster* weisen bei Färbung mit dem monoklonalen Antikörper (MAK) nc82 gegen das Aktive Zone Protein Bruchpilot ein charakteristisches Muster an immunoreaktiven Punkten auf, das im Fluoreszenzmikroskop deutlich sichtbar ist. Diese Protein-Agglomerate sind sehr heterogen, was ihre Größe angeht.

Da Bruchpilot struktureller Bestandteil der elektronendichten T-Bars der Aktiven Zone von *Drosophila melanogaster* ist, wurde die Ultrastruktur dieser Nerven im dritten Larvenstadium der *Srpk79D*<sup>VN</sup> Nullmutante durch Standard-Elektronenmikroskopie untersucht, und zwar auf der Suche nach auffälligen elektronendichten Strukturen, die für die Nullmutante spezifisch sind.

In den neuronalen Axonen der *Srpk79D*<sup>VN</sup> Nullmutante wurden große, elektronendichte Komplexe gefunden, wie sie in Abbildung 1 zu sehen sind. Diese Komplexe variieren sowohl in Gestalt als auch in ihrer Größe und sind oft von transparenten Vesikeln umgeben. Zum Teil sehen diese Komplexe aus wie einzelne, nebeneinander liegende T-Bars (z.B. Abbildung 1I & J), zum Teil sind diese Strukturen aber auch sehr komplex und ähneln mehreren T-Bars, die an ihrer Basis fusioniert sind (z.B. Abbildung 1C & K). In manchen Fällen ist eine einzelne Reihe mit mehreren, an der Basis fusionierten T-Bars zu sehen (z.B. Abbildung 1I), in anderen Fällen spiegeln die Komplexe möglicherweise zwei gegenüberliegende Reihen von T-Bars wider, die an Basis und Plattform fusioniert sind (siehe Abbildung B'). Andere Komplexe dagegen haben ein elektronendichtes Zentrum, umgeben von filamentösem Material (z.B. Abbildung 1L). Die Vesikel, welche die elektronendichten Agglomerate umgeben, variieren in ihrer Größe. Kleine helle Vesikel liegen sehr dicht am elektronendichten Material, während größere Vesikel bevorzugt in der Peripherie dieser Strukturen lokalisiert sind. Zuweilen findet man auch sehr große Vesikel (z.B. Abbildung 1C & I). In einiger Entfernung von den elektronendichten Komplexen sind gelegentlich auch elektronendichte Vesikel, sogenannte 'Dense core vesicles' (DCVs), zu sehen (Pfeil in Abbildung 1C).







**Abbildung 1: Mutation des *Srpk79D*-Gens führt zu ausgedehnten elektronendichten und T-Bar-ähnlichen Strukturen in larvalen Nerven.** (A) Ultradünnschnitt eines larvalen Nerven der *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutante. (B) und (B') Vergrößerungen der in (A) mit Pfeilen markierten elektronendichten Strukturen. (C-L) Weitere Beispiele für in der Nullmutante vorkommende elektronendichte Komplexe.

### 3.1.2 Immuno-Elektronenmikroskopie

Um zu verifizieren, dass die oben beschriebenen elektronendichten Agglomerate den im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren, Bruchpilot-enthaltenden Punkten entsprechen, wurden Präparate für die Immuno-Elektronenmikroskopie hergestellt.

#### 3.1.2.1 Post-embedding Immuno-Gold-Färbung

Bei dieser Methode wird das Präparat nach entsprechender Vorbehandlung zunächst in ein Medium eingebettet. Im Anschluss daran werden Ultradünnschnitte angefertigt, auf denen die Inkubation mit den Antikörpern erfolgt.

Zunächst wurde also versucht, eine Immuno-Gold-Färbung auf Ultradünnschnitten von in LR White-Medium eingebetteten larvalen Präparaten durchzuführen. In Positiv-Kontrollfärbungen mit einem primären Maus-Antikörper gegen Tubulin und dem Sekundär-Antikörper anti-Maus-IgG, gekoppelt an 12 nm kolloidales Gold, waren Goldpartikel in den larvalen Nerven bei Betrachtung im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) zu sehen. Bei Verwendung des primären Antikörpers nc82 gegen Bruchpilot war jedoch kein Signal im TEM zu erkennen. Möglicherweise kann der Antikörper nc82 auf dem Einbettmedium LR White nicht an sein Epitop binden, wie es auch für andere Antikörper schon festgestellt wurde. Denkbar wäre auch, dass das Epitop von MAK nc82 hitzeempfindlich ist und bei der LR-White-Polymerisation, die für mindestens 3 Tage bei 40°C durchgeführt wird, zerstört wird.

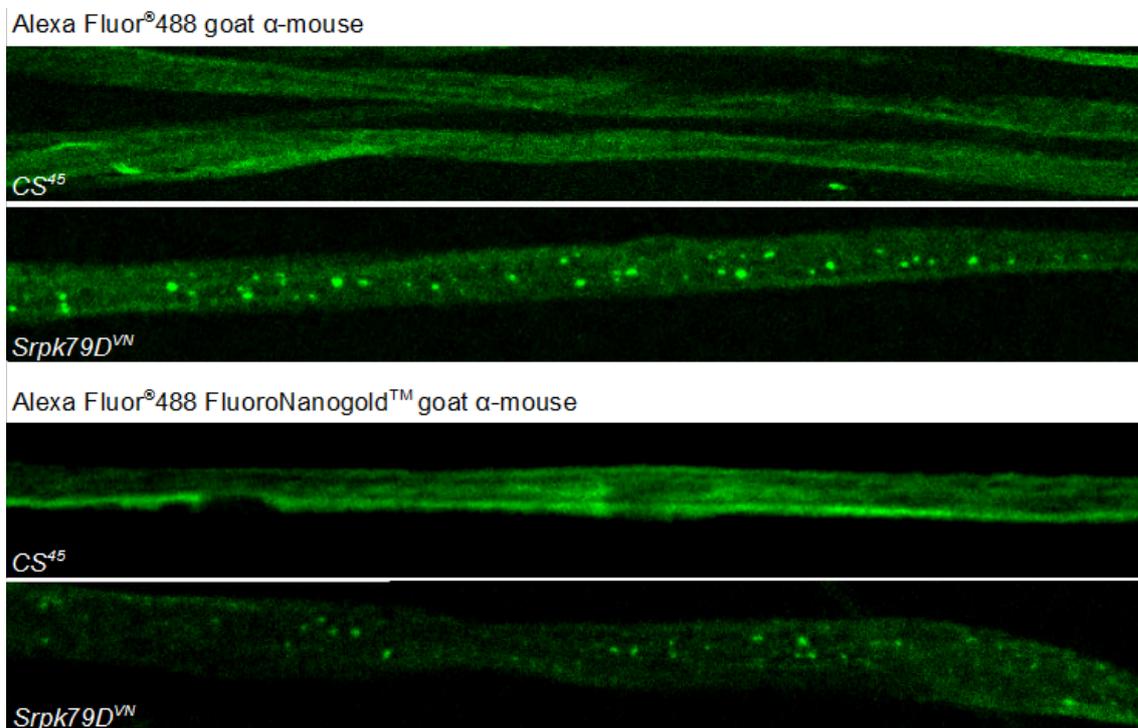
#### 3.1.2.2 Pre-embedding Immuno-Gold-Färbung

Bei diesem Verfahren wird das Präparat erst mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert, bevor es in das Medium Epon eingebettet wird. Anschließend werden wiederum Ultradünnschnitte für das TEM hergestellt.

Für die Pre-embedding Immuno-Gold-Färbung wurde der Sekundär-Antikörper Alexa Fluor®488 FluoroNanogold™-anti-mouse Fab' verwendet, der sowohl ein Fluorochrom enthält, als auch an ein 1.4 nm Nanogold™ gekoppelt ist. Da dieser Nanogold-Partikel aber zu klein wäre, um auch bei hoher Vergrößerung im TEM erkannt zu werden, muss eine Silber-Verstärkung durchgeführt werden, bei der sich kolloidales Silber an den Goldpartikel anlagert, und das Signal so verstärkt wird. Der Vorteil der Verwendung dieses Sekundär-Antikörpers lag darin, dass aufgrund des Vorhandenseins des Fluorophors zunächst getestet werden konnte, ob Primär- und Sekundär-

Antikörper nach den für die Immuno-Elektronenmikroskopie nötigen Fixierbedingungen in der Lage sind, die Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Nerven der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante zu färben, denn die Präparate müssen mit einer Formaldehyd/Glutaraldehyd-Mischung fixiert werden. Außerdem konnte so für beide Sekundär-Antikörper, Alexa Fluor<sup>®</sup>488 goat anti-mouse-IgG, der für die Immuno-Histochemie verwendet wurde, und Alexa Fluor<sup>®</sup>488 FluoroNanogold<sup>™</sup> goat anti-mouse-IgG, der in der Immuno-Elektronenmikroskopie eingesetzt wurde, die Bindungsstärke an den Primär-Antikörper nc82 direkt verglichen werden.

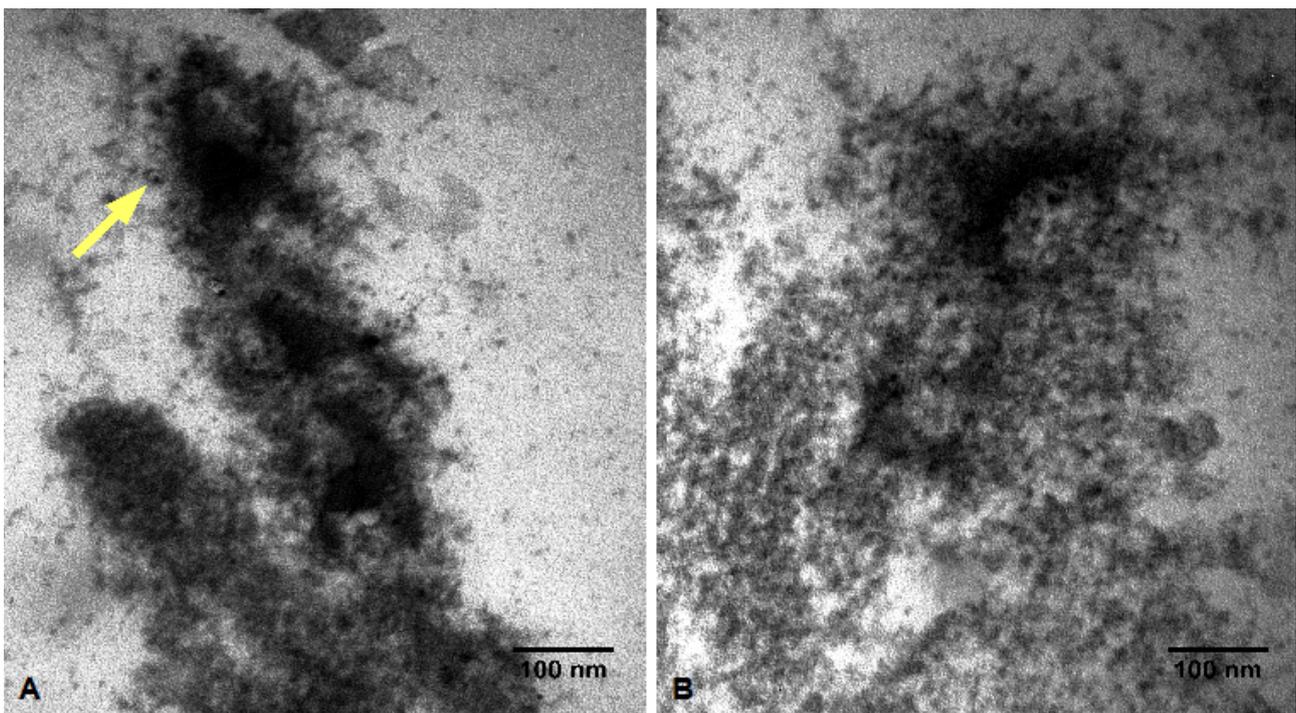
In einer Fixativ-Konzentrationsreihe mit 0.02/0.04/0.06/0.08/0.1/0.5% Glutaraldehyd in 2% Formaldehyd wurde ermittelt, welche Glutaraldehyd-Konzentration gerade noch eine Erkennung der Bruchpilot-Agglomerate durch nc82 erlaubt. Wie Abbildung 2 zeigt, ist das bei 0.06% noch der Fall. Außerdem erkennt der Zweit-Antikörper Alexa Fluor<sup>®</sup>488 FluoroNanogold<sup>™</sup> goat anti-mouse-IgG die Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Nerven vergleichbar gut wie Alexa Fluor<sup>®</sup>488 goat  $\alpha$ -mouse. Bei Fixierung mit einer höheren Konzentration an Glutaraldehyd war eine Erkennung der BRP-Agglomerate durch nc82 allerdings nicht mehr möglich.

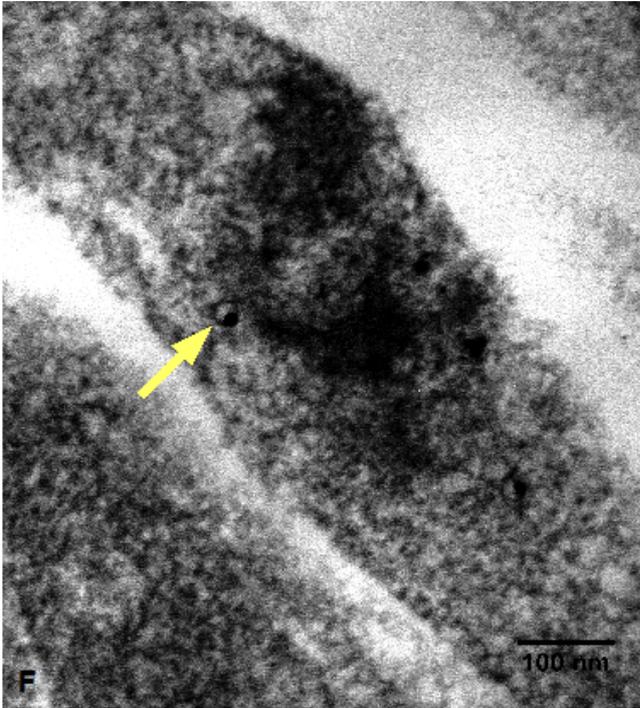
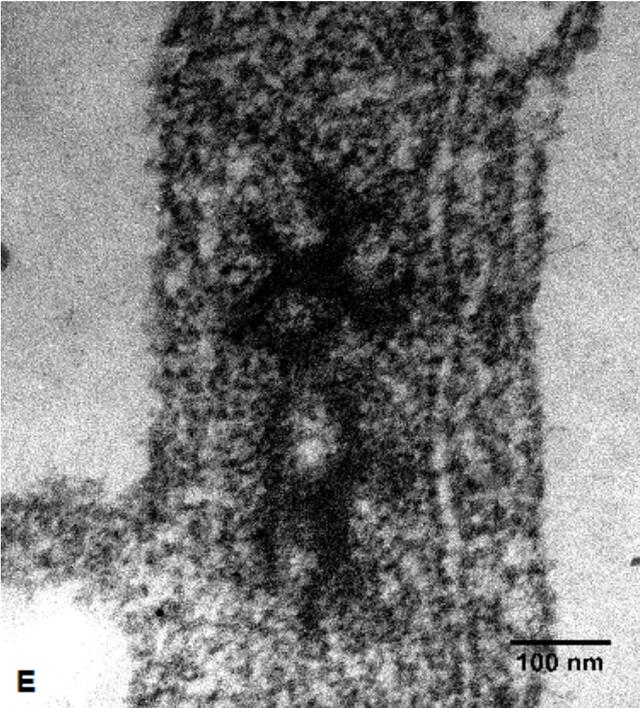
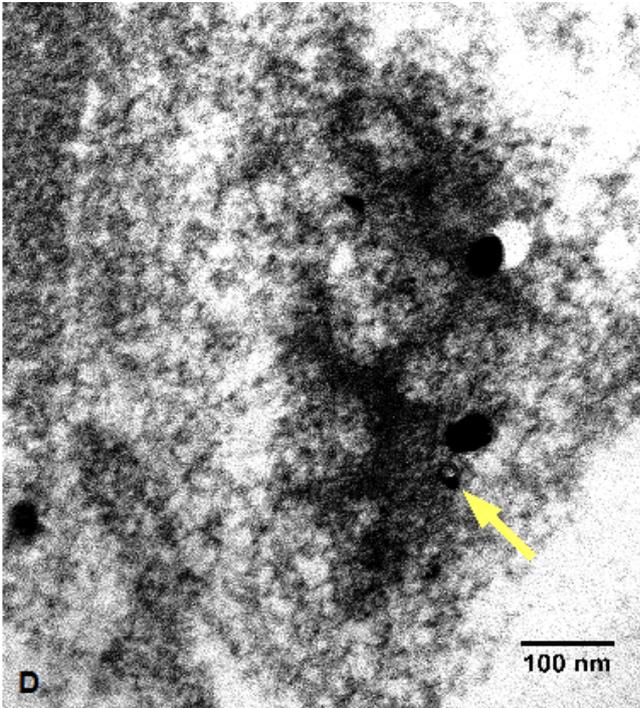
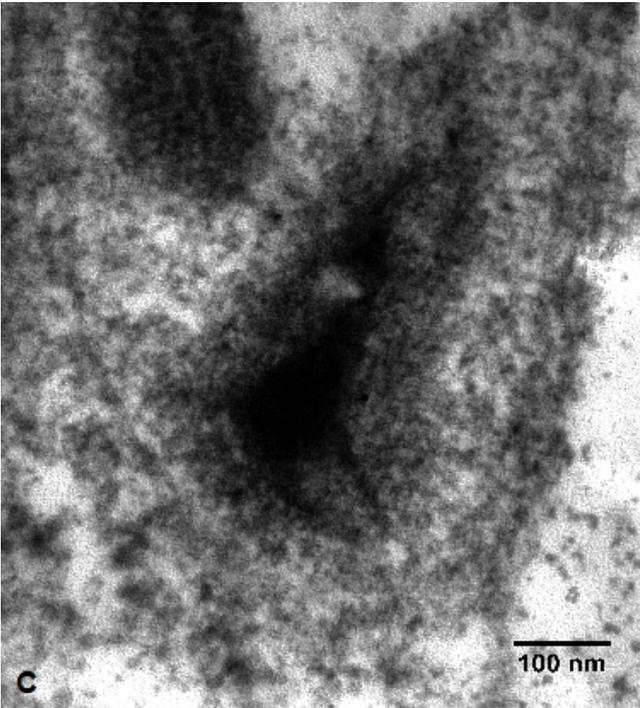


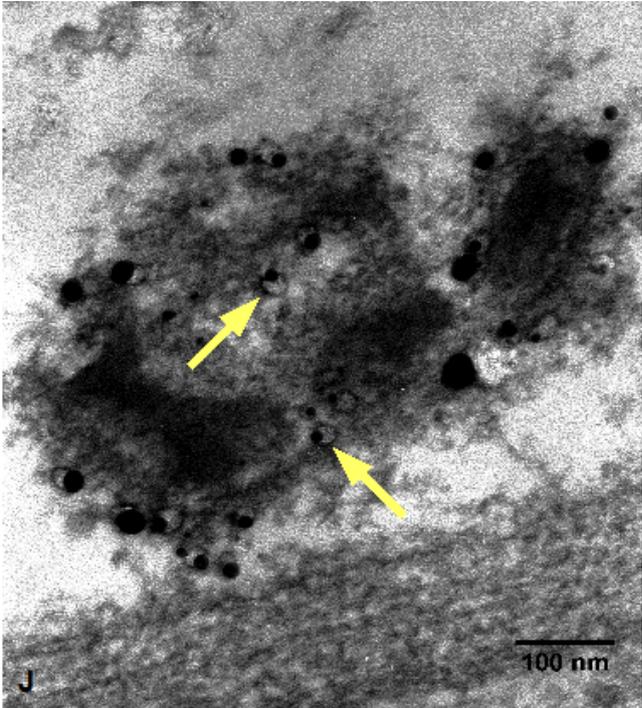
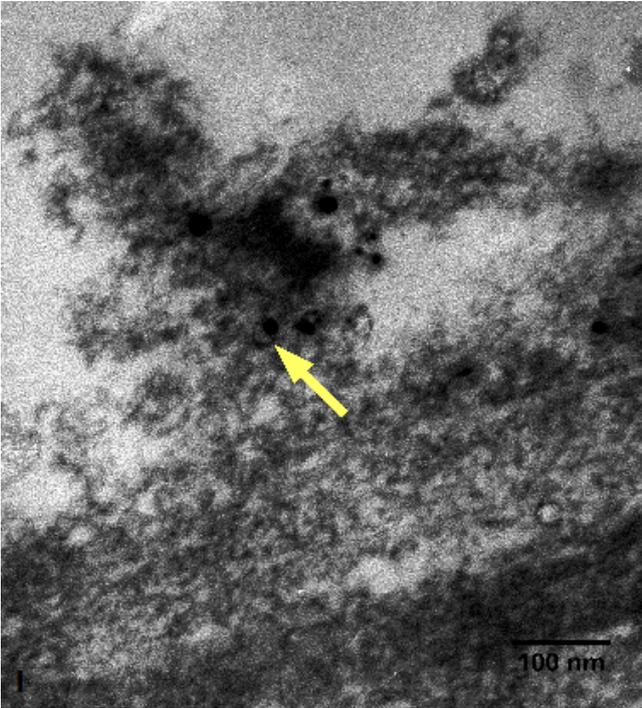
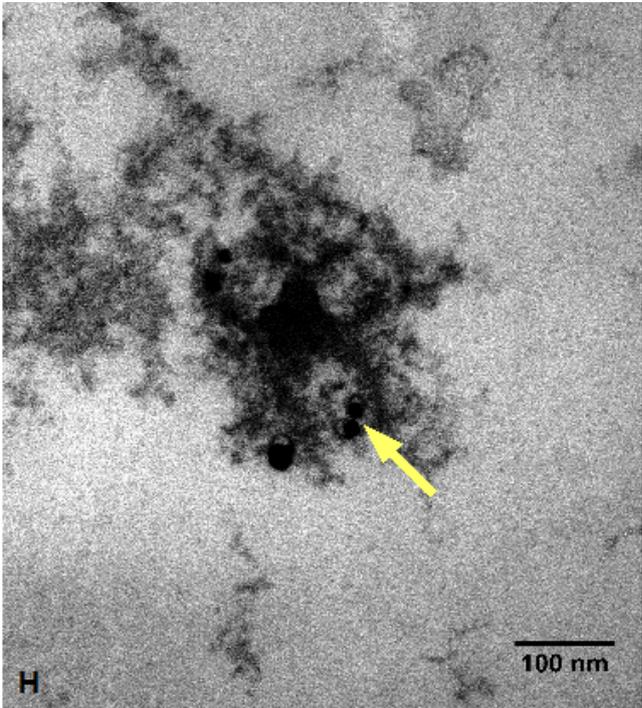
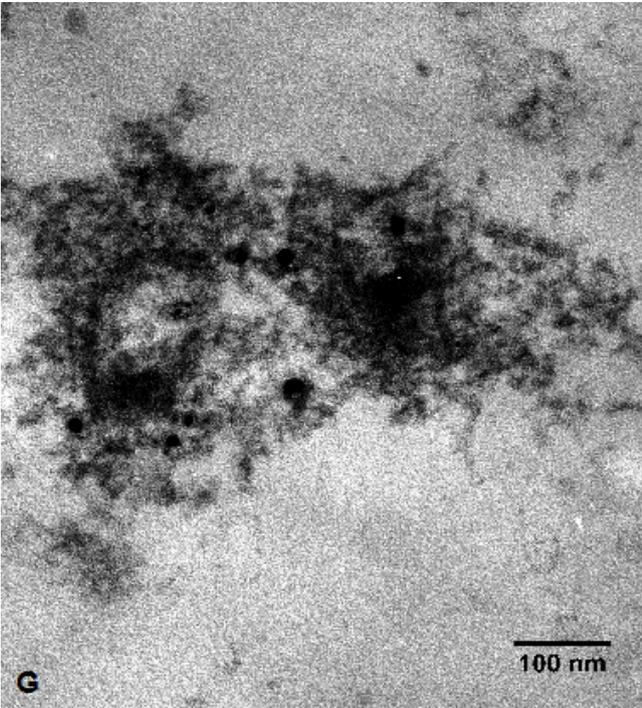
**Abbildung 2:** Vergleich der Färbungsmuster der Sekundär-Antikörper Alexa Fluor<sup>®</sup>488 goat  $\alpha$ -mouse und Alexa Fluor<sup>®</sup>488 FluoroNanogold<sup>™</sup> goat  $\alpha$ -mouse. Letzterer färbt die durch den MAK nc82 (1:100) markierten Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Nerven der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante bei Fixierung mit einer Konzentration von 0.06% Glutaraldehyd in 2% Formaldehyd.

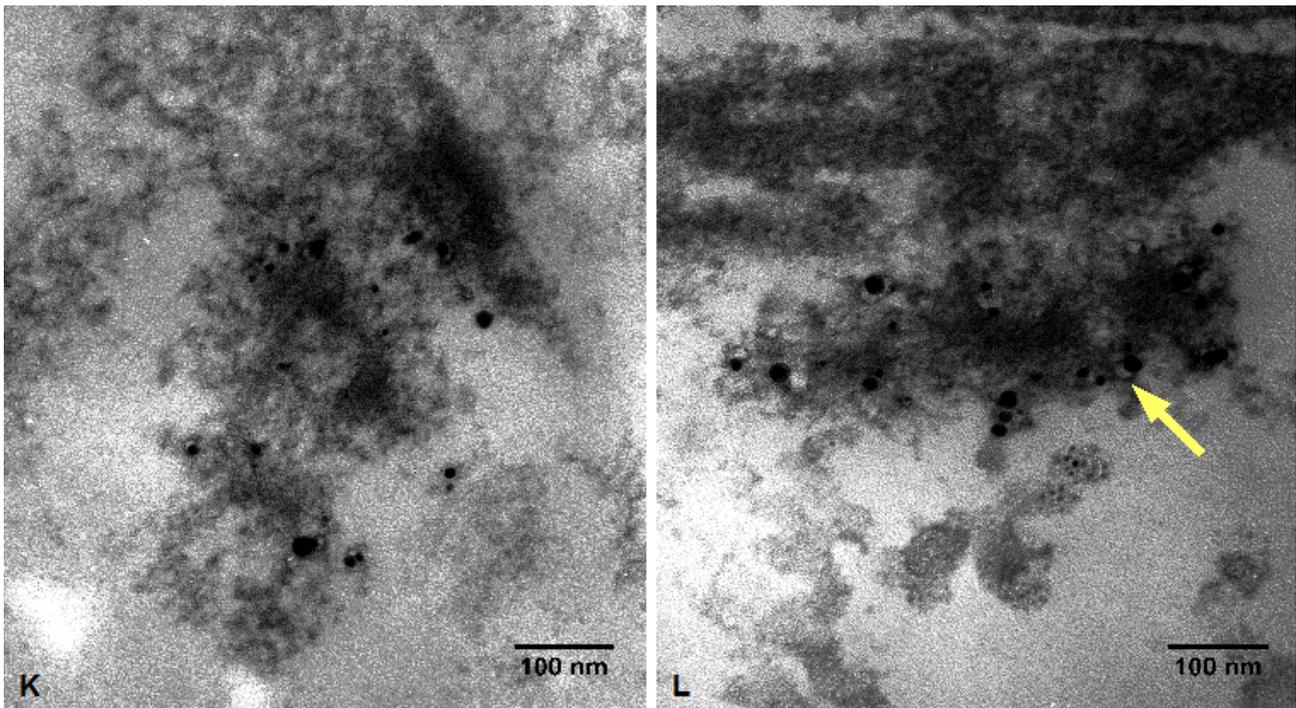
Auf ultrastruktureller Ebene fanden sich wiederum elektronendichte Komplexe, die mit Gold/Silber markiert waren. Die Größe der Partikel variierte, je nachdem, wie viel Silber sich an das Nanogold angelagert hatte. Abbildung 3 zeigt Beispiele für solche Gold/Silber-markierten Komplexe in den neuronalen Axonen von *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutanten-Larven. Die Gold/Silber-Körnchen sind stets in der Peripherie und nicht im Zentrum der elektronendichten Strukturen zu finden. Die Präparate belegen, dass die in der konventionellen Elektronenmikroskopie beobachteten Agglomerate tatsächlich Bruchpilot enthalten und damit das Pendant sind zu den fluoreszierenden Bruchpilot-Punkten, die im Lichtmikroskop in den Mutanten beobachtet werden.

Auch waren in vielen Fällen immunoreaktive Vesikel in unmittelbarer Nähe der T-Bar-ähnlichen Strukturen zu finden (siehe gelbe Pfeile in Abbildung 4A, D, F, H, I, J & L), was darauf hindeutet, dass Bruchpilot möglicherweise in Precursor-Transport-Vesikeln (PTVs) vom Zellkörper zu den Boutons transportiert wird.

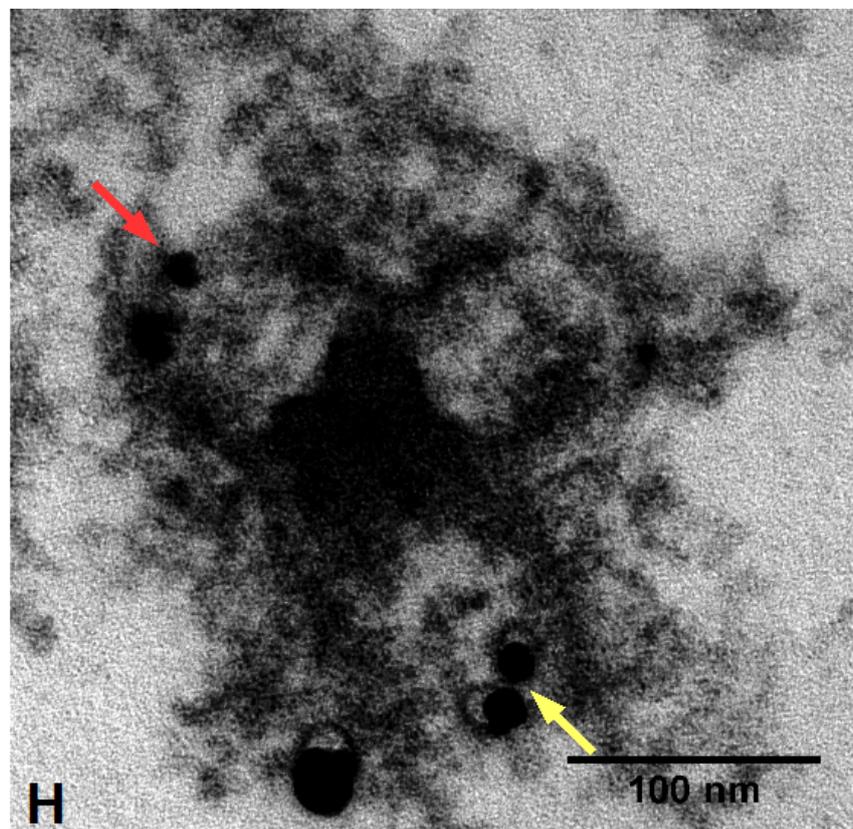


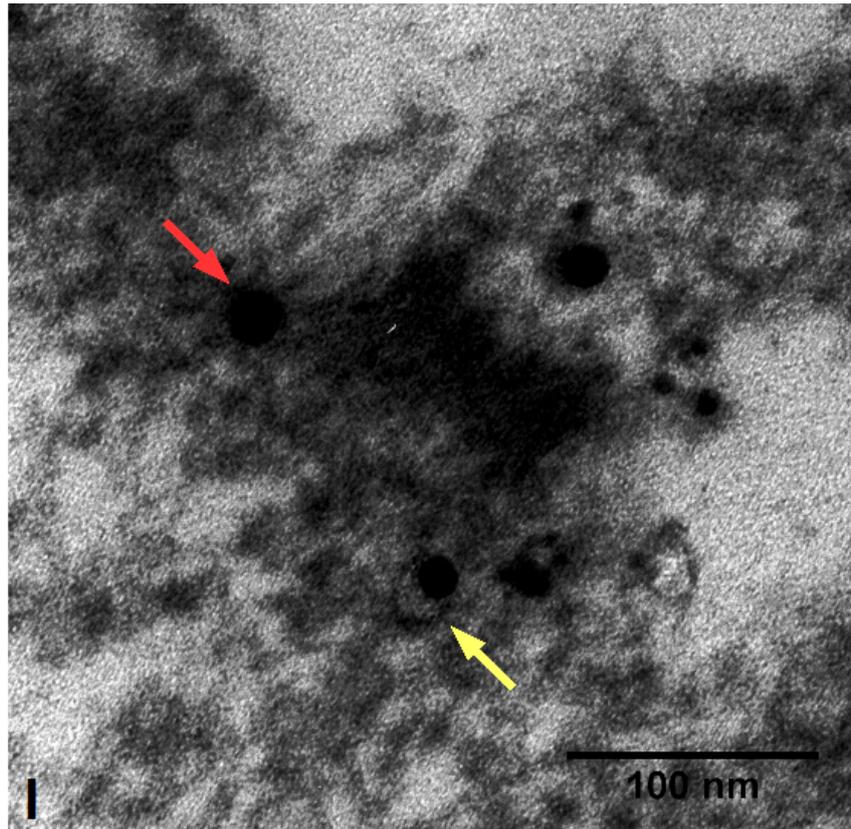






**Abbildung 3: Mutation des *Srpk79D*-Gens hat die Bildung von T-Bar-ähnlichen und Bruchpilot-immunoreaktiven Agglomeraten in larvalen Nerven zur Folge. (A-L) Ultradünnschnitte larvaler Nerven der *Srpk79D<sup>ΔN</sup>* Nullmutante zeigen Gold/Silber-Niederschläge in der Peripherie der elektronendichten Komplexe. Gelbe Pfeile markieren Bruchpilot-immunoreaktive Vesikel. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP.**



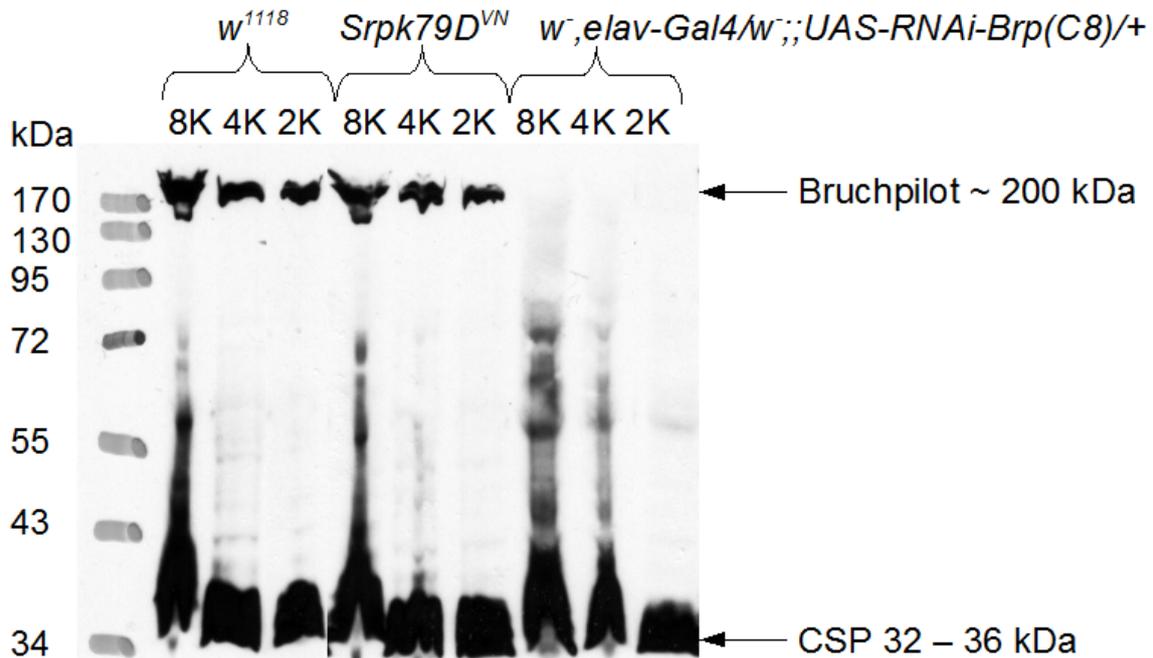


**Abbildung 4:** Vergrößerung der Abbildungen 3H und I. Gelbe Pfeile deuten auf Bruchpilot-immunoreaktive Vesikel, während rote Pfeile auf die Bruchpilot-Immunoreaktivität in der Peripherie elektronendichter Agglomerate in larvalen Nerven der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante zeigen. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP.

### 3.2 Expressionsstärke des Bruchpilot-Proteins in Köpfen und larvalen Gehirnen der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante von *Drosophila melanogaster*

Da die Überexpression von Bruchpilot ebenfalls zu BRP-positiven axonalen Agglomeraten führt (Nieratschker et al., 2009), stellte sich die Frage, ob der Phänotyp der *Srpk79D* Mutanten auf einer Überexpression von BRP beruht. In Western Blot Analysen war bereits gezeigt worden (Nieratschker et al., 2009), dass in adulten Fliegen der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp keine Überexpression von Bruchpilot vorliegt. Die Wiederholung des Versuchs in Abbildung 5 bestätigt diesen Befund. Der semiquantitative Western Blot lässt erkennen, dass sich die Mengen an Bruchpilot-Protein in der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante und dem Wildtyp nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Als Negativ-Kontrolle dienten Bruchpilot-Knock-down-Fliegen. Wie man deutlich sehen kann, führt ein durch den pan-neuronalen Treiber *elav-Gal4* exprimiertes RNAi-

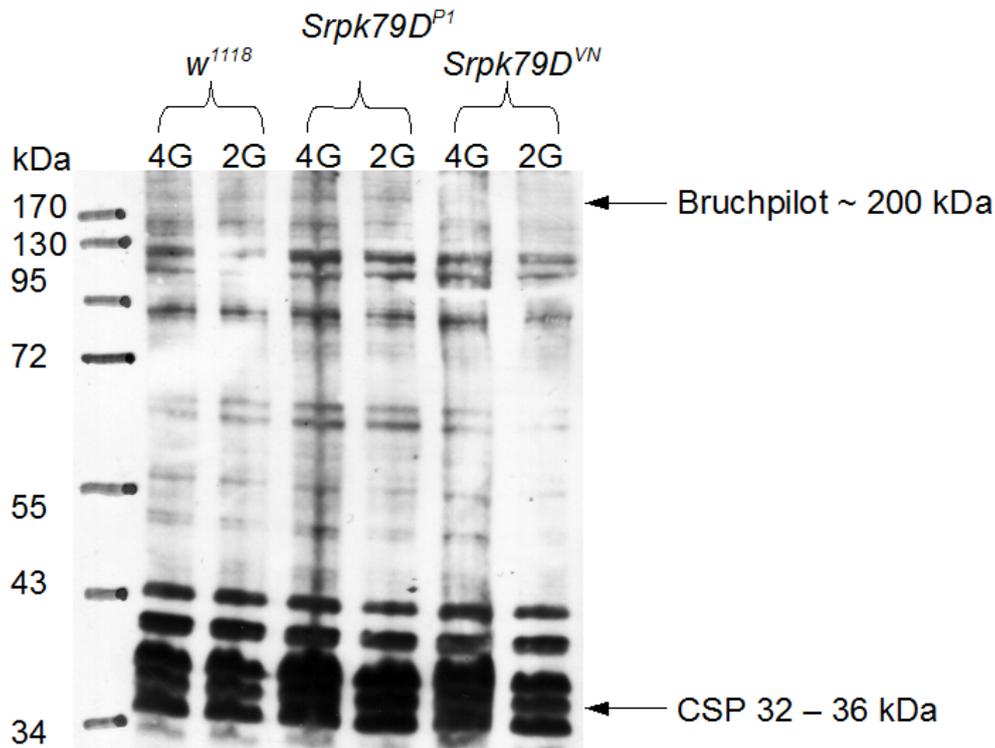
Konstrukt gegen Bruchpilot zum Verlust des Signals in Fliegen der F1-Generation.



**Abbildung 5:** Die Expression von Bruchpilot in adulten Fliegenköpfen von Wildtyp und *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante ist etwa gleich stark. Knock-down von Bruchpilot durch RNAi führt zum Verlust des Proteins. Als Beladungskontrolle diente das Cystein string protein (CSP). Aufgetragen wurden jeweils acht, vier und zwei Fliegenköpfe. Entwickelt wurde der Blot mit einem Antikörperringemisch aus MAK nc82 (1:100) gegen BRP und MAK ab49 (1:100) gegen CSP.

Um die Frage zu klären, ob Bruchpilot eventuell in Larven der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante, sowie der P-Element-Insertionslinie *Srpk79D<sup>PI</sup>*, verglichen mit dem Wildtyp, überexprimiert wird, wurde wiederum ein semiquantitativer Western Blot mit larvalen Gehirnen und den anhängenden Nerven durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 6 dargestellt ist. In den Gehirnen von Larven der Linien *Srpk79D<sup>VN</sup>* und *Srpk79D<sup>PI</sup>* war in Relation zum Wildtyp keine Überexpression von Bruchpilot feststellbar.

Daraus folgt, dass es bei Mutation des *Srpk79D*-Gens, sei es durch Insertion eines P-Elements im ersten Exon, wie es bei der *Srpk79D<sup>PI</sup>*-Linie der Fall ist, oder durch Knock-out des Gens wie in der *Srpk79D<sup>VN</sup>*-Linie, auch in einem früheren Entwicklungsstadium von *Drosophila melanogaster*, wie den Larven, zu keiner Überexpression von Bruchpilot kommt.



**Abbildung 6: Mutation des *Srpk79D*-Gens führt auch in Larven nicht zur Überexpression von Bruchpilot.** In Relation zum Signal der Beladungs-Kontrolle CSP ist die Bruchpilot-Expression in den mutanten Linien *Srpk79D<sup>VN</sup>* bzw. *Srpk79D<sup>P1</sup>*, verglichen mit dem Wildtyp, etwa gleich stark oder schwächer. Aufgetragen wurde jeweils das Homogenat von vier und zwei Larvengehirnen. Entwickelt wurde der Blot mit einem Antikörpergemisch aus MAK nc82 (1:100) gegen BRP und MAK ab49 (1:100) gegen CSP.

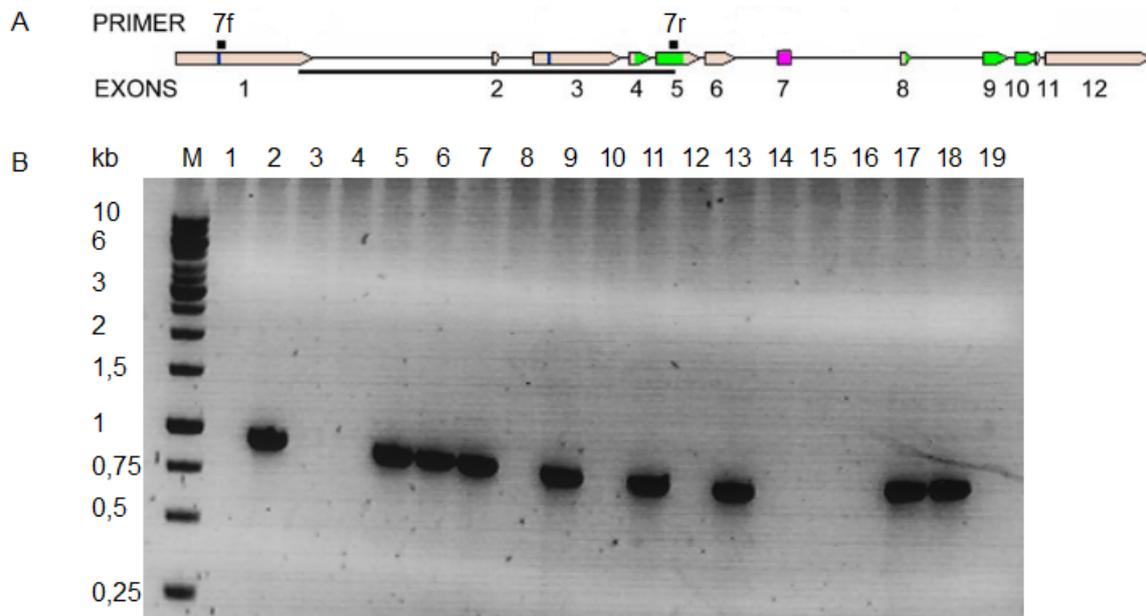
### 3.3 Mutation des *Srpk79D*-Gens als Ursache für die Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven

Alle *Srpk79D* Mutanten in unserer Arbeitsgruppe leiten sich von der P-Element-Insertion *Srpk79D<sup>P1</sup>* ab. Daher wäre es denkbar, dass eine unabhängige zweite Mutation in diesem Stamm für den BRP-Agglomerate-Phänotyp verantwortlich ist. Um zu zeigen, dass tatsächlich die Mutation des Gens für die SR Proteinkinase 79D der Grund für die Ausbildung der charakteristischen Bruchpilot-Punkten in larvalen Nerven ist, wurde die *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante nach dem in Abbildung 7 dargestellten Schema über sechs Generationen gegen den Wildtyp *CantonS<sup>45</sup>* (*CS<sup>45</sup>*) ausgekreuzt. Dazu wurden in einer Massenkreuzung zunächst weiß-äugige, für die Nullmutation homozygote Weibchen mit rot-äugigen, für das *Srpk79D*-Gen wildtypischen Männchen gekreuzt. In der F1-Generation entstehende, für das *Srpk79D*-Gen heterozygote Weibchen, die jetzt alle rote

Augen haben, wurden in Einzelkreuzungen wiederum mit wildtypischen  $CS^{45}$ -Männchen verpaart. Dieser Vorgang wurde insgesamt sechs mal wiederholt.

$$\begin{array}{c} \text{♀ } w; +; \frac{Srpk79DVN}{Srpk79DVN} \times +; +; + \text{ ♂} \\ \rightarrow F1: \text{♀ } \frac{w}{+}; +; \frac{Srpk79DVN}{+} \times +; +; + \text{ ♂ } \quad 6x \end{array}$$

**Abbildung 7: Schema der Rückkreuzung der  $Srpk79D^{VN}$  Nullmutante mit dem Wildtyp  $CS^{45}$ .** Rekombination führt zum Austausch des genetischen Hintergrundes in der Nullmutante.



Legende:

Spur 1:  $CS^{45}$ ; Spur 2:  $Srpk79D^{VN}$ ; Spur 3:  $Srpk79D^{REV}$ ; Spur 4:  $Srpk79D^{P1out}$ ;  
Spuren 5 bis 18: auf Heterozygotie zu testende ♀; Spur 19:  $H_2O$

**Abbildung 8: Untersuchung des Genotyps der rückgekreuzten Weibchen auf Heterozygotie des  $Srpk79D^{VN}$  Allels.**

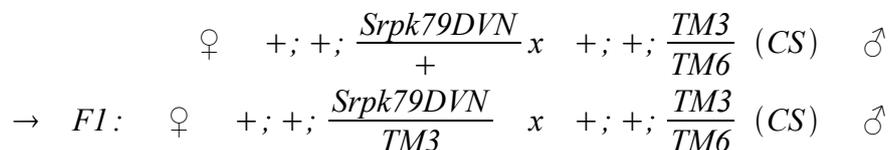
(A) Lage der Primer-Bindungsstellen auf der  $Srpk79D$ -Sequenz. (B) Bei Vorhandensein des  $Srpk79D^{VN}$  Allels entsteht ein ca. 900 bp großes PCR-Produkt wie bei der Positiv-Kontrolle in Spur 2. Spuren 1, 3, 4 und 19 sind Negativ-Kontrollen. Fliegen in Spuren 5 bis 7, 9, 11, 13, sowie 17 und 18 enthielten das Null-Allel. Die restlichen Fliegen waren homozygot wildtypisch für das  $Srpk79D$ -Gen.

Da bei der Kreuzung aus heterozygoten Weibchen mit  $CS^{45}$ -Männchen sowohl homozygot wildtypische, als auch heterozygote Weibchen, die ein wildtypisches und ein mutantes Allel für das

*Srpk79D*-Gen haben, entstehen, mussten die Weibchen nach der Eiablage auf ihren Genotyp hin untersucht werden. Dies geschah nach Extraktion der genomischen DNA mittels PCR unter Verwendung eines Primerpaares (siehe Abbildung 8A), welches bei den verwendeten PCR-Bedingungen (1min Elongation) nur bei Vorhandensein des Null-Allels ein PCR-Produkt hervorbringt, nicht jedoch für das wildtypische Allel, für dessen Amplifikation die Elongationszeit nicht ausreicht (z.B. Abbildung 8B).

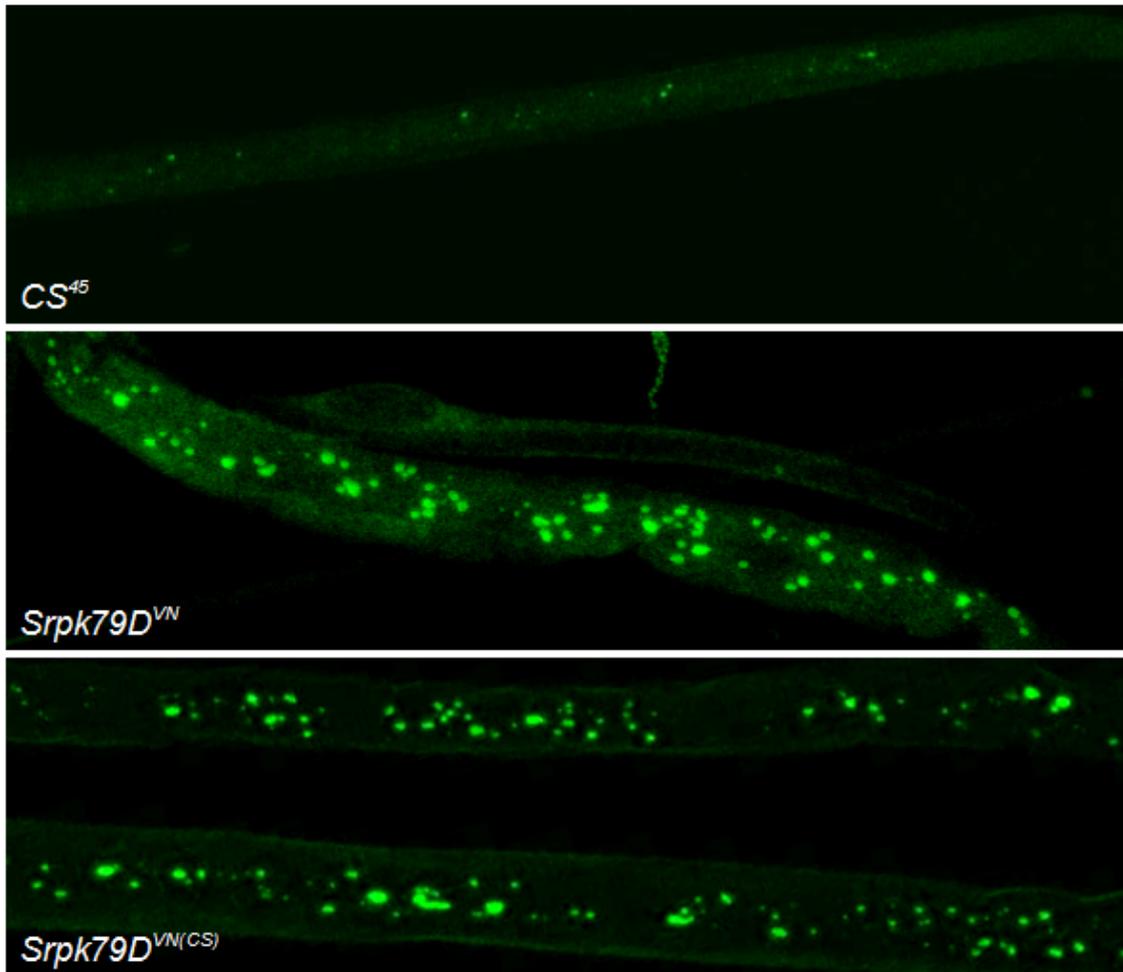
Für die 7. Generation wurden im nächsten Schritt Weibchen in Einzelkreuzungen mit Männchen des Doppel-Balancer-Stammes  $+/+; TM3/TM6^{CS}$  gepaart. Heterozygote Weibchen, die das *Srpk79D<sup>VN</sup>* Allel trugen, wurden, wie oben beschrieben, ebenfalls über PCR ermittelt.

Anschließend wurden aus dieser Kreuzung die Weibchen selektiert, die den Marker *stubble* exprimierten. Seit dieser Rückkreuzung gegen den Wildtyp *CS<sup>45</sup>* werden Fliegen mit dem *Srpk79D<sup>VN</sup>* Allel als balancierter, und damit in Bezug auf die Mutation heterozygoter Stock gehalten und in jeder neuen Generation wiederum mit *TM3/TM6<sup>CS</sup>* Männchen gekreuzt, was in Abbildung 9 schematisch zusammengefasst ist. Dadurch wird verhindert, dass es aufgrund der ursprünglich homozygot vorliegenden Nullmutation des *Srpk79D*-Gens zu Modifikation, also zur Veränderung des Phänotyps kommt.



**Abbildung 9: Die *Srpk79D<sup>VN</sup>* Mutation wird nach Cantonisierung als balancierter Stamm gehalten.** Das hat den Vorteil, dass es nicht zur Selektion von Allelen in sogenannten Modifier-Genen kommt, welche den Phänotyp der Mutation beeinflussen könnten.

In immuno-histochemischen Färbungen an 3<sup>rd</sup> instar Larven zeigte sich, dass auch die ausgekreuzten *Srpk79D<sup>VN(CS)</sup>* Tiere homozygot den Phänotyp der Bruchpilot-Punkte in larvalen Nerven aufweisen, wie Abbildung 10 belegt.

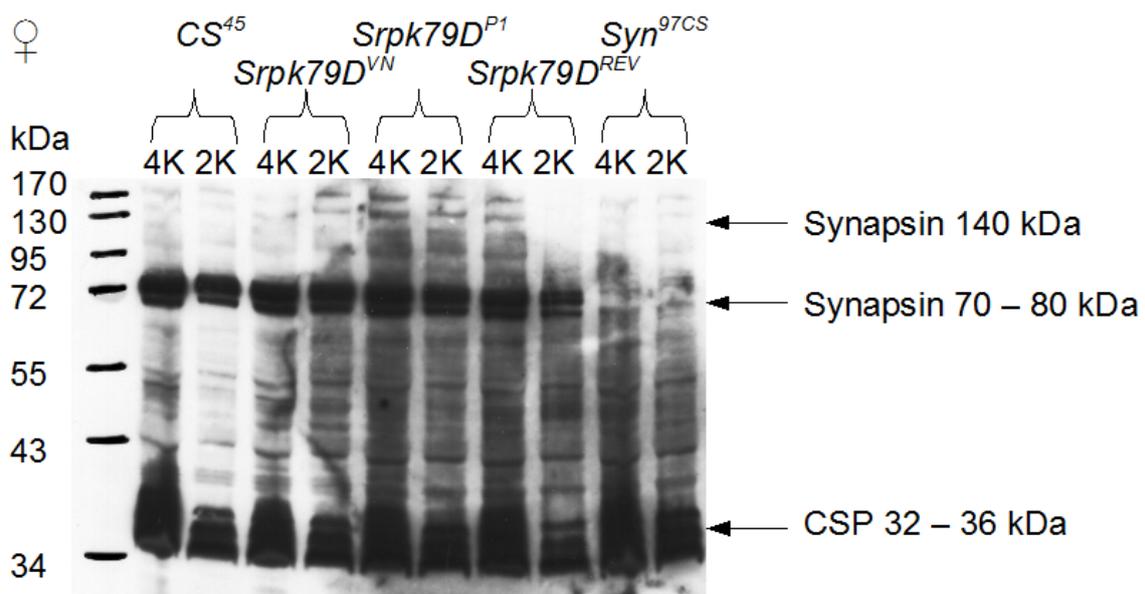


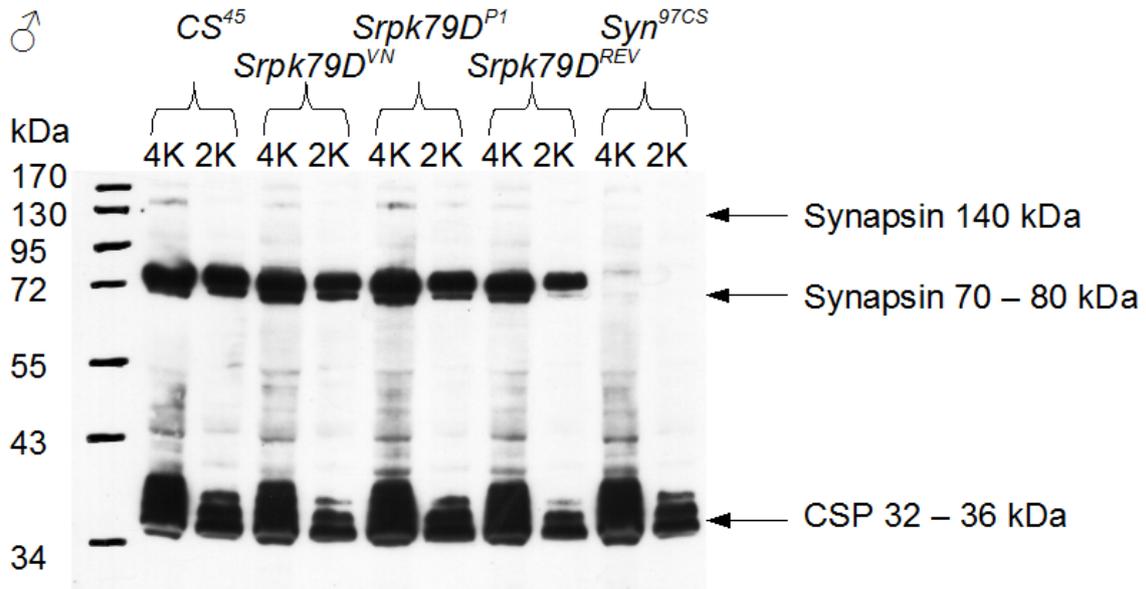
**Abbildung 10: Mutation des *Srpk79D*-Gens führt zur Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven.** Durch Rückkreuzung gegen den Wildtyp  $CS^{45}$  konnte bewiesen werden, dass die Mutation Ursache für diesen Phänotyp ist, der durch den genetischen Hintergrund nicht erkennbar verändert wird. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP.

Das Experiment lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Phänotyp der Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Mutation des *Srpk79D*-Gens resultiert, und keine Folge einer 'second site' Mutation ist.

### 3.4 Untersuchung der Expression und des Spleißmusters der synaptischen Proteine Synapsin, Sap47 und CSP in Fliegenlinien mit Mutation des *Srpk79D*-Gens

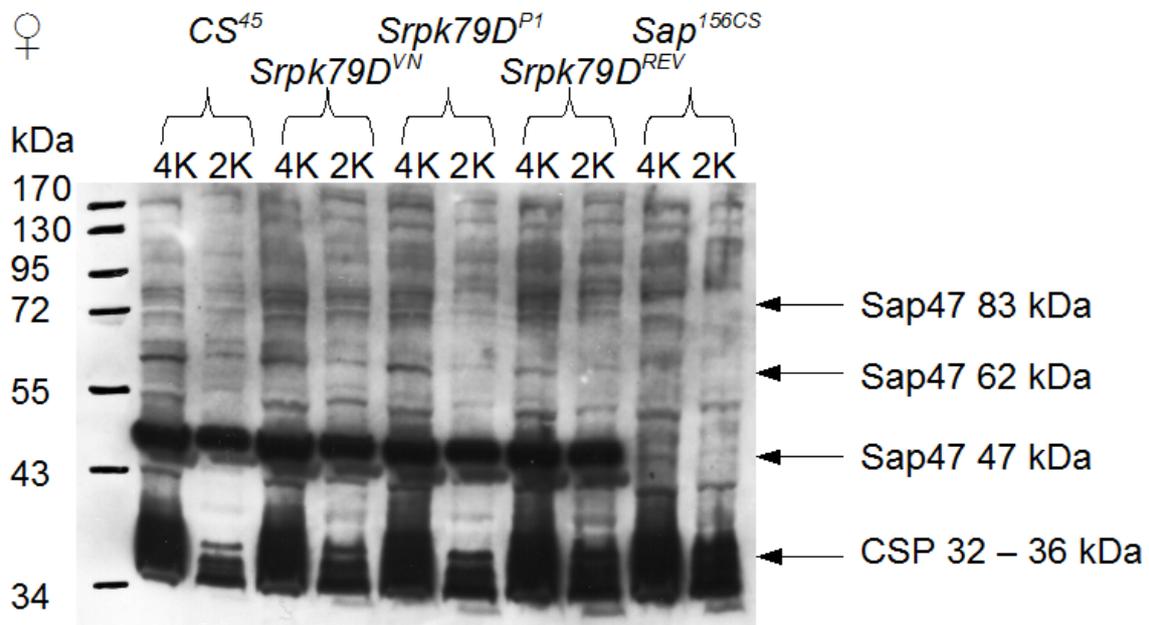
Da für Vertebraten bekannt ist, dass SRPKs alternatives Spleißen regulieren können, sollte überprüft werden, ob die Expressionsstärke und das Spleißmuster der synaptischen Proteine Synapsin, 'Synapse associated protein of 47 kDa' (Sap47) und 'Cystein String Protein' (CSP) in den mutanten Linien *Srpk79D<sup>VN(CS)</sup>* bzw. *Srpk79D<sup>P1out</sup>* im Vergleich zum Wildtyp verändert sind, das heißt, ob verschiedene Isoformen der genannten Proteine in unterschiedlichen Mengen vorliegen, oder ob bestimmte Isoformen möglicherweise ganz fehlen. Die entsprechenden Western Blot Analysen belegen, dass weder die P-Element-Insertion, noch die Deletion im *Srpk79D*-Gen sich auf das Vorhandensein und die Menge an bestimmten Isoformen der synaptischen Proteine Synapsin, Sap47 und CSP auswirken. Um einen geschlechtsspezifischen Effekt auszuschließen, wurden Weibchen und Männchen getrennt getestet. Wie Abbildung 11a des semiquantitativen Western Blots erkennen lässt, kommt es durch Mutation des *Srpk79D*-Gens zu keiner deutlichen Veränderung in der Expression des Synapsin- bzw. des CSP-Gens. Im Fall von Synapsin sind drei Banden zwischen 70 kDa und 80 kDa, sowie eine schwache Bande bei ca. 140 kDa (Klagges et al., 1996) zu sehen, und im Fall von CSP sind es vier Banden zwischen 32 kDa und 36 kDa (Eberle et al, 1998; Arnold et al., 2004).

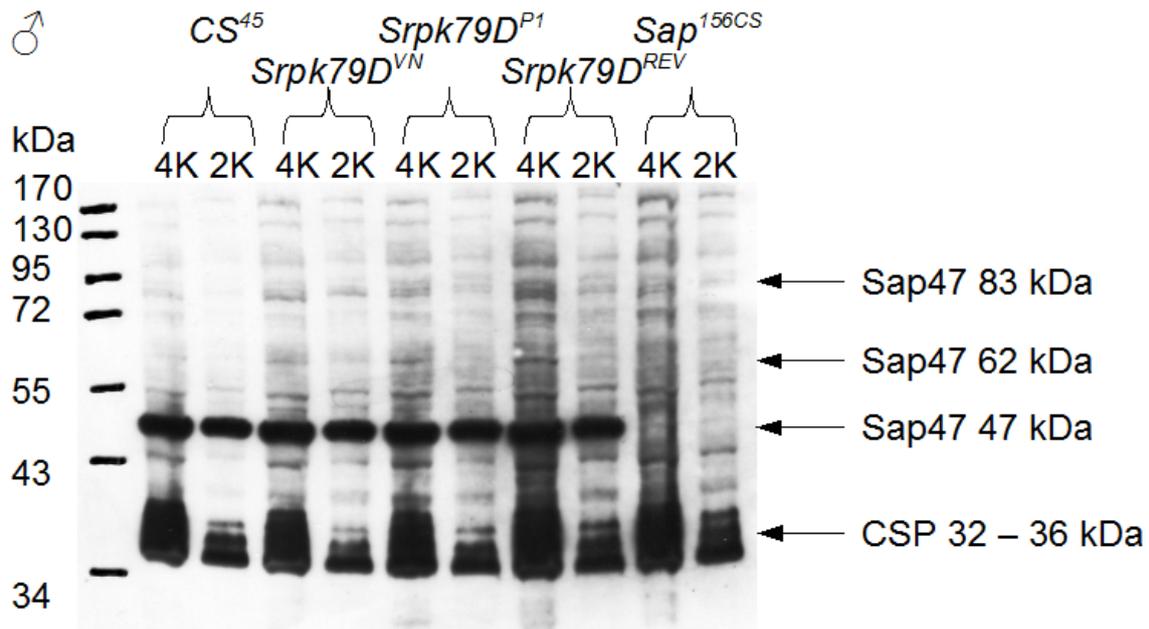




**Abbildung 11a: Mutation des *Srpk79D*-Gens hat keinen Einfluss auf die Expression der synaptischen Proteine Synapsin und CSP.** Es wurden jeweils vier und zwei Köpfe adulter Fliegen aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle für Synapsin wurde die Nullmutante *Syn*<sup>97CS</sup> verwendet. Die Synapsin-Bande bei 140 kDa ist nur schwach zu erkennen. Entwickelt wurden die Blots mit einem Antikörpergemisch aus MAK 3C11 (1:50) gegen Synapsin und MAK ab49 (1:100) gegen CSP.

Auch für das Sap47-Protein gibt es im semiquantitativen Western Blot keinen Anhaltspunkt auf eine Reduktion oder Überexpression bei Mutation des *Srpk79D*-Gens, wie in Abbildung 11b zu erkennen ist. Die Bande bei 47 kDa ist in allen untersuchten Genotypen vergleichbar stark, und auch für die großen Isoformen (Funk et al., 2004) lässt sich keine deutlicher Unterschied ausmachen.





**Abbildung 11b: Mutation des *Srpk79D*-Gens hat keinen Einfluss auf die Expression der synaptischen Proteine Sap47 und CSP.** Es wurden wiederum jeweils vier und zwei Köpfe adulter Fliegen geladen. Die Nullmutante *Sap*<sup>156CS</sup> diente als Negativ-Kontrolle für Sap47. Die Sap47-Banden bei 62 kDa beziehungsweise 83 kDa sind nur schwach zu erkennen. Entwickelt wurden die Blots mit einem Antikörpermischung aus MAK nc46 (1:100) gegen Sap47 und MAK ab49 (1:100) gegen CSP.

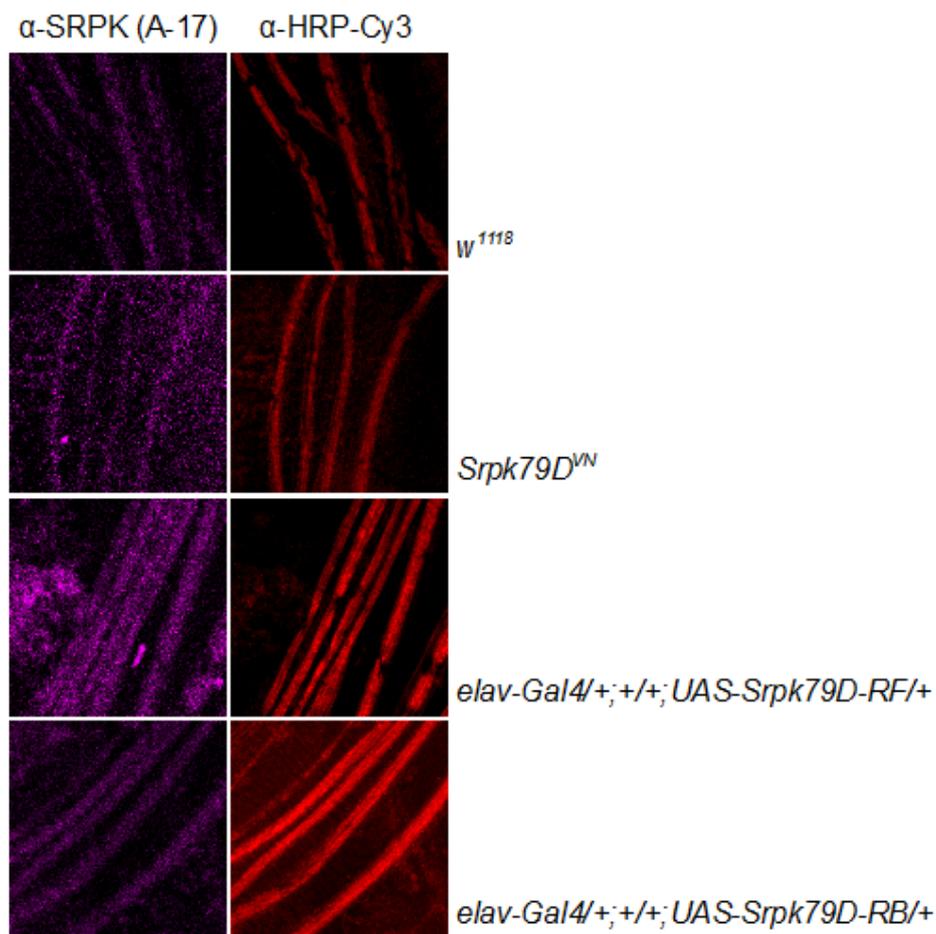
### 3.5 Experimente mit dem Antikörper $\alpha$ -SRPK (A-17)

Die großen Isoformen PC und PF, sowie die kleine Isoform PB der SR Proteinkinase 79D sind in larvalen Präparaten nur bei Überexpression der entsprechenden cDNA unter Verwendung des Gal4/UAS-Systems, und in Western Blots wildtypischer Fliegenköpfe nur nach Immunopräzipitation (IP) detektierbar (Nieratschker et al., 2009). Für die IP wurden Antikörper verwendet, welche spezifisch die nicht überlappenden N-terminalen Bereiche der entsprechenden Isoformen erkennen. Im Falle von SRPK79D-PC/PF wird die Erkennungssequenz für den G-Antikörper (anti-PC) vom ersten Exon des Gens kodiert, und im Falle von SRPK79D-PB/PE wird das Epitop für den K-Antikörper (anti-PB) vom dritten Exon des *Srpk79D*-Gens kodiert. Von V. Nieratschker und A. Schubert durchgeführte Färbungen mit dem G-Antikörper, sowie einem anti-GFP-Antikörper zeigten, dass überexprimiertes SRPK79D-PC-EGFP sowohl mit Bruchpilot an präsynaptischen Aktiven Zonen kolokalisiert, als auch homogen im Perikaryon verteilt vorliegt, während überexprimiertes SRPK79D-PB-EGFP in bestimmten Regionen im Perikaryon zu finden ist und nicht zu den Aktiven Zonen transportiert wird (Nieratschker et al., 2009).

Wünschenswert wäre jedoch einerseits die Bestimmung des Expressionsmusters der endogenen SRPK79D-Isoformen und nicht der ektopisch exprimierten Proteine in Larvenpräparationen, und andererseits der Nachweis der endogenen Proteinkinase in Western Blots. Dazu wurden Versuche mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -SRPK (A-17) durchgeführt, der gegen ein Peptid in einer konservierten internen Region der SRPK1 menschlichen Ursprungs gerichtet ist.

### 3.5.1 Immuno-Histochemie an Larven

Larven im dritten Larvenstadium von Wildtyp und *Srpk79D* Nullmutante, sowie Larven, welche entweder die PF-, oder die PB-Isoform ohne GFP-Tag unter Verwendung des *elav-Gal4*-Treibers überexprimierten, wurden präpariert und mit den Antikörpern  $\alpha$ -SRPK (A-17) und  $\alpha$ -HRP-Cy3 gefärbt.



**Abbildung 12: Antikörper-Färbung larvaler Nerven mit  $\alpha$ -SRPK (A-17) (1:50).** Im Vergleich zur *Srpk79D<sup>ΔN</sup>* Nullmutante war weder im Wildtyp, noch in den Linien, welche entweder die PF- oder PB-Isoform überexprimierten, ein spezifisches Signal zu sehen. Als Kontrolle wurde die neuronale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe mit  $\alpha$ -HRP-Cy3 gefärbt.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, ergab die Färbung in larvalen Nerven keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp  $w^{1118}$  und der Nullmutante für die SRPK79D. Weiterhin war die überexprimierte SRPK79D-PF-Isoform bei Färbung mit dem  $\alpha$ -SRPK (A-17)-Antikörper weder an den Aktiven Zonen, noch im Cytoplasma der Neurone zu finden (nicht gezeigt). Die überexprimierte SRPK79D-PB-Isoform war mit diesem Antikörper ebenfalls nicht im Perikaryon detektierbar (auch nicht gezeigt). In Larven-Filetpräparationen konnte also keine spezifische Färbung der SRPK79D mit dem Antikörper  $\alpha$ -SRPK (A-17) erzielt werden, sodass offenbar das A-17 Antiserum in immuno-histochemischen Färbungen nicht mit der *Drosophila* SRPK79D kreuzreagiert.

### 3.5.2 Western Blot Analysen

Im nächsten Schritt sollte die endogene SRPK79D in Western Blots unter Verwendung des Antikörpers  $\alpha$ -SRPK (A-17) nachgewiesen werden. Dazu wurden Köpfe und Körper adulter Fliegen getrennt untersucht. Wie sich herausstellte, erkennt der  $\alpha$ -SRPK (A-17)-Antikörper ein unbekanntes Protein mit einem Molekulargewicht von rund 43 kDa (nicht gezeigt), nicht jedoch die Isoformen der SR Proteinkinase 79D, deren Molekulargewichte bei 85 kDa für PC bzw. 80 kDa für PB im Wildtyp liegen. Für die mittels Treiber *elav-Gal4* überexprimierten Fusionsproteine der Isoformen PC bzw. PB und EGFP liegen die erwarteten Größen bei 110 kDa bzw. 105 kDa.

Abschließend lässt sich sagen, dass der Antikörper  $\alpha$ -SRPK (A-17) weder in der Immuno-Histochemie, noch in Western Blots zur Detektion der endogen exprimierten SRPK79D oder einzeln überexprimierter Isoformen der SRPK79D in der Lage ist.

### 3.6 Re-Etablierung einer homozygoten Fliegenlinie $w^1;UAS-Srpk79D-RBeGFP;Srpk79D^{VN}$ für Rescue-Experimente

Um Rescue-Versuche durchführen zu können, müssen sich sowohl Treiber- (Gal4) als auch Effektor-Linie (UAS) im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund befinden. Erst dann ist es möglich, zu beurteilen, ob die Expression einer einzelnen Isoform der SRPK79D, in diesem Fall der mit EGFP gekoppelten PB-Isoform, ausreichend ist, um den Phänotyp der Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Nerven zu retten.

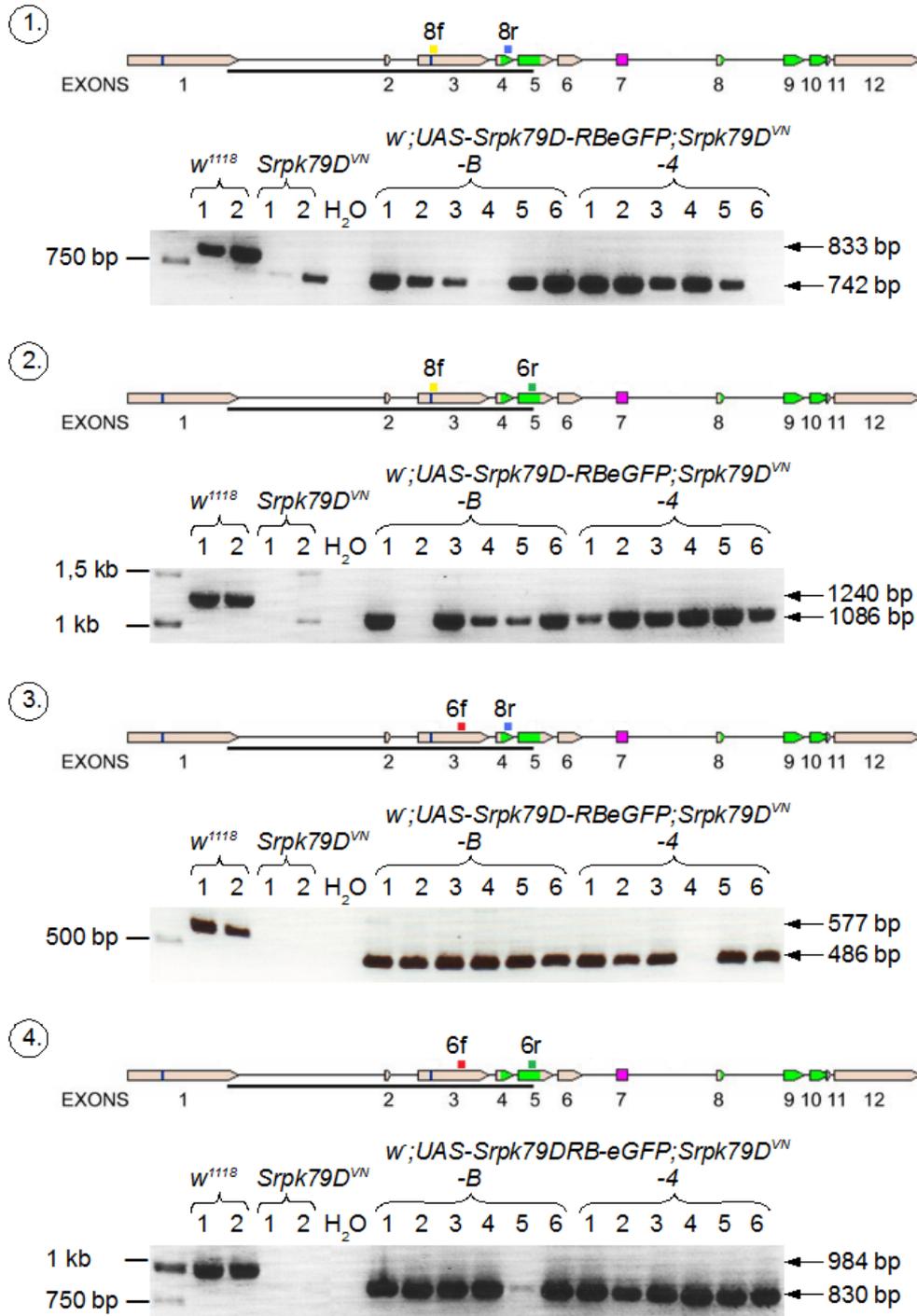
Es stellte sich heraus, dass die von V. Nieratschker generierte Fliegenlinie  $w^1;UAS-Srpk79D-$

*RBeGFP;Srpk79D<sup>ΔN</sup>* mit dem *Srpk79D* Wildtyp-Allel kontaminiert war. Somit war nicht mehr klar, ob die durch *elav-Gal4* getriebene Expression der *Srpk79D-PBeGFP*-cDNA zum Rescue der Bruchpilot-Anhäufung in larvalen Nerven führt, da bereits das Vorhandensein einer wildtypischen *Srpk79D*-Genkopie im genetischen Hintergrund ausreicht, damit es nicht zur Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten kommt.

### 3.6.1 Einzelkreuzungen und Ermittlung des Genotyps mittels PCR (mit A. Schubert)

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die neuronale Expression nur der SRPK79D-PB-EGFP-Isoform zur Aufhebung des charakteristischen Phänotyps der Bruchpilot-Aggregation in larvalen Nerven führt, musste zunächst aus der Effektor-Linie mit dem Transgen *w<sup>1118</sup>;UAS-Srpk79D-RBeGFP;Srpk79D<sup>ΔN</sup>* die Kontamination entfernt werden, sodass alle Tiere im homozygoten *Srpk79D<sup>ΔN</sup>* Null-Hintergrund vorliegen. Dazu wurden Weibchen und Männchen der ursprünglichen Linie in Einzelkreuzungen miteinander verpaart. Nach der Eiablage wurde die genomische DNA der Elterntiere gewonnen und in zwei PCR-Reaktionen überprüft. Zunächst wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit dem Primerpaar 7f/7r (P487sense/6PPanti) (vergleiche Abbildung 8) durchgeführt. Entstand dabei das für die Deletion erwartete PCR-Produkt von 916 bp, wurde in einer zweiten PCR mit Primern, welche im ersten Intron ihre Bindungsstellen haben, ermittelt, ob das *Srpk79D*-Gen im genetischen Hintergrund als homozygote Deletionsmutation vorliegt. Das bedeutet, dass die oben erwähnten Einzelkreuzungen verworfen wurden, wenn in beiden PCR-Reaktionen eine Bande auftrat, denn in diesem Fall war in den Elterntieren ein mutantes und ein wildtypisches Allel für das *Srpk79D*-Gen vorhanden. Bei zwei der Einzelkreuzungen war die erste PCR positiv und die zweite PCR negativ, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Elterntiere aus diesen Kreuzungen die homozygote *Srpk79D<sup>ΔN</sup>* Nullmutation trugen. Um das zu verifizieren, wurden nach etwa zwei Generationen jeweils sechs Nachkommen aus den Linien B und 4 getestet. Dazu wurde wiederum die genomische DNA isoliert und in vier unabhängigen PCRs auf den Genotyp hin untersucht. Die PCR war so konzipiert, dass durch die Wahl der Primer eine Unterscheidung zwischen genomischem *Srpk79D*-Gen und Transgen möglich war. Die Bindungsstellen des jeweiligen 'sense'- und 'anti'-Primers lagen dabei in unterschiedlichen Exons, sodass bei Amplifikation genomischer DNA ein größeres PCR-Produkt entstehen müsste, da die Introns ebenfalls amplifiziert würden, während vom Transgen ein kleineres PCR-Produkt entsteht, da es sich hier um cDNA handelt, die keine Introns mehr enthält. Damit ist eine eindeutige Differenzierung zwischen gDNA und cDNA möglich. Es wurden zwei 'sense'-Primer mit unterschiedlichen Bindungsstellen im dritten Exon und zwei 'anti'-Primer mit Bindungsstellen im

vierten bzw. fünften Exon miteinander kombiniert, sodass schlussendlich vier verschiedene PCRs durchgeführt wurden, wie die Grafiken in Abbildung 13 illustrieren.

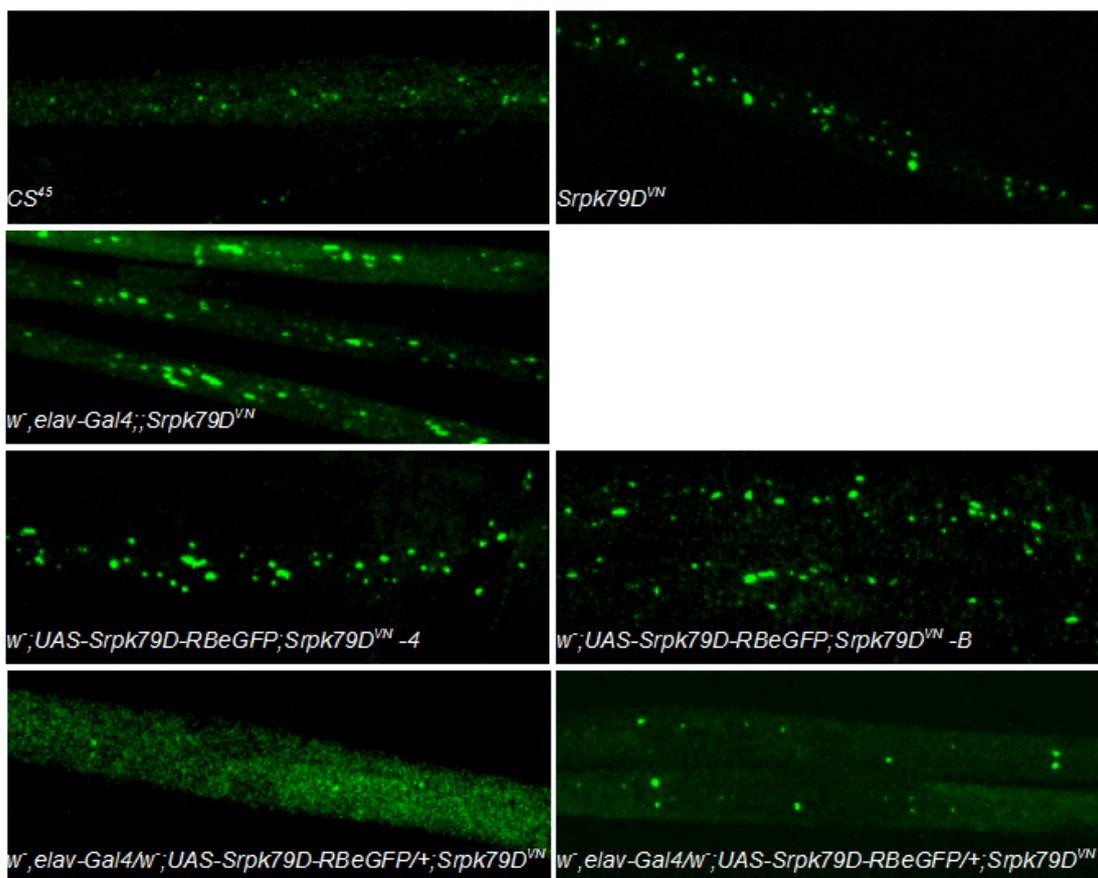


**Abbildung 13: PCR zur Feststellung des Genotyps der transgenen Fliegenlinien B und 4 in Bezug auf das *Srpk79D*-Gen.** Der Farbcode gibt die Lage der Bindungsstellen eingesetzter Primer in der jeweiligen PCR wieder. Die getesteten Nachkommen zeigen in den vier PCRs jeweils nur das für das Transgen erwartete kleinere PCR-Produkt und tragen somit homozygot die *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutation im genetischen Hintergrund.

Weiterhin kann man aus Abbildung 13 ableiten, dass die Nachkommen aus den Linien B und 4 in Hinsicht auf das endogene *Srpk79D*-Gen homozygote Null-Mutanten sind, denn alle PCR-Amplifikate haben nur die für das Transgen erwartete Größe. Damit war eine *w;UAS-Srpk79D-RBeGFP;Srpk79D<sup>VN</sup>*-Linie regeneriert.

### 3.6.2 Rescue-Versuche durch Expression der SRPK79D-PB-EGFP-Isoform

Als sichergestellt war, dass wieder ein transgener Stamm mit der cDNA für die SRPK79D-PB-EGFP-Isoform, der bezüglich des endogenen *Srpk79D*-Gens eine homozygote Nullmutante ist, für Rescue-Experimente zur Verfügung stand, wurden diese Versuche durch Kreuzung mit der Treiber-Linie *w,elav-Gal4;;Srpk79D<sup>VN</sup>*, welche sich ebenfalls im homozygoten *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund befindet, wiederholt.



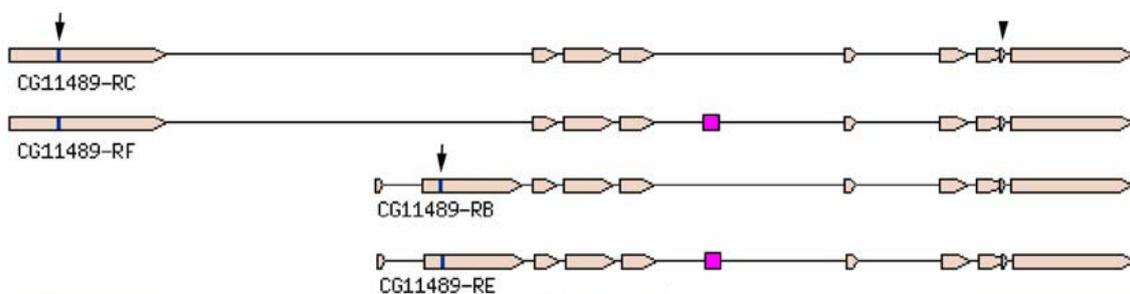
**Abbildung 14: Pan-neuronale Expression der SRPK79D-PB-EGFP-Isoform im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Hintergrund rettet den Phänotyp der Bruchpilot-Agglomerate in den neuronalen Axonen von Larven. Die Dichte verbleibender Bruchpilot-Akkumulationen in den Rescue-Linien ist drastisch reduziert. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP.**

Das Ergebnis ist der Abbildung 14 zu entnehmen. Die Parentallinien im Nullmutanten-Hintergrund zeigen den Phänotyp der *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutante, nämlich die Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven, wohingegen in den Axonen der Rescue-Larven dieser Phänotyp durch die Expression der SRPK79D-PB-EGFP-Isoform weitestgehend aufgehoben wird. Vereinzelt sind noch Bruchpilot-Ansammlungen zu finden, die im Vergleich zu den in den Ausgangslinien und der *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutante beobachteten Bruchpilot-Akkumulationen jedoch viel kleiner sind und in geringerer Dichte vorliegen.

### 3.7 Klonierung der *UAS-Srpk79D-REeGFP-cDNA*

#### 3.7.1 Restriktionsverdau und Re-Ligation

Wie bereits beschrieben, entstehen durch alternativen Transkriptionsstart, sowie alternatives Spleißen vier verschiedenartige Transkripte und infolgedessen auch Protein-Isoformen vom *Srpk79D*-Gen, wie Abbildung 15 noch einmal veranschaulicht.

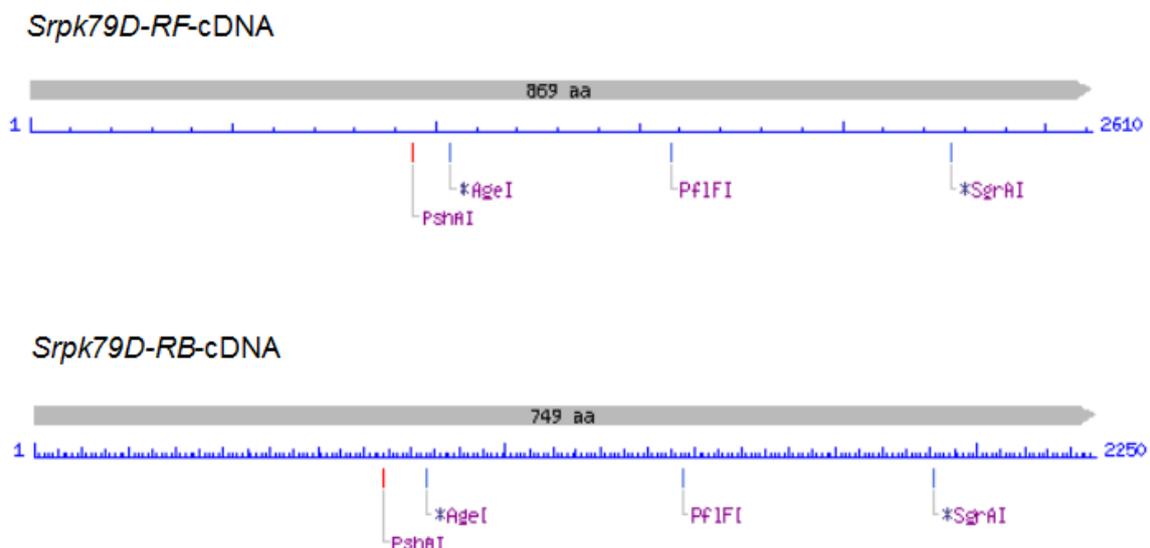


**Abbildung 15: Struktur der *Srpk79D*-mRNAs.** Alternative Transkriptionsstartpunkte in Exon 1 bzw. 3 und alternatives Spleißen von Exon 7 führen zur Entstehung von vier Transkripten.

Zur Herstellung transgener Fliegenlinien für Überexpressionsstudien oder Rescue-Experimente ist es erforderlich, die cDNA für das gewünschte Protein in den *pUAST*-Vektor zu klonieren. Drei der vier cDNAs waren zu diesem Zweck bereits von V. Nieratschker in den *pUAST*-Vektor kloniert worden, nämlich die *Srpk79D-eGFPRF*-, sowie die *Srpk79D-RCeGFP*- und *-RBeGFP*-cDNAs. Gleichzeitig war die cDNA für das 'Enhanced Green Fluorescent Protein' (EGFP) in den Vektor eingefügt worden, sodass bei Expression in der Fliege ein Fusionsprotein aus entsprechender SRPK79D-Isoform und EGFP entsteht. Die cDNA für die noch fehlende SRPK79D-PE-Isoform

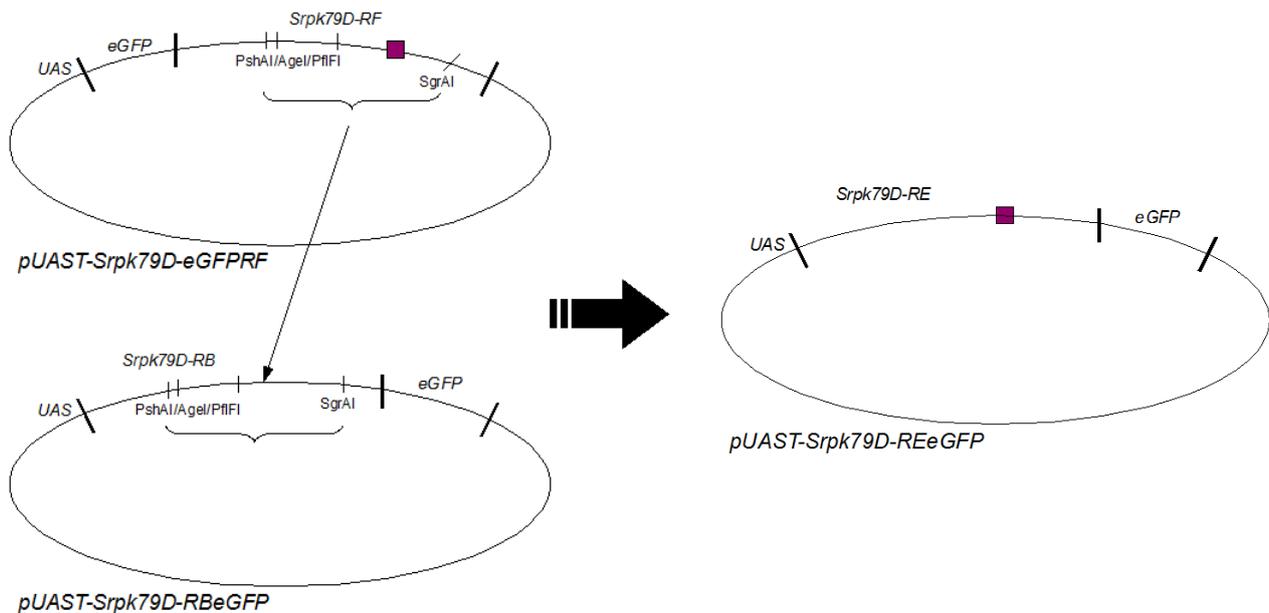
sollte ebenfalls in den *pUAST*-Vektor integriert werden, um nach Einbringen des Konstrukts in das Fliegen-genom eine transgene Fliegenlinie zu schaffen und durch Kreuzen mit der Treiber-Linie *w,elav-Gal4;;* die pan-neuronale Expression der *UAS-Srpk79D-REeGFP*-cDNA anzuschalten. Durch Überexpression von SRPK79D-PE-EGFP im wildtypischen Hintergrund sollte zum einen die sub-zelluläre Lokalisation dieser Isoform erforscht werden, wie es bereits für die anderen SRPK79D-Isoformen verwirklicht wurde. Zum anderen wäre es interessant, zu erfahren, ob die Expression der SRPK79D-PE-Isoform ausreichend wäre, um den Phänotyp der Bruchpilot-Agglomerate in larvalen Nerven zu retten, wie es schon für die übrigen SRPK79D-Isoformen getestet wurde (Nieratschker, 2008; Nieratschker et al., 2009).

Ausgangspunkt der Klonierung waren die die *UAS-Srpk79D-eGFPRF*- und *-RBeGFP*-cDNAs enthaltenden Vektoren. Aus der *UAS-Srpk79D-eGFPRF*-cDNA sollte der Bereich mit dem alternativ gespleißten Exon 7 durch Restriktionsverdau ausgeschnitten, und dieses Fragment in den mit denselben Restriktionsenzymen behandelten *UAS-Srpk79D-RBeGFP*-Vektor eingefügt werden. Ausgewählt wurden Restriktionsenzyme, die nur eine einzige Schnittstelle innerhalb der gesamten cDNA und gar keine in der *pUAST*-Vektorsequenz und der *eGFP*-Sequenz haben. Da beide cDNAs abweichende 5'-Sequenzen besitzen und erst ab dem vierten Exon die gleiche Sequenz haben (siehe Abbildung 15), wurden drei Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenzen 5' vom alternativen Exon in den Exons 4 (PshAI, AgeI) und 6 (PflFI) mit dem Restriktionsenzym SgrAI kombiniert, dessen Erkennungssequenz 3' vom alternativen Exon im neunten Exon liegt (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Single cutter Restriktionsprofil der *Srpk79D-RF*- und *-RB*-cDNA. Laut NEBcutter haben die Restriktionsenzyme PshAI, AgeI, PflFI und SgrAI nur eine einzige Schnittstelle innerhalb der RF- (oben) bzw. RB-cDNA (unten).

Die Plasmide mit der *Srpk79D-RF*- bzw. *-RB*-cDNA wurden in Doppelverdau-Ansätzen mit einem der drei Enzyme PshAI, AgeI oder PflFI und dem Enzym SgrAI inkubiert. Die entsprechenden Vektor- und Insert-Banden wurden aus einem Agarosegel eluiert und sollten in anschließenden Ligationen zusammengefügt werden, was Abbildung 17 schematisch verdeutlicht.



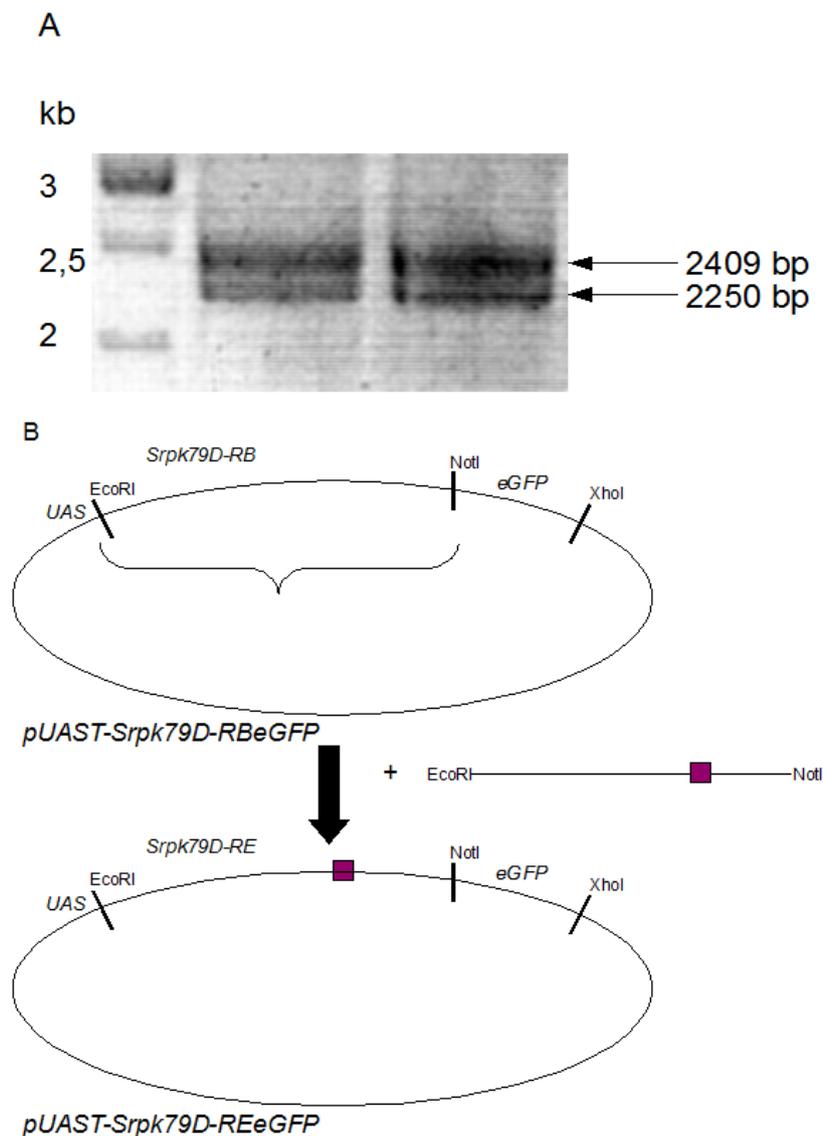
**Abbildung 17: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie eines *pUAST-Srpk79D-REeGFP*-Vektors.** Die Teilsequenz mit dem alternativen Exon 7 sollte durch Restriktionsverdau aus dem *pUAST-Srpk79D-eGFPRF*-Vektor entfernt und in den ebenso verdauten *pUAST-Srpk79D-RBeGFP*-Vektor re-ligiert werden.

Für alle drei Kombinationen der Restriktionsenzyme führte diese Vorgehensweise allerdings nicht zum Erfolg, sodass eine andere Strategie versucht werden musste.

### 3.7.2 Reverse Transkription plus Linker-PCR

Eine andere Möglichkeit zur Erzeugung eines Transformationsvektors mit der *Srpk79D-REeGFP*-cDNA bestand darin, zunächst die totale RNA aus adulten Fliegen zu isolieren und mit Hilfe der Reversen Transkriptase unter Verwendung des oligodT-Primers in cDNA umzuschreiben. Durch die anschließende PCR mit den Linker-Primern GFPcEcosense und GFPcNotanti, die schon zur Klonierung der *Srpk79D-RB*- und *-RC*-cDNAs von V. Nieratschker verwendet worden waren, wurde 5' eine EcoRI- und 3' eine NotI-Schnittstelle an die cDNA angefügt. Bei dieser PCR wurden sowohl die *Srpk79D-RE*-cDNA mit einer Größe von 2409 bp, als auch die 2250 bp große *-RB*-cDNA gebildet, wie Abbildung 18A wiedergibt. Im weiteren Verlauf wurde die *Srpk79D-RE*-cDNA

(obere Bande) aus dem Gel aufgereinigt und, ebenso wie der *pUAST-Srpk79D-RBeGFP*-Vektor, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI inkubiert. Nach diesem Doppelverdau sollten Insert und linearisierter Vektor durch die Ligase verknüpft werden, was schematisch noch einmal in Abbildung 18B zusammengefasst ist.



**Abbildung 18: Weitere Strategie zur Erzeugung eines *pUAST-Srpk79D-REeGFP*-Transformationsvektors.** (A) Durch Reverse Transkription und Linker-PCR wurden die *Srpk79D-RE*- und die *-RB*-cDNA amplifiziert. (B) Schema der weiteren Vorgehensweise: Ausgangsvektor und Insert wurden mit EcoRI und NotI doppelverdaut und sollten danach ligiert werden.

Auch mit dieser Herangehensweise gelang es nicht, den gewünschten Vektor zu schaffen, sodass eine dritte Methode ausprobiert wurde.

### 3.7.3 MultiSite Gateway® Cloning

Diese Art der Klonierung basiert auf dem ortsspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda zur Integration des Phagengenoms in das *E. coli*-Chromosom. Die konservative Rekombination zwischen Phagen- und *E. coli*-DNA findet an spezifischen Rekombinationssequenzen, sogenannten 'attachment sites', statt. Nach erfolgter Rekombination liegen diese 'att sites' als Hybridsequenzen vor und umfassen Sequenzen beider elterlicher Vektoren. Durch das Multisite Gateway® Cloning ist es möglich, gleichzeitig mehrere DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren. So sollten die cDNAs für die SRPK-PE-Isoform und das EGFP in einen UAS-Vektor kloniert werden. Doch zunächst mussten die einzelnen Entry-Klone für die 2-Fragment-Rekombination hergestellt werden.

#### 3.7.3.1 Erzeugung eines Entry-Klons für die *Srpk79D-RE-cDNA*

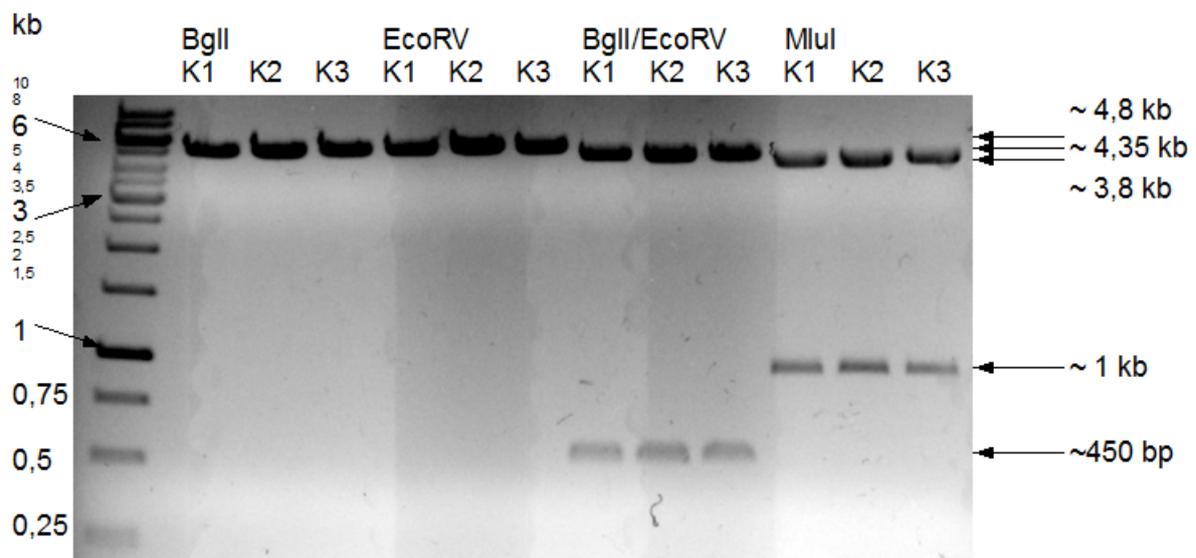
Zur Gewinnung der *Srpk79D-RE-cDNA* wurde wiederum die totale RNA aus Fliegen isoliert und durch die Reverse Transkriptase unter Verwendung des oligodT-Primers in cDNA umgeschrieben. Die anschließende PCR mit den Primern *attB1-Srpk79D* und *attB5r-EGFP* fügte 5' eine *attB1*- und 3' eine *attB5r*-attachment site an die cDNA an. Gleichzeitig wurde dabei das Ochre-Stop-Kodon UAA der *Srpk79D-cDNA* in das Kodon GGA für die Aminosäure Glycin umgewandelt, um bei Expression des Proteins ein Durchlesen in die dahinter gelegene *eGFP-cDNA* zu ermöglichen, und so eine EGFP-getagte SRPK79D-PE-Isoform zu erhalten. Bei dieser PCR entstanden erneut sowohl die *Srpk79D-RE-cDNA*, als auch die *-RB-cDNA*. Nachfolgend wurde das PCR-Produkt direkt aufgereinigt, um die Primer zu entfernen, die während der BP Rekombination mit der cDNA konkurrieren würden. Im Anschluss daran wurde die Rekombination der cDNA in den Donor-Vektor *pDONR<sup>TM</sup>221 P1-P5r* unter Verwendung der BP Clonase<sup>TM</sup> angesetzt.

Die Rekombinationsreaktion wurde in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert, und positive Klone auf Kanamycin-haltigen LB-Platten selektiert. Von drei Klonen wurden Mini-Kulturen angelegt, und die Plasmid-DNA nach Aufreinigung in vier verschiedenen Ansätzen mit Restriktionsenzymen getestet.

Die Donor-Vektoren haben eine Größe von ca. 4,8 kb. Bei erfolgreicher BP Rekombination verlieren sie die Gateway®-Kassette. Der verbleibende Teil des Vektors hat eine Größe von ca. 2,4 kb. An die Stelle der Gateway®-Kassette tritt die gewünschte cDNA.

Abbildung 19 zeigt das Ergebnis des Restriktionsverdaus der drei überprüften Klone für die *Srpk79D-RE(/RB)-cDNA*. Das Restriktionsenzym BglI schneidet nur in der *Srpk79D-RE(/RB)-*

cDNA einmal, sodass bei diesem Verdau der Vektor linearisiert wurde. Er weist die richtige Größe von ca. 4,8 kb auf, die sich zusammensetzt aus 2,4 kb Vektorsequenz plus 2409 bp oder 2250 bp Insertsequenz, je nachdem, ob die *Srpk79D-RE*- oder die *-RB*-cDNA inseriert wurde. Das Restriktionsenzym *EcoRV* hingegen hat nur eine einzige Erkennungssequenz im *pDONR<sup>TM</sup>221 P1-P5r* Vektor, sodass bei diesem Verdau der Vektor ebenfalls linearisiert wurde. Die Größe von ca. 4,8 kb stimmt auch hier. Der *BglII/EcoRV*-Doppelverdau diente dazu, die Orientierung des Inserts zu bestimmen. Bei richtiger Orientierung entsteht, wie unten zu sehen ist, ein Fragment von ca. 450 bp. Für das Restriktionsenzym *MluI* gibt es zwei Schnittstellen im Vektor, sodass ein etwa 1 kb großes Fragment aus diesem herausgeschnitten wird.



**Abbildung 19: Überprüfung der Klone mit Entry-Vektor auf Insertion der *Srpk79D-RE*/*(RB)*-cDNA.** Restriktionsverdaus zeigten die richtige Größe und Orientierung des Inserts für alle drei Klone K1, K2 und K3 an.

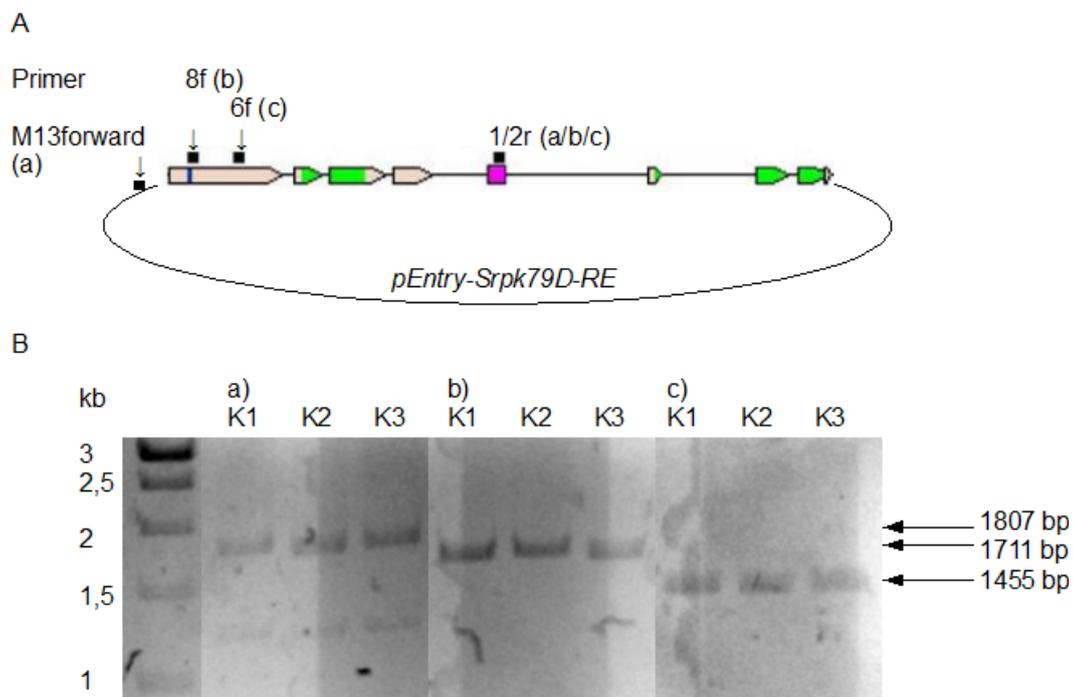
Anhand der Restriktionsverdaus war noch nicht eindeutig festzustellen, ob die gewünschte *Srpk79D-RE*- mit oder die *-RB*-cDNA ohne alternatives Exon von 159 bp im Entry-Vektor vorlag. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde eine PCR auf der Plasmid-DNA durchgeführt. In drei verschiedenen PCR-Ansätzen wurden die 'sense'-Primer M13forward (bindet im Vektor), 8f (*Srpk79D*-Ex3forward) und 6f (*Srpk79D*-Ex3newforward) (binden beide im dritten Exon des *Srpk79D*-Gens) jeweils mit dem 'anti'-Primer 1/2r (ExtraExonanti) kombiniert (siehe Abbildung 20A), sodass nur dann überhaupt ein PCR-Produkt entstehen kann, wenn das alternative Exon Bestandteil der cDNA ist, wie im Falle von *Srpk79D-RE*, und kein PCR-Produkt zu sehen sein kann, wenn die Bindungsstelle für den Primer nicht vorhanden ist, wie es für die

*Srpk79D-RB*-cDNA der Fall ist.

Die zu erwartenden PCR-Produkte haben folgende Größen:

- a) M13forward / 1/2r → 1807 bp
- b) 8f / 1/2r → 1711 bp
- c) 6f / 1/2r → 1455 bp

Wie man anhand der Abbildung 20B erkennen kann, entstand in allen drei PCRs für die drei getesteten Klone ein Produkt der jeweils richtigen Größe, sodass davon auszugehen ist, dass alle Klone den Entry-Vektor mit der *Srpk79D-RE*-cDNA enthalten.

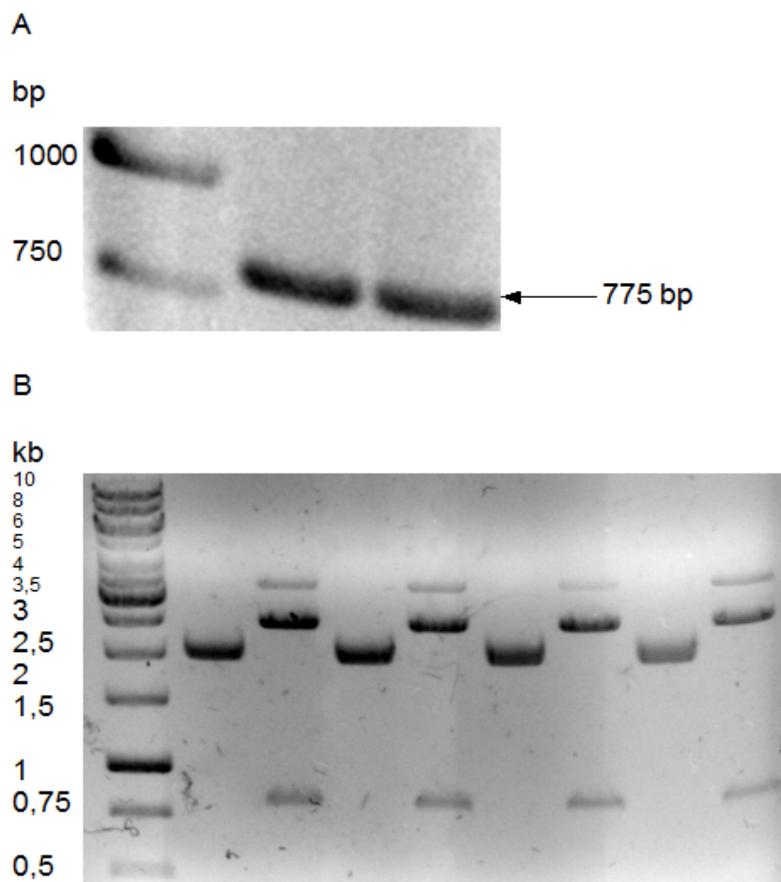


**Abbildung 20: PCR zur Überprüfung der pEntry-Vektoren der Klone K1 bis K3.** (A) Lage der Primer-Bindungsstellen im Vektor und der *Srpk79D-RE*-Sequenz. (B) Durch Verwendung eines für das alternative Exon spezifischen 'anti'-Primers entstand nur bei Vorhandenseins des Exon 7 ein PCR-Produkt.

### 3.7.3.2 Schaffung eines Entry-Klons für die *eGFP*-cDNA

Die Amplifikation der *eGFP*-cDNA erfolgte über PCR mit den Primern *attB5-Srpk79D* und *attB2-EGFP*, die 5' eine *attB5*- und 3' eine *attB2*-attachment site an die cDNA anfügen, aus dem bereits vorhandenen Vektor *pUAST-Srpk79D-RBeGFP* von V. Nieratschker. Das PCR-Produkt aus

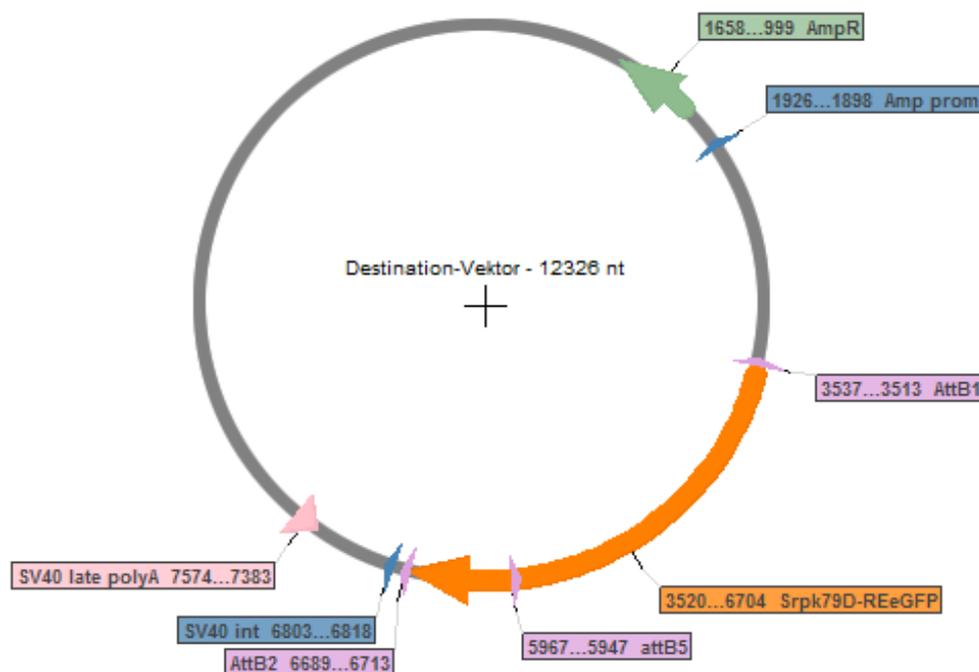
Abbildung 21A wurde nach Aufreinigung mit dem Donor-Vektor *pDONR<sup>TM</sup>221 P5-P2* durch die BP Clonase<sup>TM</sup> rekombiniert. Auch diesmal wurden DH5 $\alpha$ -Zellen mit der Rekombinationsreaktion transformiert, und positive Klone auf Kanamycin-haltigen LB-Platten selektiert. Wie aus Abbildung 21B hervorgeht, enthielten vier von vier getesteten Klonen den pEntry-*eGFP*-Vektor. Die Plasmid-DNA wurde mit BseRI und EcoRV doppelverdaut. Das Restriktionsenzym BseRI schneidet in der *eGFP*-cDNA einmal im 5'-Bereich. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym EcoRV liegt im Entry-Vektor nur einmal vor, und zwar sehr dicht hinter der *attB2*-attachment site. Bei falscher Orientierung der cDNA im Vektor wäre beim BseRI/EcoRV-Doppelverdau ein sehr kleines Fragment entstanden. Stattdessen ist die cDNA in der richtigen Orientierung inseriert, wie Abbildung 21B belegt.



**Abbildung 21: Klonierung der *eGFP*-cDNA in einen Donor-Vektor.** (A) Das PCR-Produkt inklusive Gateway®-Primer hat die richtige Größe. (B) Überprüfung der Klonen mit Entry-Vektor auf Insertion der *eGFP*-cDNA. Restriktionsverdaus zeigten die richtige Größe und Orientierung des Inserts für alle vier Klone an.

### 3.7.3.3 Herstellung eines Expressions-Klons

In der anschließenden LR Rekombination wurden die *Srpk79D-RE-*, sowie die *eGFP*-cDNA mit dem Destination-Vektor *pTW* mit Hilfe der LR Clonase<sup>TM</sup> rekombiniert. Dieser Vektor enthält die regulatorische UAS-Sequenz. Nach erfolgreicher Reaktion sollte also die *UAS-Srpk79D-RE-eGFP*-Sequenz im Vektor vorliegen, wie Abbildung 22 theoretisch zeigt.



**Abbildung 22: Karte des Destination-Vektors.** Der Vektor enthält die komplette cDNA für ein SRPK79D-PE-EGFP Fusionsprotein.

Die LR Rekombinationsreaktion wurde wiederum in *DH5 $\alpha$* -Zellen transformiert. Die diesmal auf Ampicillin-haltigen LB-Platten selektierten positiven Klone müssen noch mittels Restriktionsverdau getestet und sequenziert werden, was aus Zeitgründen leider nicht fertiggestellt werden konnte. Sollte ein positiver Klon die komplette richtige Sequenz enthalten, könnte der Vektor zur Herstellung transgener Fliegen verwendet werden. Sind die entsprechenden Fliegenlinien etabliert, kann nach Kreuzung mit einer entsprechenden Treiber-Linie die Expression des Fusionsproteins untersucht werden.

### 3.8 Knock-down von SR-Proteinen durch RNA-Interferenz

Eine Funktion von SR Proteinkinasen ist die Phosphorylierung der am Spleißen von prä-messengerRNA beteiligten SR-Proteine (Gui et al., 1994a; Gui et al., 1994b). In *Drosophila melanogaster* sind bislang sieben solcher SR-Proteine bekannt, nämlich SC35, X16/9G8, B52/SRp55, sowie ASF/SF2, RBP1, RBP1-like und SRp54 (Adams et al., 2000; Mount und Salz, 2000).

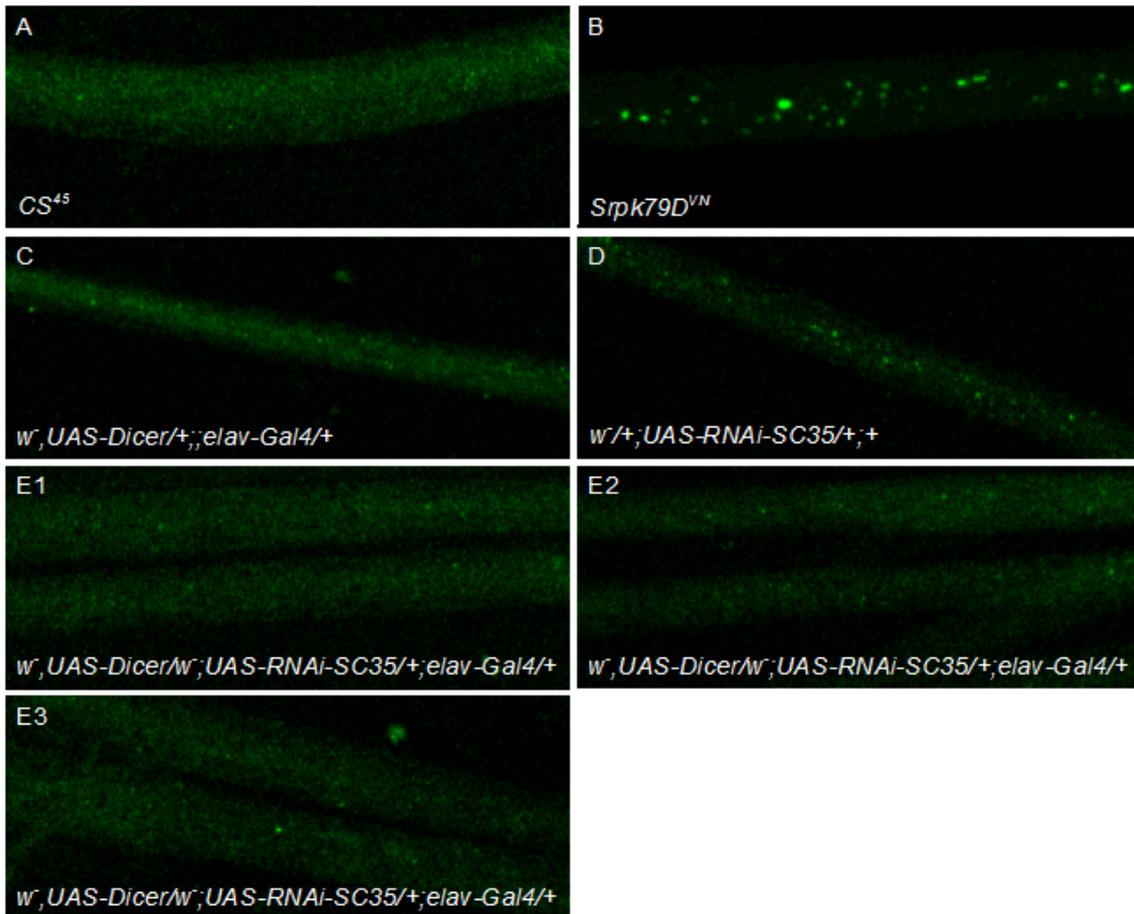
Eine interessante Frage war, ob die durch RNAi herbeigeführte Herunterregulation der Expression eines oder mehrerer dieser möglichen Zielproteine der SRPK79D den gleichen oder einen ähnlichen Phänotyp in Bezug auf Bruchpilot verursacht, nämlich die Aggregation des Proteins in larvalen Nerven, wie es in der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante der Fall ist.

In dieser Arbeit wurden die SR-Proteine SC35, X16/9G8 und B52/SRp55 untersucht. Die restlichen SR-Proteine wurden von Alice Schubert getestet (Schubert, 2011).

Die Fliegen der vom Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) bezogenen Linien *w<sup>+</sup>;UAS-RNAi-SR-ProteinX<sup>+</sup>* wurden mit Fliegen der Treiber-Linie *w<sup>+</sup>;UAS-Dicer<sup>+</sup>;elav-Gal4* gekreuzt. Die resultierenden Larven exprimierten, durch den Transkriptionsfaktor Gal4 getrieben, sowohl ein RNAi-Konstrukt gegen das entsprechende SR-Protein, als auch die Endoribonuklease Dicer, welche den ersten Schritt im RNA-Interferenz-Prozess katalysiert. Die Larven wurden, ebenso wie die entsprechenden Kontrollen, präpariert und mit MAK nc82 gefärbt.

#### 3.8.1 Knock-down von SC35

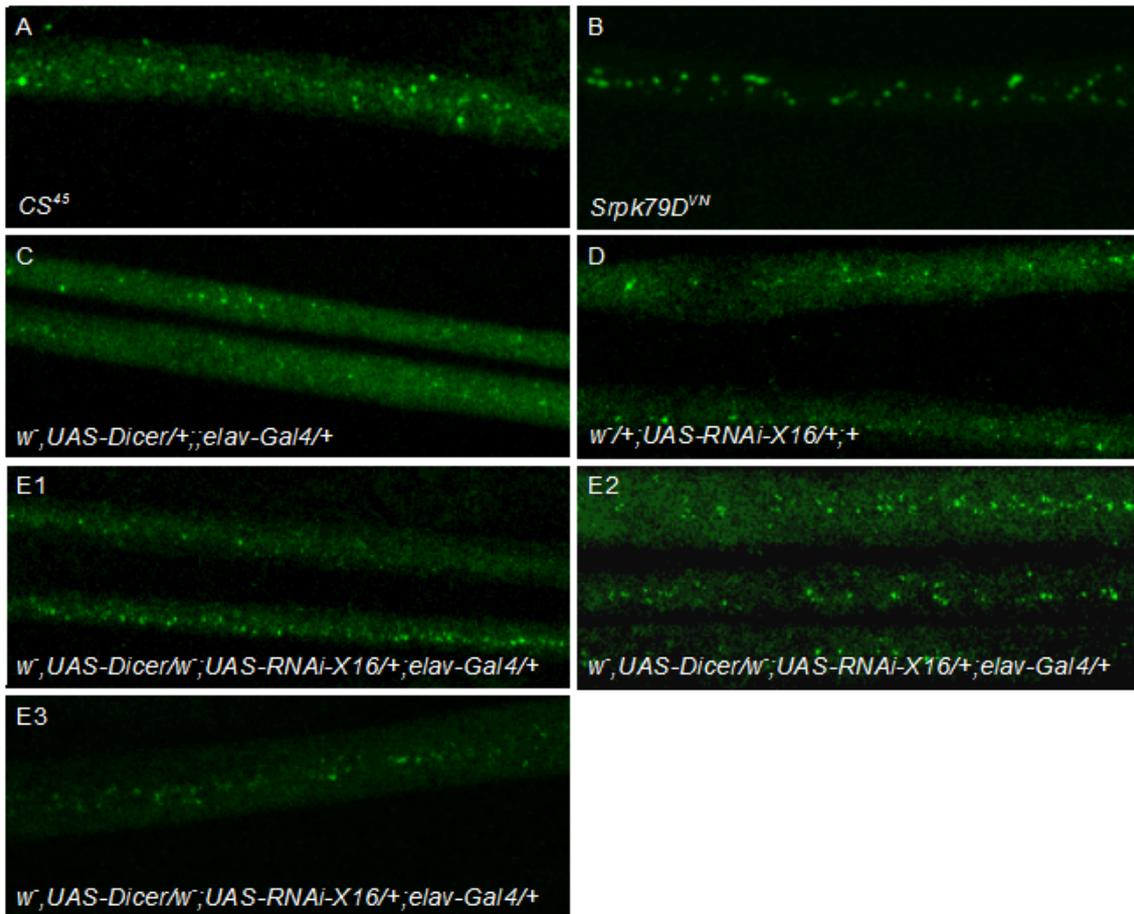
Wie Abbildung 23 zeigt, hat der Knock-down des SR-Proteins SC35 keine Auswirkung auf die Verteilung von Bruchpilot in larvalen Nerven. Die Färbung der Axone mit MAK nc82 in der Knock-down-Larve ist vergleichbar mit dem Wildtyp, sowie den Treiber- und Effektor-Kontrollen.



**Abbildung 23: Knock-down von SC35 führte nicht zur Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven.** (A-D) Kontrollen: (A) Wildtyp-Kontrolle. (B) Phänotyp der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante. (C) Treiber-Linie mit Wildtyp gekreuzt. (D) Effektor-Linie mit Wildtyp gekreuzt. (E1 bis E3) Experimental-Linie. Die Färbung der Axone mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP entsprach den Negativ-Kontrollen.

### 3.8.2 Knock-down von X16/9G8

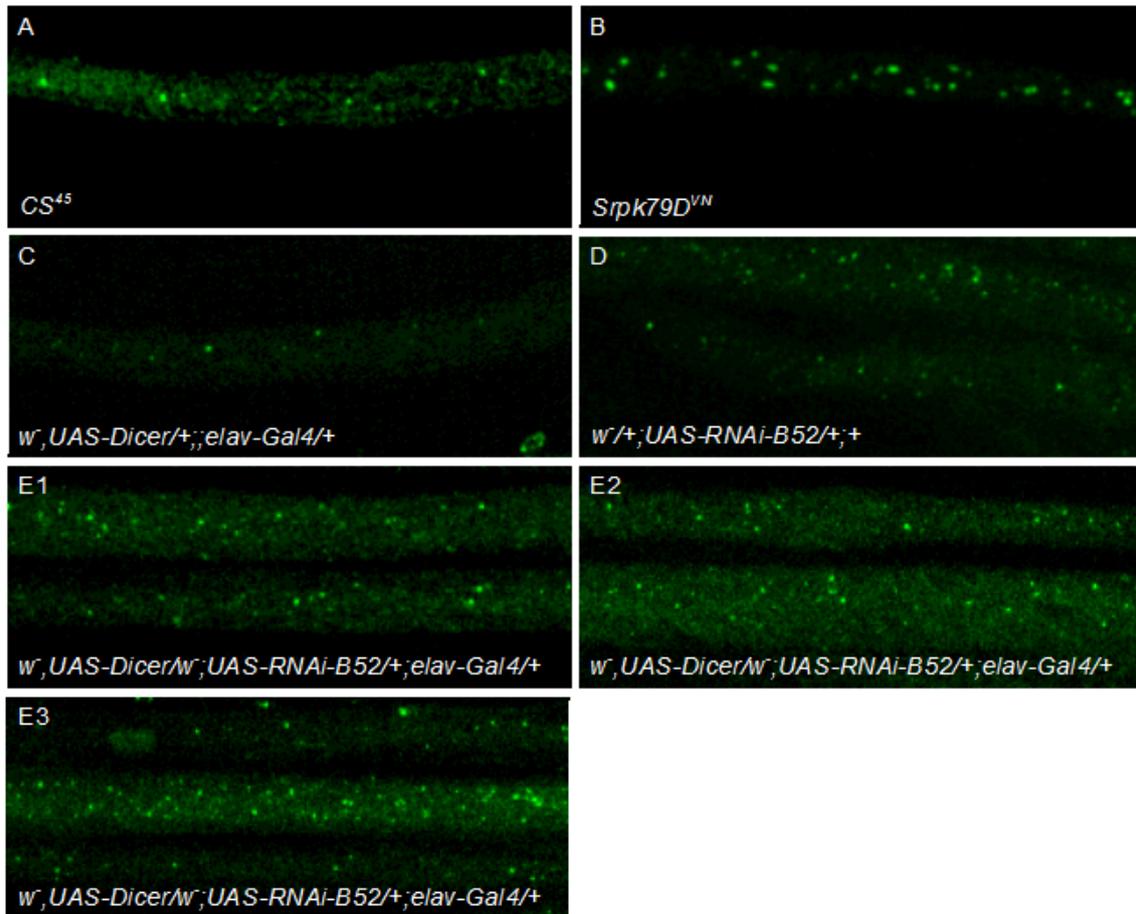
Die Reduktion der Expression des SR-Proteins X16/9G8 durch RNA-Interferenz hatte ebenfalls keinen Phänotyp in Bezug auf die Verteilung des Bruchpilot-Proteins in larvalen Nerven zur Folge, wie man Abbildung 24 entnehmen kann.



**Abbildung 24: Durch Knock-down von X16/9G8 kam es auch nicht zur Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven.** (A-D) Kontrollen: (A) Wildtyp-Kontrolle. (B) Phänotyp der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante. (C) Treiber-Linie mit Wildtyp gekreuzt. (D) Effektor-Linie mit Wildtyp gekreuzt. (E1 bis E3) Experimental-Linie. Bei Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP entstand ein mit den Negativ-Kontrollen vergleichbares Färbungsmuster.

### 3.8.3 Knock-down von B52/SRp55

Ebenso wie für die anderen beiden SR-Proteine gezeigt, war die Färbung larvaler Nerven mit MAK nc82 in der Experimental-Linie mit verminderter Menge an B52/SRp55 ähnlich wie in den Negativ-Kontrollen Wildtyp, Treiber-Linie über Wildtyp und Effektor-Linie über Wildtyp. Die Aufnahmen zeigt Abbildung 25.



**Abbildung 25: Knock-down von B52/SRp55 resultierte nicht in der Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven.** (A-D) Kontrollen: (A) Wildtyp-Kontrolle. (B) Phänotyp der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante. (C) Treiber-Linie mit Wildtyp gekreuzt. (D) Effektor-Linie mit Wildtyp gekreuzt. (E1 bis E3) Experimental-Linie. Bei Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP entstand ein ähnliches Färbungsmuster wie in den Negativ-Kontrollen.

### 3.9 Larvales Lernen

In diesem Verhaltensversuch wurden 3<sup>rd</sup> instar Larven in einem Zwei-Duft-Paradigma trainiert. Verwendet wurden die Düfte N-Amylacetat (AM) und 1-Octanol (1-Oct). Wie sich zeigte, ist die larvale olfaktorische Konditionierung in der *Srpk79D<sup>VN(CS)</sup>* Nullmutante nicht signifikant beeinträchtigt, denn Larven, die abwechselnd dem Duft 1-Octanol in Verbindung mit und dem Duft N-Amylacetat in Abwesenheit von Fructose (oder reziprok) ausgesetzt worden waren, bevorzugten im Test den zuvor belohnten Duft, was in einem positiven Lern-Index zum Ausdruck kommt, wie Abbildung 26 graphisch darstellt.

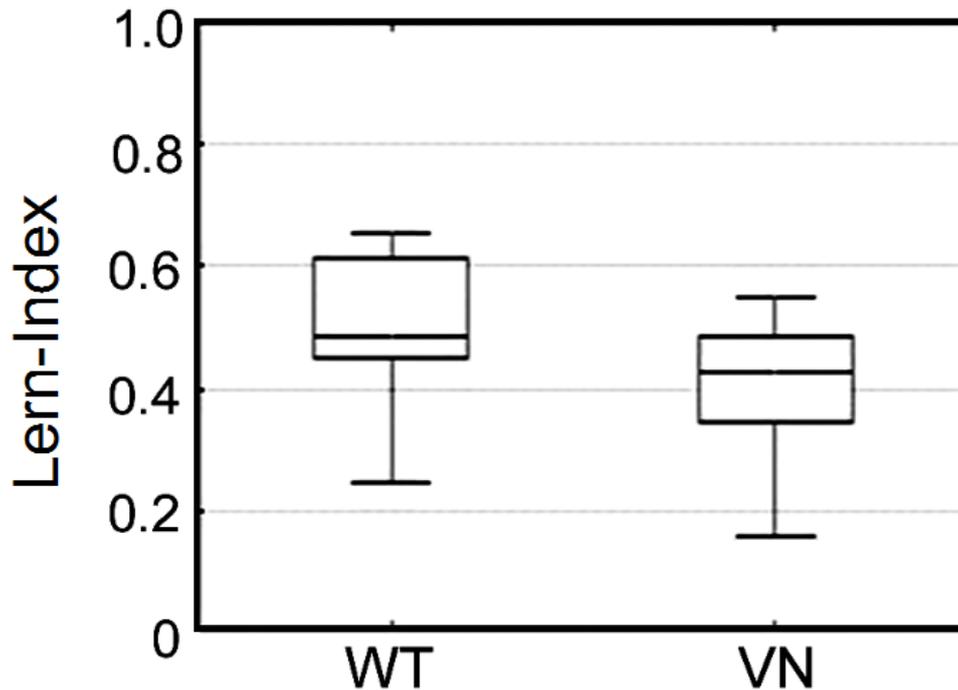


Abbildung 26: Lernverhalten der gegen den Wildtyp rückgekreuzten Nullmutante *Srpk79D<sup>VN(CS)</sup>* in einem Zwei-Duft-Lern-Paradigma mit Belohnung durch Zucker. Die Lern-Indizes sind in Box-Plots dargestellt. Der Mann-Whitney U-Test mit einem p-Wert=0.15 bei einer Versuchsanzahl von n=10 ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp *CantonS<sup>45</sup>* und *Srpk79D<sup>VN(CS)</sup>*.

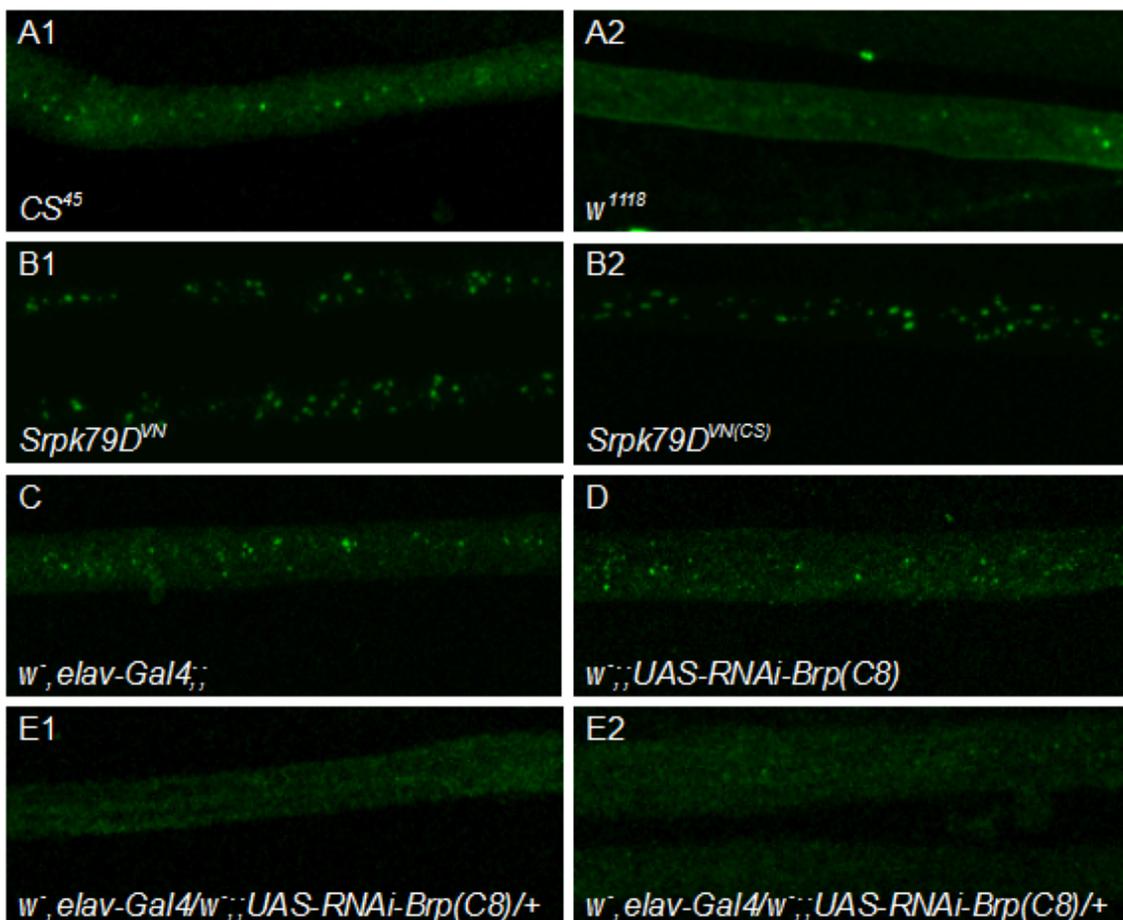
### 3.10 Herstellung einer Fliegenlinie *w<sup>+</sup>; UAS-RNAi-Brp(C8), Srpk79D<sup>VN</sup>*

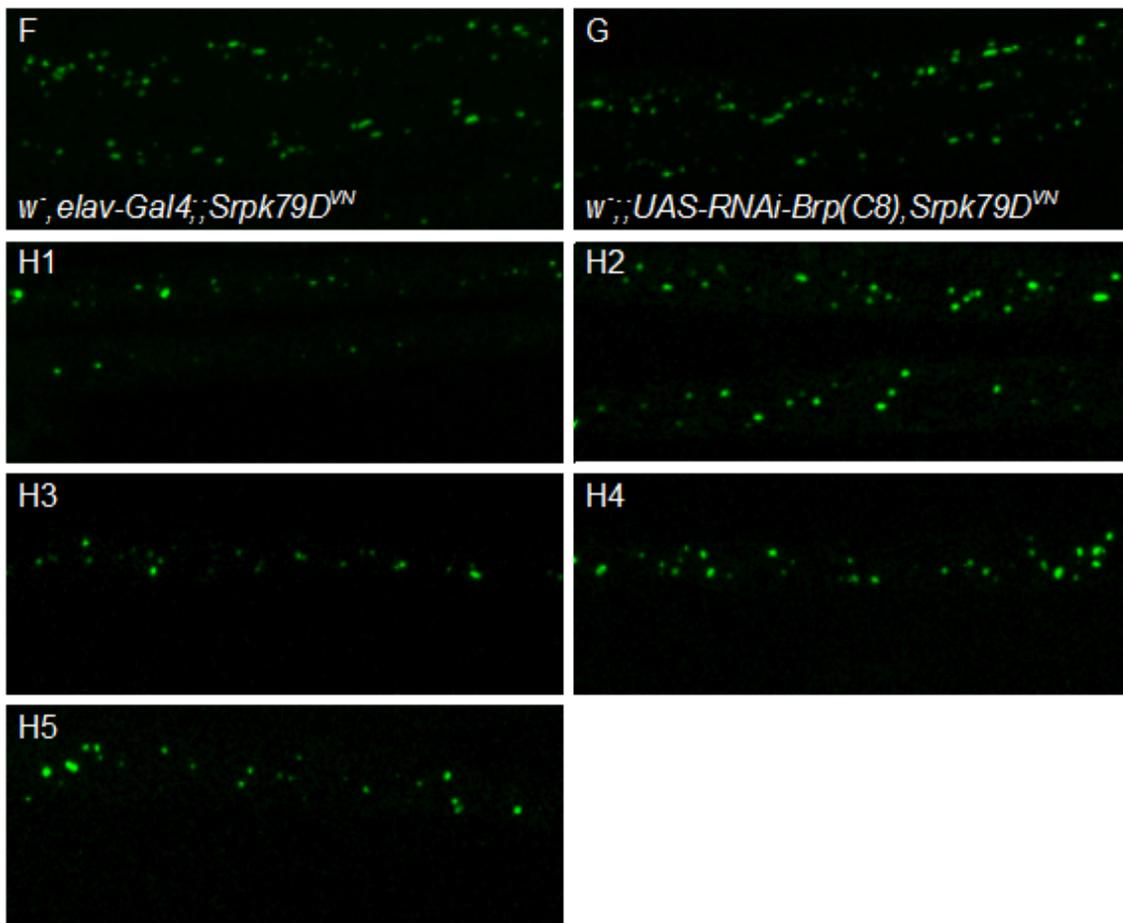
Es war bereits gezeigt worden, dass die bei Überexpression von Bruchpilot entstehenden BRP-Agglomerate nicht durch gleichzeitige Überexpression der SRPK79D beseitigt werden können (Nieratschker et al., 2009). Umgekehrt stellte sich die Frage, ob die bei Mutation des *Srpk79D*-Gens entstehenden BRP-Agglomerate durch reduzierte Expression von Bruchpilot eliminiert werden können. Zur Beantwortung dieser Fragestellung war es nötig, ein RNAi-Konstrukt gegen Bruchpilot mit der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutation zu kombinieren. Der Insertionsort des *UAS-RNAi-Brp(C8)*-Konstrukts liegt auf dem dritten Chromosom, genauso wie das *Srpk79D*-Gen auch. Zunächst wurden also Fliegen der einzelnen Genotypen miteinander gekreuzt, sodass alle Nachkommen der F1-Generation je ein drittes Chromosom der Elterntiere erhielten. Bei der Gametenbildung in den F1-Weibchen fand dann unter Umständen die gewünschte Rekombination zwischen RNAi-Konstrukt und Deletionsallel statt. Diese Tiere wurden nochmal mit *Srpk79D<sup>VN</sup>* Männchen verpaart und F2-Fliegen wurden in Einzelkreuzungen mit *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten weiter verpaart. Nach

Eiablage wurden diese F2-Tiere über PCR überprüft, ob sie den homozygoten *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund aufwiesen, was der Fall war, wenn es in der F1-Generation zur Rekombination gekommen war. Bestätigt wurde der homozygote Nullmutanten-Hintergrund außerdem durch immuno-histochemische Färbungen an Larven im dritten Larvenstadium mit dem MAK nc82 gegen Bruchpilot. Homozygotie des *UAS-RNAi-Brp(C8)*-Konstrukts ließ sich aus der Intensität der Augenfarbe ableiten, denn zwei Kopien des *Mini-white*-Gens des UAS-Konstrukts führten zu einer intensiveren roten Augenfarbe als nur eine Kopie des *Mini-white*-Gens.

### 3.10.1 Bruchpilot-Agglomerate trotz Knock-down von BRP

Wie aus Abbildung 27 hervorgeht, kann die reduzierte Expression von Bruchpilot durch RNAi bei gleichzeitigem Vorhandensein der Nullmutation im *Srpk79D*-Gen nicht die Akkumulation von BRP in larvalen Nerven verhindern (vergleiche H1 bis H5 in Abbildung 27).





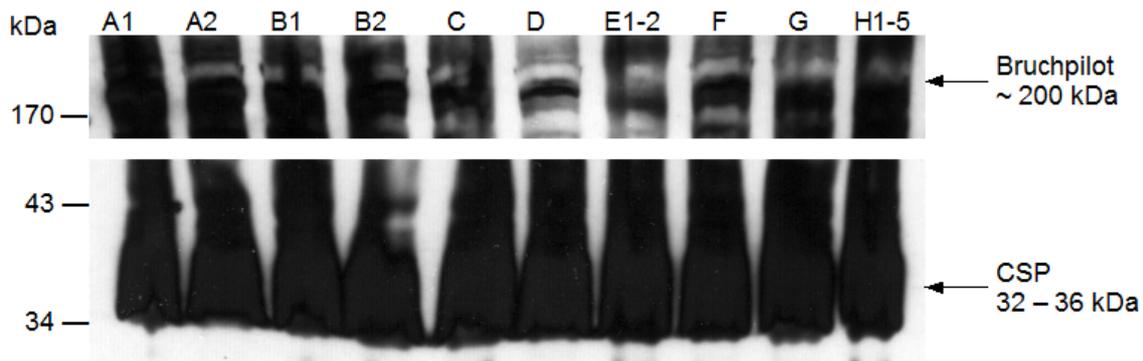
Genotyp H1-H5: *w; elav-Gal4/w;; UAS-RNAi-Brp(C8), Srpk79D<sup>VN</sup>/Srpk79D<sup>VN</sup>*

**Abbildung 27: Der Phänotyp der Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven bei Mutation im *Srpk79D*-Gen bleibt auch bei gleichzeitigem Knock-down von BRP bestehen.** (A1+A2) Wildtyp-Kontrollen. (B1+B2) Ursprüngliche und cantonisierte *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante. (C) Treiber-Linie im Wildtyp-Hintergrund. (D) Effektor-Linie im Wildtyp-Hintergrund. (E1+E2) Experimental-Linie: Knock-down von BRP im Wildtyp-Hintergrund. (F) Treiber-Linie im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. (G) Effektor-Linie im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. (H1-H5) Experimental-Linie: Knock-down von BRP im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP.

### 3.10.2 Flugversuch

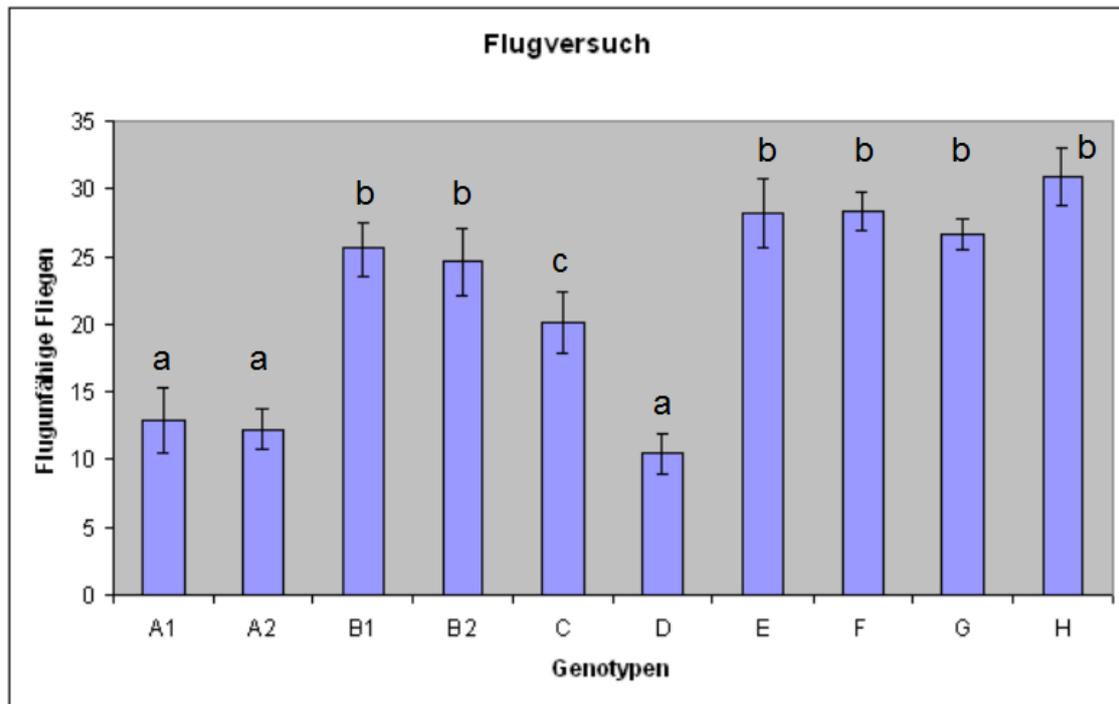
Das Protein Bruchpilot erhielt seinen Namen durch die Tatsache, dass der Knock-down des Proteins durch RNAi in Fliegen zu einem hohen Prozentsatz flugunfähiger Tiere führt (Wagh et al., 2006); diese also buchstäblich zu Bruchpiloten wurden. Da Mutation im *Srpk79D*-Gen zur Akkumulation von Bruchpilot in larvalen Nerven führt (Nieratschker et al., 2009), und die *Srpk79D* Mutanten ebenfalls einen Phänotyp im Flugversuch aufweisen (Bloch, 2007), wurden die Fliegen mit Knock-down von Bruchpilot im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund, parallel zu allen genetischen Kontrollen, in

dem Verhaltens-Assay nach Benzer et al. (1973) zur Flugfähigkeit getestet (siehe Abbildung 29). Zur Kontrolle der Protein-Expression wurde ein Western Blot durchgeführt. Wie Abbildung 28 zeigt, ist in den Experimental-Linien E1, E2 und H1 bis H5 im Vergleich zu allen genetischen Kontrollen kein Bruchpilot-Protein mehr nachweisbar.



**Abbildung 28: Western Blot aller zehn im Flug getesteten Genotypen.** Die Beschriftung der einzelnen Genotypen entspricht der von Abbildung 27: (A1+A2) Wildtyp-Kontrollen *CS<sup>45</sup>* und *w<sup>1118</sup>*. (B1+B2) Ursprüngliche und cantonisierte *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante. (C) Treiber-Linie *elav-Gal4* im Wildtyp-Hintergrund. (D) Effektor-Linie *UAS-RNAi-Brp(C8)* im Wildtyp-Hintergrund. (E1+E2) Experimental-Linie: Knock-down von BRP im Wildtyp-Hintergrund. (F) Treiber-Linie *elav-Gal4* im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. (G) Effektor-Linie *UAS-RNAi-Brp(C8)* im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. Hier ist das BRP-Signal nur sehr schwach zu erkennen, obwohl es sich um eine Kontrolle handelt. Möglicherweise ist das *UAS-RNAi-Brp(C8)*-Konstrukt 'leaky'. (H1-H5) Experimental-Linie: Knock-down von BRP im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. Aufgetragen wurden 8 adulte Fliegenköpfe pro Genotyp. Entwicklung des Blots mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP und MAK ab49 (1:100) gegen CSP.

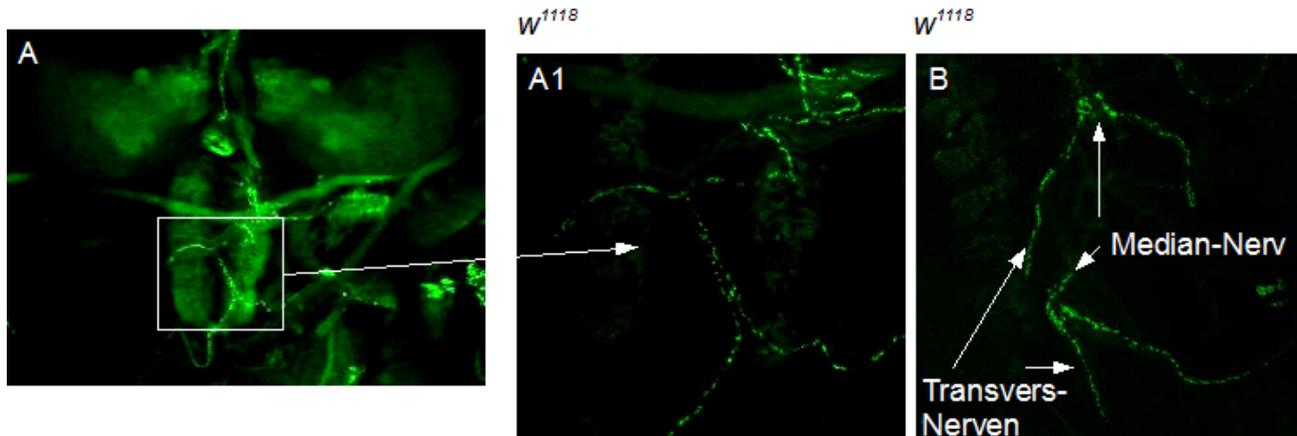
Wie bereits in anderen Verhaltensversuchen beobachtet, weist die Treiber-Linie *elav-Gal4* (C) schlechtere Werte bezüglich der Flugfähigkeit auf als die übrigen genetischen Kontrollen. Die Genotypen *CS<sup>45</sup>* (A1), *w<sup>1118</sup>* (A2) und *UAS-RNAi-Brp(C8)* (D) sind nach paarweisem T-Test mit Bonferroni-Korrektur bei 45 möglichen Paarungen untereinander nicht signifikant verschieden. Genauso gibt es nach paarweisem T-Test mit Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen *Srpk79D<sup>VN</sup>* (B1), *Srpk79D<sup>VN(CS)</sup>* (B2), *elav-Gal4* im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund (F), *UAS-RNAi-Brp(C8)* im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund (G) und den Tieren mit Knock-down von BRP im wildtypischen (E) beziehungsweise im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund (H).



**Abbildung 29: Flugfähigkeit.** Im Vergleich zu den genetischen Kontrollen (A1, A2, D) (a) weisen Fliegen mit Nullmutation im *Srpk79D*-Gen (B1, B2, F, G), Knock-down von Bruchpilot (E) oder Knock-down von Bruchpilot im *Srpk79D<sup>FN</sup>* Null-Hintergrund (H) eine signifikant reduzierte Flugfähigkeit auf (b). Die Beschriftung der einzelnen Genotypen entspricht der von Abbildung 27 und 28: (A1+A2) Wildtyp-Kontrollen *CS<sup>45</sup>* und *w<sup>1118</sup>*. (B1+B2) Ursprüngliche und cantonisierte *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutante. (C) Treiber-Linie *elav-Gal4* im Wildtyp-Hintergrund. (D) Effektor-Linie *UAS-RNAi-Brp(C8)* im Wildtyp-Hintergrund. (E) Experimental-Linie: Knock-down von BRP im Wildtyp-Hintergrund. (F) Treiber-Linie *elav-Gal4* im *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. (G) Effektor-Linie *UAS-RNAi-Brp(C8)* im *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund. (H) Experimental-Linie: Knock-down von BRP im *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund.

### 3.11 Bruchpilot ist möglicherweise an der Ausschüttung von Neuropeptiden beteiligt

Bei Färbungen mit MAK nc82 war ein wiederkehrendes Bruchpilot-Muster in Nerven erkennbar, welche oberhalb des Ventralganglions lagen (siehe Abbildung 30). Bei diesen blind endenden Nerven handelt es sich um das abdominale Median- und Transvers-Nervensystem von *Drosophila melanogaster* (Santos et al., 2006). Diese Nerven enthalten die abdominalen perisymphatischen Organe, die Neuropeptid-Hormone in die Hämolymphe abgeben. Daher werden sie auch als Neurohämäl-Organ bezeichnet.



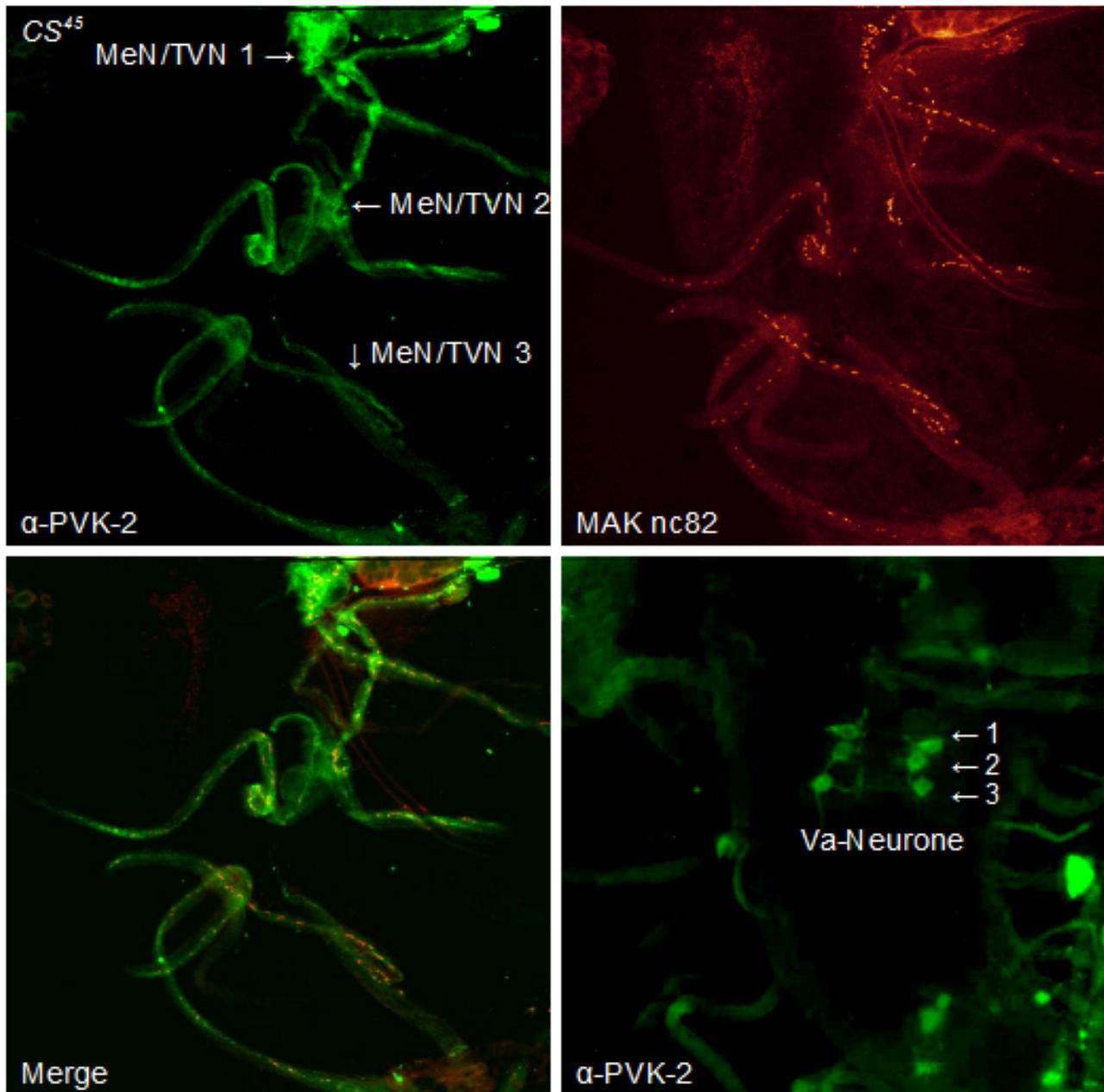
**Abbildung 30: Bruchpilot ist im abdominalen Median/Transvers-Nervensystem (MeN/TVN) zu finden.** (A) Dorsale Ansicht des Ventralganglions einer L3-Larve. Die MeNs/TVNs verlassen das Ventralganglion entlang der Mittellinie. (A1) Vergrößerung eines Ausschnitts von (A). Zu sehen sind zwei abdominale MeNs/TVNs. (B) Die ersten zwei abdominalen MeNs/TVNs einer anderen Präparation. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP.

### 3.11.1 Bruchpilot ko-lokalisiert mit den CAPA-Peptiden im Median/Transvers-Nervensystem

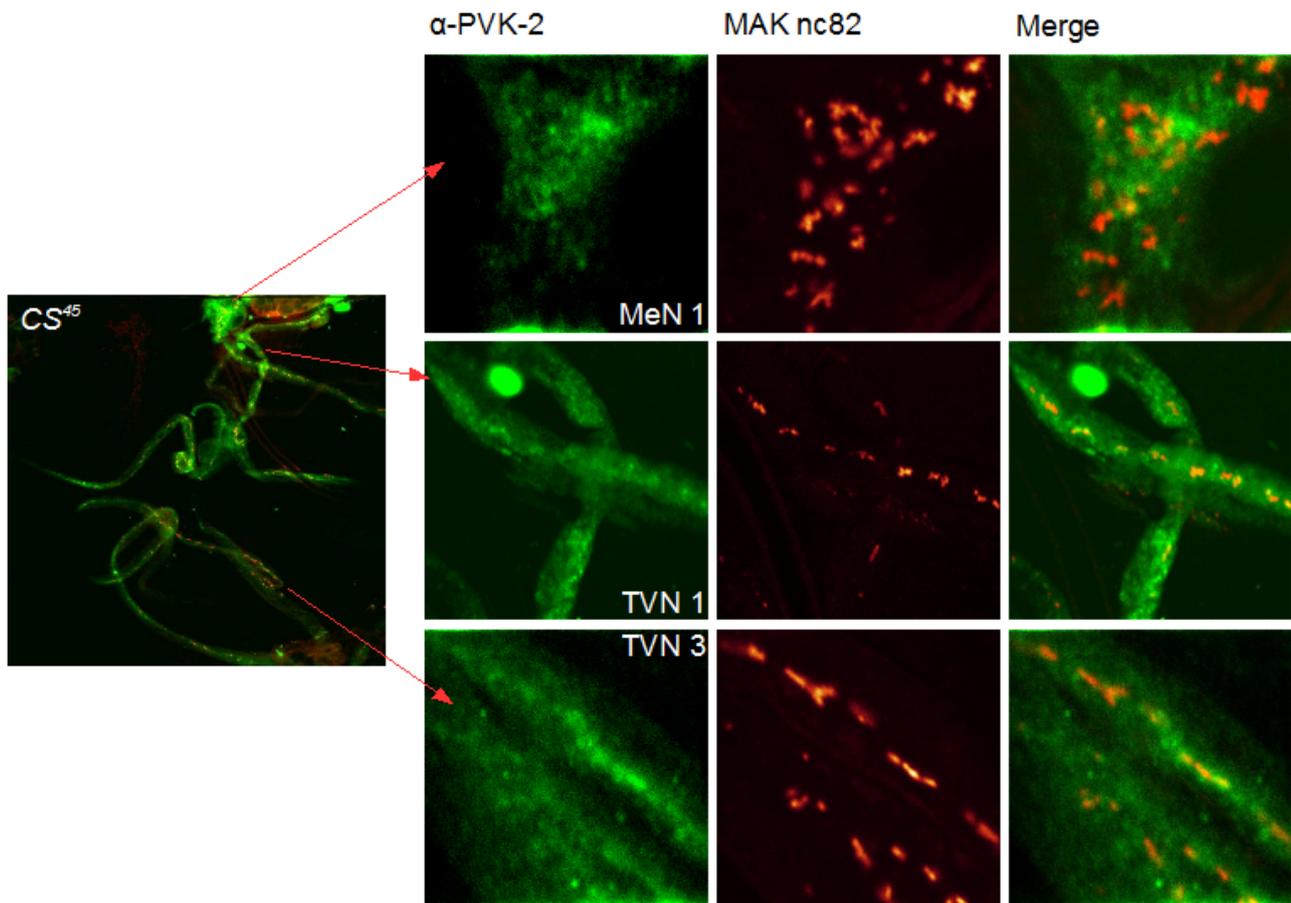
Die Zellkörper der ersten drei abdominalen MeNs/TVNs liegen sehr weit ventral im Ganglion und werden daher als Va-Neurone (für ventral-abdominal) bezeichnet (Santos et al., 2006). Sie exprimieren die CAPA-Peptide.

Bei einer Doppelfärbung mit MAK nc82 und dem anti-PVK-2 Antiserum, welches spezifisch die Peptide sowohl der Periviscerokinin-, als auch der Pyrokinin-Familie erkennt, konnten einerseits die Va-Neurone identifiziert, und zum anderen die Ko-Lokalisation von Bruchpilot mit den CAPA-Peptiden im abdominalen Median/Transvers-Nervensystem demonstriert werden (siehe Abbildung 31).

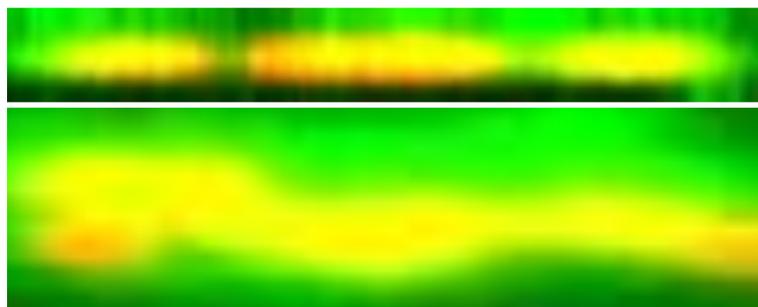
In der Übersicht in Abbildung 31 ist sehr gut zu erkennen, dass Bruchpilot tatsächlich in den ersten drei MeNs/TVNs exprimiert wird. Auch bei höherer Vergrößerung ist die Ko-Lokalisation von Bruchpilot und CAPA-Peptiden sowohl in den Median-, als auch in den Transvers-Nerven (siehe Abbildung 32) sichtbar, was in der Seitenansicht (siehe Abbildung 33) noch deutlicher wird.



**Abbildung 31: Dorsal-Aufsicht auf das Median/Transvers-Nervensystem einer wildtypischen L3-Larve.** Ko-Lokalisation von Bruchpilot und CAPA-Peptiden in den ersten drei MeNs/TVNs. Die Färbungen sind nur im proximalen Teil dieser Nerven zu finden, da die TVNs blind enden. Ventral liegen die drei gepaarten Va-Neurone. Sie sind die zugehörigen Zellkörper zu den ersten drei abdominalen MeNs/TVNs. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP (rot) und dem  $\alpha$ -PVK-2-Antiserum (1:5000) gegen die CAPA-Peptide (grün).



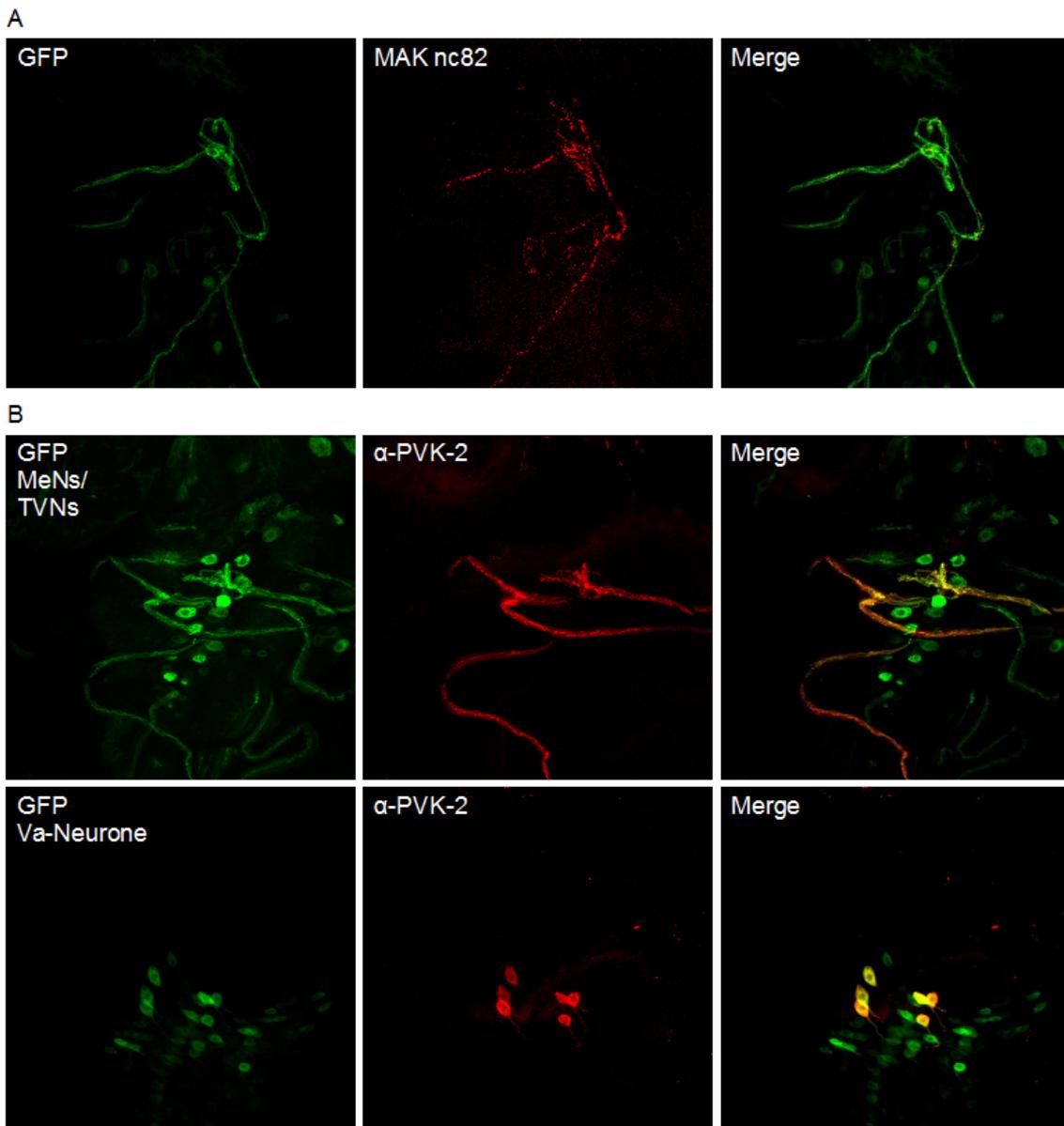
**Abbildung 32: Vergrößerte Ansicht der abdominalen perisymphathischen Organe.** Links: Übersicht. Pfeile zeigen diejenigen Teilbereiche an, welche im Detail abgebildet sind. Rechts: Bruchpilot und CAPA-Peptide ko-lokalisieren sowohl in den Median-Nerven (obere Reihe), als auch in den Transvers-Nerven (mittlere und untere Reihe). Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP (rot) und dem  $\alpha$ -PVK-2-Antiserum (1:5000) gegen die CAPA-Peptide (grün).



**Abbildung 33: Seitenansicht der abdominalen perisymphathischen Organe in den TVNs.** Im oberen Präparat sind drei getrennte Bruchpilot-Strukturen (rot) zu erkennen, die in räumlicher Nähe zur CAPA-Immunoreaktivität (grün) liegen, wodurch es zu einer starken Überlappung beider Färbungen (gelb) kommt. Auch im unten abgebildeten Präparat ko-lokalisieren Bruchpilot- und CAPA-Immunoreaktivität. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP und dem  $\alpha$ -PVK-2-Antiserum (1:5000) gegen die CAPA-Peptide.

### 3.11.2 Ko-Lokalisation von Bruchpilot mit mCD8-GFP im Median/Transvers-Nervensystem

Werden Larven, die mit Hilfe des Treibers *Va-Gal4* in den Va-Neuronen ein *UAS-mCD8-GFP*-Konstrukt exprimieren, einer Färbung mit MAK nc82 unterzogen, ist Ko-Lokalisation von Bruchpilot und dem in den MeNs/TVNs vorhandenen GFP zu beobachten, wie Abbildung 34A belegt. Zur Kontrolle wurden GFP-exprimierende Larven auch mit dem Antikörper gegen die CAPA-Peptide gefärbt. Die Fluoreszenzen überlappen auch in diesem Fall, was Abbildung 34B zeigt.

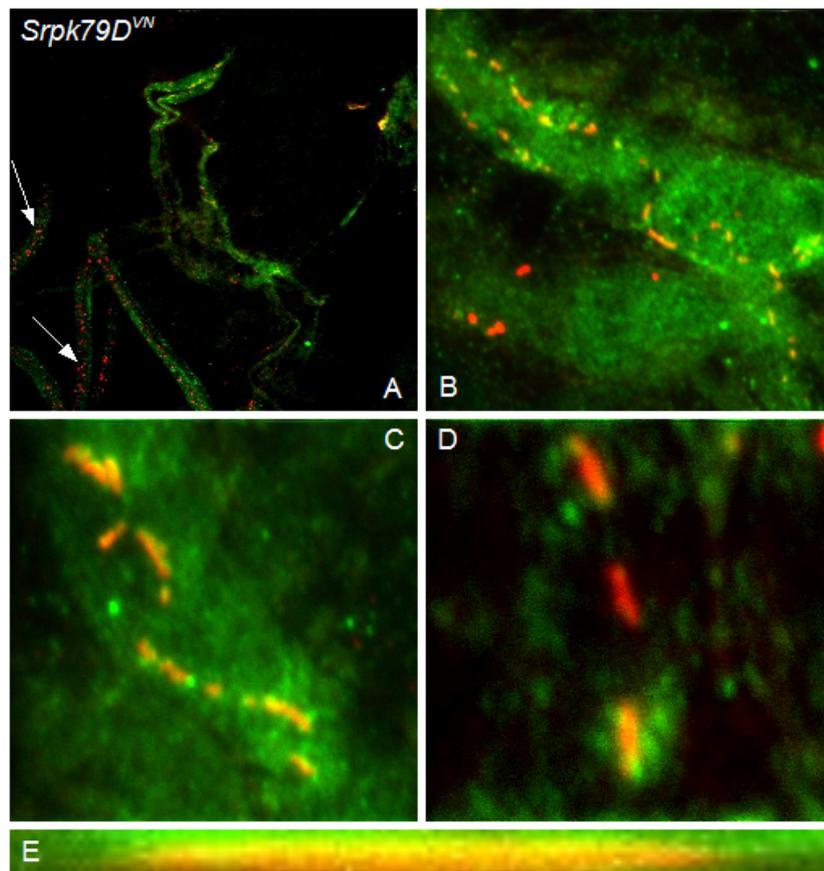


**Abbildung 34: Ko-Lokalisation von Bruchpilot und CAPA-Peptiden mit mCD8-GFP im Median/Transvers-Nervensystem.** (A) Durch *Va-Gal4* exprimiertes mCD8-GFP (grün) ist gemeinsam mit Bruchpilot (rot) in den MeNs/TVNs zu finden. (B) Obere Reihe: Die Kontroll-Färbung mit dem Antikörper gegen die CAPA-Peptide (rot)

markiert die mCD8-GFP-exprimierenden MeNs/TVNs. Untere Reihe: Die Zellkörper der Va-Neurone sind durch Ko-Lokalisation von GFP und CAPA-Peptiden eindeutig identifizierbar und von anderen GFP-exprimierenden Zellen abgrenzbar. Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP in A und dem  $\alpha$ -PVK-2-Antiserum (1:5000) gegen die CAPA-Peptide in B.

### 3.11.3 Die *Srpk79D<sup>VM</sup>* Nullmutante zeigt ein normales Bruchpilot-Muster im Median/Transvers-Nervensystem

Während die Mutation im Gen für die SRPK79D charakteristische Akkumulationen des Aktive Zone Proteins Bruchpilot in neuronalen Axonen von Larven zur Folge hat, die in Abbildung 35A durch weiße Pfeile gekennzeichnet sind, ist das Bruchpilot-Muster in den Median- und Transvers-Nerven der *Srpk79D<sup>VM</sup>* Nullmutante nicht sichtbar verändert, wie Abbildung 35B-D zu entnehmen ist. Auch in der Nullmutante ist Ko-Lokalisation von Bruchpilot und CAPA-Peptiden feststellbar.

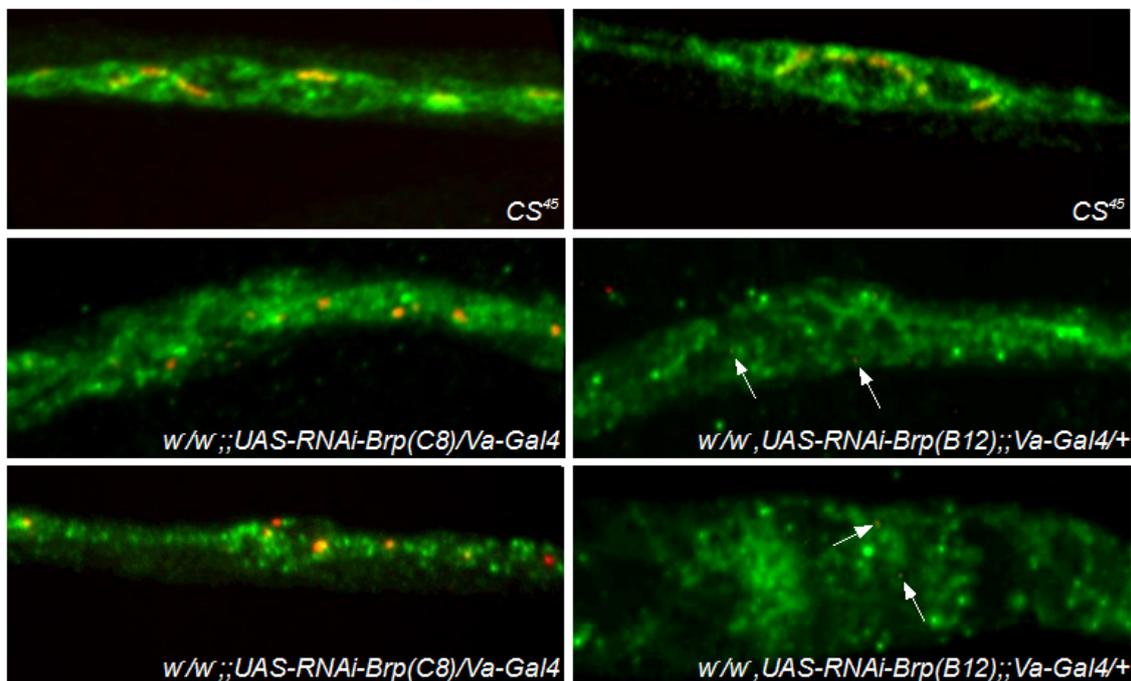


**Abbildung 35: Mutation des *Srpk79D*-Gens hat keine Auswirkung auf die Verteilung des Bruchpilot-Proteins in den MeNs/TVNs.** (A) In der Übersicht sind die Median- und Transvers-Nerven identifizierbar. Ebenfalls sichtbar sind die neuronalen Axone mit den für die *Srpk79D<sup>VM</sup>* Nullmutante typischen Bruchpilot-Agglomeraten (Pfeile). (B-D) Vergrößerte Ansicht der perisymphatischen Organe in den MeNs/TVNs der *Srpk79D<sup>VM</sup>* Nullmutante. (E) Seitenansicht eines perisymphatischen Organs. Auch hier ko-lokalisieren Bruchpilot und die CAPA-Peptide. Färbung mit MAK nc82

(1:100) gegen BRP (rot) und dem  $\alpha$ -PVK-2-Antiserum (1:5000) gegen die CAPA-Peptide (grün).

### 3.11.4 Knock-down von Bruchpilot in den Median- und Transvers-Nerven durch RNA-Interferenz

Gezielte Reduktion der Expression von Bruchpilot in den MeNs/TVNs unter Verwendung der *Va-Gal4* Treiber-Linie und zweier verschiedener *UAS-RNAi-Brp* Effektor-Linien führte bei Kreuzung mit dem schwächeren, auf dem dritten Chromosom gelegenen Konstrukt *UAS-RNAi-Brp(C8)* nur zu einer Verkleinerung der BRP-Strukturen im Median/Transvers-Nervensystem, während es bei Kreuzung mit dem stärkeren, auf dem X-Chromosom gelegenen Konstrukt *UAS-RNAi-Brp(B12)* zum nahezu kompletten Verlust an BRP-Immunoreaktivität in diesen Nerven kam, wie in Abbildung 36 zu sehen ist. Die durch *Va-Gal4* getriebene Expression des *B12*-Konstrukts im Median/Transvers-Nervensystem hatte im Gegensatz zur *elav-Gal4* getriebenen, pan-neuronalen Expression, welche letal ist, keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Tiere. Sie entwickelten sich bis zum Adultstadium.



**Abbildung 36: Knock-down von Bruchpilot in den MeNs/TVNs durch *Va-Gal4*.** Linke Reihe: Wildtyp-Kontrolle (oben). Größen-Reduktion der BRP-Strukturen bei Verwendung des *C8*-Konstrukts (Mitte und unten). Rechte Reihe: Wildtyp-Kontrolle (oben). BRP-Immunoreaktivität ist bei Expression des *B12*-Konstrukts drastisch reduziert und nur in Form kleiner Punkte zu erkennen (weiße Pfeile). Färbung mit MAK nc82 (1:100) gegen BRP (rot) und dem  $\alpha$ -PVK-2-Antiserum (1:5000) gegen die CAPA-Peptide (grün).

## 4. Diskussion

### 4.1 Präsynaptische Proteine

Mutation des *Srpk79D*-Gens von *Drosophila melanogaster* führt zur Bildung auffälliger Bruchpilot-Agglomerate entlang der Axone der larvalen Segmental- und Intersegmentalnerven (Johnson et al., 2009; Nieratschker et al., 2009). Auch in den Antennalnerven adulter Fliegen sind diese Bruchpilot-Ansammlungen beobachtet worden (Nieratschker et al., 2009). Die *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante der Arbeitsgruppe stammt von der P-Element-Insertion *Srpk79D<sup>P1</sup>* ab. Theoretisch könnte also eine unabhängige zweite Mutation in diesem Stamm die Ursache für den beobachteten BRP-Agglomerate-Phänotyp sein. Diese Möglichkeit konnte weitgehend ausgeschlossen werden, da der Phänotyp auch nach extensiver Rückkreuzung der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante gegen den Wildtyp *CantonS* bestehen blieb. Somit war es sehr wahrscheinlich, dass tatsächlich die Mutation im Gen für die SRPK79D für den Phänotyp verantwortlich ist. Dies wurde durch Rescue-Versuche endgültig verifiziert (Nieratschker et al., 2009).

Bruchpilot ist als Protein der Aktiven Zone direkter Bestandteil der elektronendichten T-Bars und spielt somit eine wichtige strukturelle Rolle (Fouquet et al., 2009). Durch die lokale Konzentrierung von Calcium-Kanälen an der Aktiven Zone hat Bruchpilot auch funktionell Bedeutung, indem es den durch ein Aktionspotential ausgelösten Calcium-Einstrom und damit einhergehend Vesikelfusion und Neurotransmitter-Ausschüttung beeinflusst (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006). Durch elektronenmikroskopische Analysen konnten in den Axonen der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante komplexe elektronendichte Strukturen identifiziert werden, die mehrere, miteinander verknüpfte T-Bars widerspiegeln könnten und damit größer sind als ein typisches T-Bar eines präsynaptischen neuromuskulären Boutons einer Larve. Dennoch waren sie als solche erkennbar, denn sie sind aus einem Sockel mit darüber liegender Plattform aufgebaut. Eine grobe Schätzung der Häufigkeit dieser Strukturen in seriellen EM-Schnitten deutet darauf hin, dass ihre Dichte vergleichbar ist mit der Dichte der Bruchpilot-Akkumulationen, die in der Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines Antikörpers gegen BRP zu beobachten sind. Von parallel angefertigten Präparaten wurde das Vorkommen dieser elektronendichten Strukturen statistisch ausgewertet (Dippacher, in Vorbereitung; Nieratschker et al., 2009). So wurde in drei larvalen Präparationen der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante eine Fläche zwischen 6470 und 8717  $\mu\text{m}^2$  analysiert, und pro Tier wurden zwischen acht und fünfzehn große elektronendichte Komplexe gefunden, während es in drei wildtypischen Larven zwischen ein und drei kleinere elektronendichte Strukturen auf einer Fläche

zwischen 6842 und 9750  $\mu\text{m}^2$  waren. In der Nullmutante war also durchschnittlich ein elektronendichter Komplex pro 625,4 ( $\pm 105,0$ ;  $n = 3$ )  $\mu\text{m}^2$  und im Wildtyp pro 4904 ( $\pm 1047$ ;  $n = 3$ )  $\mu\text{m}^2$  zu finden. Der Durchmesser der elektronendichten Komplexe belief sich im Durchschnitt auf 449,09 ( $\pm 43,5$ ;  $n = 37$ ) nm in der Nullmutante beziehungsweise 155,63 ( $\pm 17,3$ ;  $n = 6$ ) nm im Wildtyp (Nieratschker et al., 2009). Immuno-Elektronenmikroskopie mit dem monoklonalen Antikörper nc82, der gegen den C-Terminus von BRP gerichtet ist, erbrachte den Beweis, dass diese elektronendichten Strukturen BRP-positiv sind. Das Signal des kolloidalen Silbers war dabei stets in der Peripherie der T-Bar ähnlichen Komplexe zu finden (Abbildung 3 und 3a in Ergebnisse), was vermuten lässt, dass es sich hierbei um eine ähnlich geordnete Zusammenlagerung von Bruchpilot-Molekülen handelt, wie sie an der Aktiven Zone vorliegt (Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010). Wie Fouquet et al. (2009) durch immuno-elektronenmikroskopische Lokalisation zweier Bruchpilot-Epitope am N- beziehungsweise C-Terminus des Proteins zeigten, ist der N-Terminus (BRP<sup>N-Term</sup>) in Aufsicht und Seitenansicht im Zentrum der T-Bars zu finden, während der C-Terminus (BRP<sup>Nc82</sup>) sich in das Cytoplasma erstreckt. Quantifizierung der BRP<sup>N-Term</sup>- und BRP<sup>Nc82</sup>-Signale durch Berechnung der Abstände der Goldpartikel zur Plasmamembran der Aktiven Zone ergaben, dass der N-Terminus hoch signifikant näher an der Membran zu liegen kommt als der C-Terminus. STED-mikroskopische Analysen bestätigten diesen Befund. Außerdem gelang es durch diese Technik, die Abstände der Bruchpilot-Epitope untereinander und zu den postsynaptischen Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten A und D, sowie zur präsynaptischen Cacophony-Untereinheit des Calcium-Kanals zu vermessen. Dementsprechend beläuft sich die Distanz zwischen N- und C-Terminus auf etwa 68nm. Die horizontale Ausdehnung eines T-Bars an der Aktiven Zone beträgt etwa 100nm (vergleiche dazu Abbildung 3B in Fouquet et al., 2009). Bei Betrachtung der fusionierten T-Bars in den larvalen Axonen der *Srpk79D*<sup>IV</sup> Nullmutante fällt auf, dass einzelne T-Bars der komplexen Strukturen etwa die Maße eines T-Bar der Aktiven Zone haben. Sehr schöne Beispiele dafür sind in den Abbildungen 1C und 3a-H des Ergebnisteils zu sehen, wo jeweils vier einzelne T-Bars an ihrer Basis verknüpft sind, welche wahrscheinlich dem N-Terminus von Bruchpilot entspricht. Immuno-elektronenmikroskopische Untersuchung larvaler Nerven der *Srpk79D*<sup>IV</sup> Nullmutante unter Verwendung des BRP<sup>N-Term</sup>-Antikörpers könnte Aufschluss darüber geben, ob sich der N-Terminus von Bruchpilot tatsächlich im Zentrum der elektronendichten Strukturen befindet, was wahrscheinlich erscheint. Möglicherweise ist die N-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne von Bruchpilot, welche in einem Yeast two-hybrid Assay Interaktion mit der C-terminalen Domäne von Cacophony zeigte (Fouquet et al., 2009), sehr reaktiv und wird in wildtypischen Fliegen durch einen bisher unbekanntem Faktor maskiert, wohingegen in den *Srpk79D* Mutanten die N-Termini der einzelnen Bruchpilot-Moleküle miteinander interagieren. Die

Vorstellung von einem mit Bruchpilot ko-transportierten Faktor, der die Zusammenlagerung von BRP zu den sehr großen und hoch komplexen elektronendichten Strukturen im Wildtyp verhindert, wird an anderer Stelle eingehend diskutiert.

In den Ultradünnschnitten larvaler Nerven der *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutante waren in unmittelbarer Nähe der elektronendichten Komplexe BRP-positive, klare Vesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 20nm zu finden (Abbildung 3 und 4 in Ergebnisse). Das könnte bedeuten, dass Bruchpilot in speziellen Vesikeln entlang des Axons zu den Aktiven Zonen der Boutons transportiert wird. Zum Zusammenbau präsynaptischer Aktiver Zonen in Säugern existieren zwei unterschiedliche Theorien, die sich aber nicht grundsätzlich gegenseitig ausschließen. Zum einen sind elektronendichte Vesikel ('Dense Core Vesicle', DCV) mit einem Durchmesser von circa 80nm als Transportvesikel für die Aktive Zone Proteine Piccolo und Bassoon beschrieben worden (Zhai et al., 2001; Ziv und Garner, 2001; Garner et al., 2002; Shapira et al., 2003; Dresbach et al., 2006), die auch als Piccolo/Bassoon-Transport-Vesikel, kurz PTV, bezeichnet werden. Zum anderen sollen die Vorläufer Aktiver Zonen, sogenannte Prototerminals, bereits vorgeformt zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden (Kraszewski et al., 1995; Prokop et al., 1996; Ahmari et al., 2000; Roos und Kelly, 2000; Matteoli et al., 2004; Zhen und Jin, 2004; Tao-Cheng, 2007). Evidenz gibt es für beide Annahmen. Die erste Theorie wird durch Experimente gestützt, bei denen durch Immuno-Isolierung von Piccolo und Bassoon aus embryonalen Rattengehirnen mit Hilfe von Beads, die jeweils mit Antikörpern gegen diese Proteine beschichtet waren, und anschließende Elektronenmikroskopie elektronendichte Vesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 80nm identifiziert wurden. Durch Immuno-Elektronenmikroskopie konnten Piccolo und Bassoon auf diesen Vesikeln lokalisiert werden. Diese Vesikel wurden auch neben Golgi-Membranstackeln und entlang von Mikrotubuli gefunden, woraus die Vermutung entstand, dass die PTVs durch Abschnürung aus dem Golgi-Apparat entstehen und durch einen aktiven Mikrotubuli-basierten Transport-Mechanismus zu den Aktiven Zonen befördert werden. Das durch Immuno-Isolation gewonnene Präzipitat wurde durch Western Blot auf das Vorhandensein von Komponenten Aktiver Zonen und synaptischer Vesikel (SV) hin untersucht. Mit den Piccolo- oder Bassoon-Antikörper-beschichteten Beads wurden in dem reziproken Experiment neben den Gerüst-Proteinen Piccolo und Bassoon auch das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül N-Cadherin, die synaptischen t-SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP-25 und Rab3 präzipitiert. SV-Proteine wie Synaptophysin, Synaptotagmin, Synaptobrevin/VAMP und der GABA-Transporter konnten nicht nachgewiesen werden. Stattdessen war der Nachweis von Chromogranin B, einem Marker für elektronendichte Vesikel, positiv. In Immunofluoreszenz-Studien wurde ein hoher Grad an Ko-Lokalisation von Piccolo mit Bassoon, aber nur teilweise mit N-Cadherin und Chromogranin B, und sehr wenig mit Synaptotagmin und VAMP gefunden. Zur

Rolle der PTVs bei der Errichtung präsynaptischer Aktiver Zonen wurde spekuliert, dass bei Kontakt mit einer postsynaptischen Zelle durch die Anwesenheit des Zell-Adhäsionsmoleküls N-Cadherin eine stabile trans-synaptische Zell-Zell-Adhäsion aufgebaut und dadurch die nachfolgende Lokalisation postsynaptischer Strukturproteine und Neurotransmitter-Rezeptoren erleichtert würde. Gleichzeitig würde die Insertion der CAZ-Proteine Piccolo und Bassoon, sowie der Komponenten der Exocytose-Maschinerie wie Syntaxin und SNAP-25 schnell zu einer funktionellen Synapse führen. Angenommen, der elektronendichte Kern der PTVs enthält Neuropeptide und weitere neurotrophe Faktoren, so könnten PTVs eine direkte Rolle bei der Differenzierung der PSD spielen (Zhai et al., 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch Proteine wie das Syntaxin bindende Protein Munc18, das Phorbol ester bindende Protein Munc13, die GTPase Rab3a/c, sowie das Rab3a/c-Effektorprotein RIM ('Rab3 interacting molecule') mit den PTVs assoziiert sind, denn alle vier Moleküle wurden in Western Blots von mit Piccolo-Antikörpern beschichteten Beads detektiert. Von diesen vier Proteinen ist bekannt, dass sie die Exocytose synaptischer Vesikel regulieren. Immuno-Isolierung mit Hilfe derselben Beads und anschließende Immuno-Elektronenmikroskopie belegte, dass die elektronendichten PTVs außer Piccolo und Bassoon auch RIM und Munc18 enthalten. Zusätzlich konnte wiederum in Western Blots nachgewiesen werden, dass auch die  $\alpha$ 1-Kern- und die  $\beta$ 1-Hilfs-Untereinheit des Calcium-Kanals vom N-Typ mit Piccolo-Antikörpern ko-immunopräzipitiert wurde. Das SV-Protein Synaptophysin wurde dagegen nicht gefunden. Immunofluoreszenz-Färbungen ergaben weitgehende Ko-Lokalisation von Piccolo mit RIM und Munc18, aber schwächere Ko-Lokalisation mit Rab3a. Laut den Autoren zeigen Piccolo und Synaptophysin ein nicht überlappendes Färbemuster mit weniger als 5% Ko-Lokalisation, was bei Betrachtung der Abbildung nicht glaubhaft erscheint, denn in der Überlagerung sind viele Regionen zu sehen, in denen eindeutig Ko-Lokalisation vorliegt (siehe Abbildung 2A-C in Shapira et al., 2003). Möglicherweise liegen in diesem Bereich DCVs und synaptische Vesikel nah beieinander, sind aber nicht mechanisch aneinander gekoppelt, sodass durch Immuno-Isolierung nur die DCVs angereichert werden, nicht aber die SVs, was zum beobachteten Unterschied zwischen Western Blot-Analysen und Immunofluoreszenz-Färbungen führt. Weiterhin exprimierten die Autoren GFP-getagtes Bassoon in kultivierten Neuronen des Hippocampus und beobachteten in Zeitraffer-Aufnahmen drei Populationen von GFP-Bassoon-Punkten mit unterschiedlichen Mobilitäts-Eigenschaften: zum einen sehr helle, stationäre Punkte, die synaptische Bassoon-Cluster darstellen; zum zweiten sehr mobile, blassere, nicht-synaptische Punkte, die sich mit einer Maximalgeschwindigkeit von mehr als 0.35  $\mu\text{m/s}$  fortbewegten; und drittens intermediäre Punkte, deren maximale Geschwindigkeit bei ungefähr 0.1  $\mu\text{m/s}$  lag. Die mobilen GFP-Bassoon-Punkte bewegten sich in beide Richtungen, stoppten manchmal, zerfielen gelegentlich in kleinere Punkte

oder vereinigten sich zu weniger mobilen, größeren Punkten. Quantitative immunohistochemische Analysen des Bassoon- und Piccolo-Gehalts dieser Punkte verglichen mit dem von Aktiven Zonen führte zu der Hypothese, präsynaptische Aktive Zonen entstünden durch Fusion von zwei bis drei PTVs, wodurch gewährleistet werden soll, dass Aktive Zonen ein komplettes Set an essentiellen Aktive Zone Molekülen erhalten, da möglicherweise nicht alle PTVs darüber verfügen. Auch wenn PTVs eindeutig nachgewiesen werden konnten (Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003; Dresbach et al., 2006), könnte die Beobachtung unterschiedlich mobiler Bassoon-Cluster, deren Größe sich ändert, ein Hinweis darauf sein, dass Aktive Zonen bereits auf dem Weg zu ihrem Zielort vorgefertigt werden, um im Bedarfsfall sehr schnell eine funktionelle Aktive Zone bilden zu können, wie die zweite Theorie postuliert (Tao-Cheng, 2007), denn nach einem initialen axodendritischen Kontakt wurden bereits nach 30 Minuten neue präsynaptische Boutons beobachtet, während postsynaptische Proteine wie SAP90/PSD-95 und Glutamat-Rezeptoren weitere 45 Minuten später gefunden wurden. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass der Zusammenbau von Synapsen in einem Zeitraum von ein bis zwei Stunden nach dem ersten Kontakt erfolgt, und dass die präsynaptische Differenzierung der postsynaptischen Differenzierung vorausgeht (Vardinon Friedman et al., 2000). Die Frage, ob der Kontakt eines Axons mit einem Dendriten ein notwendiges induktives Signal für die Bildung der funktionellen präsynaptischen Maschinerie zur Vesikelfusion darstellt, wird kontrovers diskutiert. Auch Shapira et al. (2003) räumen ein, dass die durchschnittliche Größe einzelner PTVs von 80 nm unterhalb der Auflösungsgrenze der konventionellen Lichtmikroskopie liegt, sodass die von ihnen beobachteten GFP-Bassoon-Punkte Cluster mehrerer PTVs darstellen könnten. Wie Krueger et al. (2003) durch Immunohistochemie zeigten, haben die Axone von Neuronen des Hippocampus in Kultur viele funktionelle präsynaptische Spezialisierungen ohne postsynaptische Gegenstücke. Diese als verwaiste Fusionsstellen bezeichneten Cluster fusionieren entweder mit bereits vorhandenen Synapsen oder bilden neue Aktive Zonen auf Dendriten (Krueger et al., 2003). Ultrastruktur-Analysen von Kulturen drei bis sechs Tage alter Neuronen des Hippocampus embryonaler Rattengehirne führten zur Entdeckung sogenannter Multi-Vesikel Transport-Aggregate, die positiv mit Antikörpern gegen Proteine der Aktiven Zone als auch synaptischer Vesikel gefärbt werden konnten. Diese Aggregate, die elektronendichtes Material enthielten und von einer Mischung aus elektronendichten und SV-artigen kleinen klaren Vesikeln umgeben waren, zeigten Immunoreaktivität für die beiden CAZ-Proteine Bassoon und Piccolo, außerdem für die drei SV-Membranproteine VAMP, SV2 und Synaptotagmin, sowie das SV-assoziierte Protein Synapsin I. Dagegen konnte SNAP-25 als Komponente des SNARE-Komplexes nicht als Bestandteil der DCVs in den Multi-Vesikel Transport-Aggregaten nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Färbungsintensitäten von Bassoon

und Piccolo einzelner Aggregate ergab ähnliche Werte. Quantitative Vergleiche der Ausmaße sich entwickelnder bzw. reifer Aktiver Zonen mit der durchschnittlichen Größe der Aggregate lassen vermuten, dass ein oder wenige dieser Aggregate genügend Bassoon und Piccolo zur Bildung einer AZ zur Verfügung stellen (Tao-Cheng, 2007). Studien an kultivierten *Drosophila*-Neuronen embryonalen und pupalen Ursprungs zeigten, dass Ausläufer dieser Zellen ebenfalls präsynaptische Spezialisierungen bilden, obwohl es ultrastrukturell keinen Hinweis auf postsynaptische Spezialisierungen, wie sie für reife Synapsen charakteristisch sind, gab (Küppers-Munther et al., 2004; Oh et al., 2007). Die präsynaptischen Spezialisierungen der Neuriten in Zellkultur (vergleiche Abbildung 5A aus Oh et al., 2008) ähneln den kleineren fusionierten T-Bars, die in der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante entlang larvaler Axone gefunden werden (Nieratschker et al., 2009). Diese präsynaptischen Spezialisierungen spiegeln damit offensichtlich den Normalzustand wider, da die Kulturen aus Puppen des Wildtyp-Stammes *CantonS* angelegt wurden. Diese Ergebnisse sprechen sehr dafür, dass auch in *Drosophila melanogaster* die Bestandteile Aktiver Zonen bereits vor dem Kontakt mit einer postsynaptischen Zelle teilweise zusammengebaut werden, und letztendlich dieser Kontakt zur Verankerung an der Plasmamembran und zur Reifung der Aktiven Zone führt. Einige Resultate sprechen für diese Hypothese. Zum einen wurden in Immunofluoreszenzfärbungen gleichmäßige Bruchpilot-Punkte in wildtypischen larvalen Nerven gefunden. Da einzelne Vesikel bei dieser Auflösung nicht erkennbar wären (Shapira et al., 2003), könnten diese Punkte Vorläufer Aktiver Zonen sein. Diese Annahme wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gestützt, in denen auch in wildtypischen Nerven elektronendichte Strukturen gefunden wurden, die sich allerdings in Anzahl und Komplexität von den Bruchpilot-Agglomeraten der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante unterscheiden (Nieratschker et al., 2009). Die elektronendichten Strukturen sind von unterschiedlich großen klaren und teilweise von elektronendichten Vesikeln umgeben. Die Tatsache, dass diese mit den Agglomeraten assoziierten klaren Vesikel nicht mit Antikörpern gegen SV-Proteine wie CSP, Synapsin, Synaptobrevin oder Synaptotagmin gefärbt werden konnten (Nieratschker et al., 2009), könnte zwei Ursachen haben. Einerseits könnte es sich bei diesen Vesikeln um unreife Vesikel handeln. Andererseits könnten synaptische Vesikel nur einen Bruchteil der Vesikel des Clusters ausmachen, sodass diese geringe Färbung im Fluoreszenzmikroskop nicht zu erkennen wäre. Um sicher zu gehen, müssten die Färbungen auf elektronenmikroskopischer Ebene wiederholt werden. Aufgrund der Färbungen mit den oben genannten Antikörpern schied eine generelle Störung der axonalen Transportmaschinerie als Ursache für den Phänotyp der BRP-Akkumulation aus, denn in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Synaptotagmin und CSP in Axonen von Mutanten akkumulieren, von denen bekannt ist, dass sie den axonalen Transport beeinträchtigen (Hurd und Saxton, 1996; Gindhart et al., 1998;

Bowman et al., 1999; Martin et al., 1999; Gindhart et al., 2003). Weitere Antikörper gegen das SNARE-Protein Syntaxin, die CAZ-Proteine DLiprin- $\alpha$  und DSyd-1, sowie die kleine GTPase Rab3 färbten die Bruchpilot-Agglomerate ebenfalls nicht (Schubert, in Vorbereitung). Mögliche Erklärungen wären, dass der Transport von Proteinen des SNARE-Komplexes und anderer Komponenten der Aktiven Zone entweder in Bruchpilot-unabhängigen Vesikeln erfolgt, die nicht Bestandteil der Agglomerate sind, oder dass auch in diesem Fall die Auflösung des Mikroskops der limitierende Faktor ist, sodass elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Klärung dieser Frage nötig wären.

In Säugern sind 'Dense Core Vesicles' (DCVs) als Transport-Vesikel für die CAZ-Proteine Piccolo und Bassoon beschrieben worden (Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003). Da in *Drosophila melanogaster* keine Homologe für diese beiden Proteine existieren, und Bruchpilot das Homolog des Vertebraten-Proteins CAST/ERC ist (Kittel et al., 2006), über dessen Transport zu den Aktiven Zonen in Vertebraten nichts bekannt ist, können nicht zwingend Parallelen zwischen Bruchpilot und Piccolo/Bassoon gezogen werden. Allerdings wird spekuliert, dass die extensiven coiled-coil-Domänen im C-terminalen Bereich von BRP, die in CAST/ERC fehlen, funktionell homolog zu Piccolo und/oder Bassoon sein könnten (Wagh et al., 2006). Wie Ultradünnschnitte larvaler Nerven der *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutante von *Drosophila melanogaster* zeigten, sind BRP-immunoreaktive klare Vesikel mit den Agglomeraten assoziiert, sodass anzunehmen ist, dass sich die Transportvesikel für Bruchpilot in Bezug auf den Proteingehalt von den PTVs unterscheiden. Welche Proteine in den DCVs von *Drosophila melanogaster* enthalten sind, ist nicht bekannt. Möglicherweise gibt es weitere Komponenten Aktiver Zonen, die noch nicht entdeckt worden sind.

Die bekannten CAZ-Proteine DLiprin- $\alpha$  und DSyd-1 konnten mit Hilfe der STED-Mikroskopie in einem Subkompartiment lokalisiert werden, das den Kern der Aktiven Zone umgibt. Dabei wurden jeweils zwischen ein oder zwei DLiprin- $\alpha$ - und DSyd-1-Cluster bei kleinen AZs bis hin zu vier oder fünf Cluster bei ausgereiften AZs gefunden (Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010). Durch *in vivo* Imaging larvaler NMJs über einen Zeitraum von 12 Stunden war es möglich, den zeitlichen Ablauf der Ankunft der präsynaptischen Proteine DLiprin- $\alpha$ , DSyd-1 und Bruchpilot an sich entwickelnden AZs zu ermitteln. DLiprin- $\alpha$  und DSyd-1 erreichten die Präsynapse etwa zur gleichen Zeit, während ihre Ankunft der von Bruchpilot stets vorausging. Das könnte bedeuten, dass DLiprin- $\alpha$  und DSyd-1 unabhängig von Bruchpilot zu den Aktiven Zonen transportiert werden, und daher keine Färbung der Agglomerate in der *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutante mit Antikörpern gegen diese beiden Proteine zu erwarten ist. Dennoch identifizierte ein Yeast two-hybrid Assay DSyd-1 als Bindungspartner von Bruchpilot. Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre es denkbar, dass DLiprin- $\alpha$  und DSyd-1 zukünftige präsynaptische Stellen markieren, wo zu einem späteren

Zeitpunkt AZs durch Akkumulation von BRP und Calcium-Kanälen entstehen. Die physikalische Bindung zwischen DSyd-1 und BRP könnte dann auf die AZ beschränkt sein. Während Einzelmutanten für *dsyd-1* oder *dliprin-α* lebensfähig waren, verursachte die *dliprin-α; dsyd-1*-Doppelmutation embryonale Letalität. *dsyd-1*-Mutanten bilden weniger Boutons mit weniger Aktiven Zonen aus, wobei die verbleibenden AZs oft groß und mißgebildet waren. Außerdem führt die Mutation des *dsyd-1*-Gens zu elektronendichten BRP-Akkumulationen in Boutons und Axonen und zu einem erhöhten Gehalt an Glutamat-Rezeptoren an den PSDs durch exzessive Anreicherung der DGluRIIA-Untereinheit. DSyd-1 wird zum einen für die korrekte Zielsteuerung von DLiprin-α zu den AZs benötigt, denn in Abwesenheit von DSyd-1 ist DLiprin-α ungleichmäßig an den NMJ-Terminals verteilt, zum anderen steuert es die Bildung der postsynaptischen Spezialisierungen, möglicherweise durch die Lokalisierung eines Adhäsionsproteins an der Aktiven Zone, welches seinerseits durch trans-synaptische Interaktionen für den Einbau von Glutamat-Rezeptoren in die PSD sorgt (Owald et al., 2010).

Anders als die Mutationen in den *dsyd-1* und *dliprin-α*-Genen führt die Mutation des *SrpK79D*-Gens nicht zu morphologischen Veränderungen der neuromuskulären Synapsen oder ihrer Aktiven Zonen. Weder war in der Anzahl an Boutons oder Aktiven Zonen in der *SrpK79D<sup>FN</sup>* Nullmutante im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle ein signifikanter Unterschied feststellbar, noch war die Verteilung oder die Expressionsstärke des Bruchpilot-Proteins an den präsynaptischen Aktiven Zonen larvaler Motoneurone deutlich verändert. In Übereinstimmung mit dem weitgehend normalen Erscheinungsbild des Nervensystems der *SrpK79D<sup>FN</sup>* Nullmutante war die synaptische Transmission an der neuromuskulären Synapse intakt. Amplitude und Frequenz der Mini-Aktionspotentiale ('miniature excitatory junction potential', mEJPs), welche durch spontane Fusionsereignisse eines einzelnen Vesikels entstehen, als auch Amplitude und Anzahl fusionierter Vesikel eines ausgelösten Potentials ('evoked excitatory junction potential', eEJPs) waren, verglichen mit der Wildtyp-Kontrolle, nicht verändert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Akkumulation des Bruchpilot-Proteins in den larvalen Nerven nicht zu größeren Defekten in der Funktion der präsynaptischen Aktiven Zone und zu einer Störung der synaptischen Übertragung an der neuromuskulären Synapse führt (Bucher, 2008; Nieratschker et al., 2009). Das dürfte nicht zuletzt daran liegen, dass trotz der axonalen Akkumulation genügend Bruchpilot-Protein an die Aktiven Zonen transportiert wird, um T-Bars zu bilden und seine Funktion der lokalen Konzentration von Calcium-Kanälen und als Andockstation für synaptische Vesikel zu erfüllen. Eine Quantifizierung der Menge an Bruchpilot an den Aktiven Zonen erfolgte allerdings nicht. Die gleichzeitige Charakterisierung eines anderen mutanten Allels des *SrpK79D*-Gens – *SrpK79D<sup>ATC</sup>* ('air traffic controller') genannt – ergab, dass diese Mutation, bei der es sich um ein P-Element in Intron 8 handelt, wovon alle vier Transkripte

betroffen sind, zu sehr ähnlichen Akkumulationen von Bruchpilot in larvalen Nerven führt (Johnson et al., 2009). Die Autoren berichten weiterhin von einer 30 prozentigen Reduktion der Bruchpilot-Immunofluoreszenz an den neuromuskulären AZs homozygoter *Srpk79D<sup>ATC</sup>*-Mutanten. Die Frage der Mobilität solcher Agglomerate in Axonen in Abhängigkeit von ihrer Größe wurde durch *in vivo* Imaging an larvalen Nerven bei Bruchpilot-Überexpression untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass kleinere und mittlere Aggregate mobil und sehr große stationär sind (Schubert, in Vorbereitung). Auch wenn die Situation der Bruchpilot-Überexpression von der bei Mutation des *Srpk79D*-Gens abweicht, und bisher die Ultrastruktur der Agglomerate, die bei Überexpression von Bruchpilot in den larvalen Nerven entstehen, nicht aufgeklärt wurde, so könnte eine Transport-Blockade sehr großer Aggregate doch die Reduktion des Bruchpilot-Immunofluoreszenz-Signals an den AZs bei *Srpk79D*-Genmutation erklären.

Die Entstehung einer neuromuskulären Synapse läuft in mehreren, unterschiedlich regulierten Schritten ab. Zunächst kommt es zum Auswachsen der Axone vom Zellkörper und dann zur Ansteuerung des Zielorgans, in diesem Fall des Muskels. Daran schließt sich der Prozess der präsynaptischen Reifung an, gefolgt von der Bildung postsynaptischer Spezialisierungen. Da Synapsen oft weit entfernt vom Zellkörper liegen, ist ihre Funktion abhängig vom regulierten Transport aller benötigten Komponenten entlang von Mikrotubuli und Aktinfilamenten. Motorproteine wie die Kinesine vermitteln den anterograden, und der Dynein/Dynactin-Komplex den retrograden Transport über weite Entfernungen. Verschiedene Myosine dagegen organisieren Transporte über kurze Strecken entlang von Aktinfilamenten (Sharp et al., 2000; Kamal und Goldstein, 2002; Chevalier-Larsen und Holzbaur, 2006; Hirokawa und Noda, 2008; Cai und Sheng, 2009). Mehr und mehr wird deutlich, dass Defizite im axonalen Transport zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beitragen (Chevalier-Larsen und Holzbaur, 2006). In *Drosophila melanogaster* konnten Mutationen im Gen *immaculate connections (imac)* identifiziert werden, die dazu führen, dass sich keine synaptischen Boutons differenzieren, obwohl die Motoneurone ordnungsgemäß auswachsen und den Muskel erreichen. Innerhalb des Zielgebiets verbleiben die Axone als dünne Ausläufer mit nur wenigen Aktiven Zonen. *Imac* kodiert ein Mitglied der Kinesin-3-Familie und ist essentiell für den anterograden Transport präsynaptischer Komponenten (Pack-Chung et al., 2007). In Säuger-Zellkultur konnte eine direkte Interaktion des CAZ-Proteins Bassoon mit der leichten Kette von Dynein ('dynein light chain', DLC) nachgewiesen werden. Daher wirkt Bassoon als Cargo-Adaptor für den retrograden Transport. Wird die Bassoon-DLC-Interaktion unterbunden, kommt es zu einem gestörten Transport von Bassoon in Neuronen, was die Verteilung von Bassoon und Piccolo an Synapsen beeinträchtigt (Fejtova et al., 2009). Beide genannten Phänotypen, zum einen das Ausbleiben der Bildung synaptischer Boutons im Falle von

*imac*, zum anderen die Fehlverteilung von Proteinen der CAZ bei beeinträchtigter Interaktion von Bassoon mit Motorproteinen, basieren auf einer Störung des axonalen Transports von Komponenten, die am Aufbau Aktiver Zonen maßgeblich beteiligt sind. Die Tatsache, dass trotz Mutation im *Srpk79D*-Gen synaptische Differenzierung stattfindet, ist ein weiterer Beleg dafür, dass die bei Ausfall der SRPK79D gebildeten BRP-Agglomerate nicht durch eine Störung im axonalen Transport zustande kommen. Als Energielieferant spielen auch Mitochondrien durch die Produktion von ATP bei der präsynaptischen Differenzierung eine wichtige Rolle. Der Aufbau des F-Aktin Cytoskeletts, welches als Schiene für die Auffüllung des 'Readily releasable pool' (RRP) mit synaptischen Vesikeln aus dem 'Reserve pool' (RP) über das Motorprotein Myosin dient, ist abhängig von der lokalen Bereitstellung von Energie in Form von ATP durch die in den präsynaptischen Nervenendigungen konzentrierten Mitochondrien. Daher korreliert ihre Dichte direkt mit hoher metabolischer Aktivität (Lee und Peng, 2008; Cai und Sheng, 2009). Entlang von Axonen werden Mitochondrien bidirektionell transportiert. Das Fehlen von Mitochondrien in Axon-Terminals von *Drosophila melanogaster* führt zu einer gestörten synaptischen Transmission. Durch Experimente mit dem Farbstoff MitoTracker®Green, der spezifisch in Mitochondrien eindringt und dort akkumuliert, konnte ein axonaler Transportdefekt dieser Organellen ausgeschlossen werden, da sie in der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante wie im Wildtyp normal transportiert werden (Schubert, in Vorbereitung).

Bisher ist nicht bekannt, wie die  $\alpha 1$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calcium-Kanals, die vom Gen *cacophony* (*cac*) kodiert wird (Kawasaki et al., 2004), zu den AZs transportiert wird. Da es keinen Antikörper gegen Cacophony gibt, müsste die Fliegenlinie mit dem *UAS-cacophony-GFP*-Konstrukt in den Hintergrund der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutation gebracht werden, um untersuchen zu können, ob diese Untereinheit eventuell in den Bruchpilot-Agglomeraten der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante vorkommt.

Obwohl die Überexpression von Bruchpilot ebenfalls die Akkumulation des Proteins in larvalen Nerven zur Folge hat (Nieratschker et al., 2009), ist eine Überexpression von Bruchpilot in den *Srpk79D* Mutanten nicht die Ursache für diesen Phänotyp. In Western Blots von Köpfen adulter Fliegen und larvaler Gehirne war auf Protein-Ebene kein deutlicher Mengen-Unterschied feststellbar. Semiquantitative PCRs und Real-Time PCR belegten weiterhin, dass die Menge an gebildetem *brp*-Transkript nicht von der wildtypischen Situation abweicht (Schubert, in Vorbereitung). Für Bruchpilot werden in der Flybase fünf verschiedene Isoformen vorhergesagt. Um zu überprüfen, ob in der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante eventuell ein Defekt im Spleißen der *brp*-mRNA vorliegt, wurde die mRNA aus wildtypischen und mutanten Fliegen gewonnen, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, und diese anschließend mit verschiedenen

Primer-Kombinationen auf das Vorhandensein der einzelnen Transkripte untersucht, wobei auch diese Analyse keine Abweichung der mutanten von den wildtypischen Gegebenheiten hervorbrachte (Maicher, 2009). Drei weitere synaptische Proteine wurden in Western Blots auf Vorhandensein und entsprechende Expressionsstärke einzelner Isoformen getestet. Für das Cystein String Protein (CSP) sind in der Flybase drei, für Synapsin fünf und für Sap47 acht Isoformen annotiert, weswegen sie für dieses Experiment gewählt wurden. Für keines der genannten synaptischen Proteine war Variabilität bezüglich der Expression bestimmter Isoformen zu beobachten, sodass davon auszugehen ist, dass das Fehlen der SRPK79D nicht generell einen neuronalen Spleißdefekt zur Folge hat. Ausgeschlossen werden konnte auch, dass die ektopische Überexpression eines präsynaptischen Proteins generell zu dessen Akkumulation während des Transports entlang des Axons führt. So wurden bei Überexpression der Proteine Synapsin und Sap47 im gesamten Nervensystem durch den panneuronalen Treiber *elav-Gal4* keine derartigen Agglomerate der entsprechenden Proteine beobachtet (Schubert, in Vorbereitung), wie sie bei Überexpression von Bruchpilot oder bei Ausfall der SR Proteinkinase 79D entstehen. Das ist erneut ein Hinweis, dass die Agglomerat-Bildung in den *Srpk79D* Mutanten nicht auf bloße Überexpression des Bruchpilot-Proteins zurückzuführen ist, was ja durch die Western Blot Analysen untermauert wird.

#### 4.2 Die SR Proteinkinase 79D von *Drosophila melanogaster*

Die SRPK79D von *Drosophila melanogaster* konnte durch BLAST-Analysen der evolutionär hoch konservierten Familie der für SR-Proteine spezifischen Kinasen – kurz SRPKs – zugeordnet werden (Nieratschker 2008; Nieratschker et al., 2009). Gemeinsames Charakteristikum dieser Familie ist die zweigeteilte, durch eine Spacer-Region variabler Länge unterbrochene Kinasedomäne (Takeuchi und Yanagida, 1993; Gui et al., 1994a; Kuroyanagi et al., 1998; Tang et al., 1998; Wang et al., 1999; Siebel et al., 1999; Tang et al., 2000; Tang et al., 2007; Lukasiewicz et al., 2007). Wie Ding et al. (2006) experimentell zeigen konnten, ist dieser Spacer für die Lokalisation der Kinase im Cytoplasma notwendig, denn seine Entfernung aus SRPK1 bewirkte bei gleichbleibender Kinaseaktivität die Translokation der Kinase in den Zellkern. Um die endogene Expression der SRPK79D untersuchen zu können, wurden bereits in früheren Arbeiten Antikörper in Meerschweinchen generiert, wobei zur Immunisierung der Tiere nur die in Bakterien exprimierte und aufgereinigte Peptidsequenz des ersten beziehungsweise dritten Exon des *Srpk79D*-Gens verwendet wurden (Bloch, 2007; Nieratschker, 2008). Die resultierenden Antikörper sollten daher die Isoformen aufgrund ihres unterschiedlichen N-Terminus detektieren. Wie sich herausstellte, ist

mit Hilfe dieser Antikörper sowohl eine Anreicherung der Kinase-Isoformen durch Immunopräzipitation, als auch eine Detektion überexprimierter Isoformen *in vivo* möglich, nicht jedoch die Lokalisation der endogenen Kinase-Isoformen, da bei Immun-Färbung mit den entsprechenden Antikörpern kein Unterschied im Färbungsmuster des larvalen Nervensystems zwischen Wildtyp und *Srpk79D<sup>ΔN</sup>* Nullmutante zu erkennen ist (Bloch, 2007; Nieratschker, 2008). Aus diesem Grund wurden Färbungen mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper SRPK (A-17) durchgeführt. Dieser polyklonale Antikörper ist gegen ein Peptid einer internen Region der SRPK1 menschlichen Ursprungs gerichtet. Das 15 bis 25 Aminosäuren lange Epitop liegt zwischen den Aminosäuren 540 und 590, also im Bereich der hoch konservierten Kinasedomäne. Wie sich zeigte, ist dieser Antikörper in immunohistochemischen Färbungen weder in der Lage, die endogene SRPK79D von *Drosophila melanogaster*, noch einzeln überexprimierte SRPK79D-Isoformen zu erkennen. Dagegen war mit Hilfe der gegen die N-terminalen, nicht überlappenden Regionen der SRPK79D-Isoformen gerichteten Antikörper, sowie einem anti-GFP-Antikörper gezeigt worden, dass die neuronal überexprimierte, eGFP-gekoppelte SRPK79D-PC-Isoform zum einen homogen verteilt im Perikaryon vorliegt, als auch an die Aktiven Zonen transportiert wird, wo es mit Bruchpilot ko-lokalisiert und damit möglicherweise direkt am Aufbau der Aktiven Zone beteiligt ist oder auch eine strukturelle Funktion ausübt. Für die überexprimierte SRPK79D-PB-eGFP konnte demonstriert werden, dass auch sie im Cytoplasma vorliegt, allerdings beschränkt auf bestimmte Bereiche, und nicht zu den synaptischen Terminals transportiert wird (Nieratschker et al., 2009). Diese Ergebnisse waren mit dem SRPK (A-17)-Antikörper nicht reproduzierbar, weil er die überexprimierten SRPK79D-PB- bzw. -PC-Isoformen weder in den Boutons der neuromuskulären Synapse, noch in den im Ventralganglion liegenden Zellkörpern erkannte. Da es gelegentlich vorkommt, dass ein Antikörper bei einer Anwendung ein Signal liefert, bei einer anderen Methode jedoch nicht funktioniert, wurden außerdem Western Blots mit adulten Fliegenköpfen durchgeführt, doch auch auf diese Art waren nicht einmal die überexprimierten Kinase-Isoformen nachweisbar. Stattdessen wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 43 kDa vom Antikörper SRPK (A-17) erkannt (nicht gezeigt), bei dem es sich nicht um eine der SR Proteinkinasen oder um die LAMMER-Kinase Doa handeln kann, denn für alle genannten Kinasen sind in der Flybase höhere Molekulargewichte vorhergesagt. Die drei annotierten Isoformen der SRPK, die vom Gen CG8174 auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms kodiert werden, haben laut Flybase Molekulargewichte zwischen 68,1 und 85,1 kDa. Das Produkt des auf dem X-Chromosom gelegenen Gens CG8565 soll 90,7 kDa groß sein. Die LAMMER-Kinase Doa wird vom Gen CG1658 auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms kodiert. Die Molekulargewichte der 13 annotierten Polypeptide sollen zwischen 60,2 und 226,7 kDa liegen. Und die vier Isoformen der

SRPK79D des Gens CG11489 auf dem linken Arm des dritten Chromosoms sollen zwischen 84,6 und 94 kDa groß sein. Somit scheiden alle SRPKs von *Drosophila melanogaster* als mögliche Kandidaten aus, und der Antikörper SRPK (A-17) erkennt ein Motiv, das es unter Umständen in einer anderen Kinase gibt, die nicht zur Familie der SRPKs gehört. Jedenfalls eignet er sich nicht zur Detektion der SRPK79D. Die Tatsache, dass mit den spezifischen Antikörpern auch nur die ektopisch exprimierten Isoformen sichtbar gemacht werden können, lässt darauf schließen, dass es im Wildtyp eine nur geringe Anzahl an Molekülen der SRPK79D gibt, die unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Erkenntnisse über die unterschiedliche Lokalisation überexprimierter SRPK79D-Isoformen gibt zwar einen Hinweis auf die mögliche Verteilung der endogenen Kinase-Isoformen, lassen aber nicht automatisch die Schlussfolgerung zu, dass diese sich hundertprozentig ebenso verhalten.

Rescue-Experimente mit transgenen Fliegenlinien zeigten, dass die Expression der SRPK79D-PC- oder -PF-Isoform im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund zur Rettung des Phänotyps der Akkumulation von Bruchpilot in larvalen Nerven ausreicht (Nieratschker, 2008; Nieratschker et al., 2009). Dass ein Rescue auch durch Expression der SRPK79D-PB-Isoform möglich ist, wurde gezeigt und nach Re-Etablierung einer für das Rescue-Konstrukt sowie den *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund homozygoten Ausgangs-Linie verifiziert. Die Tatsache, dass bei Expression der drei bisher getesteten von insgesamt vier SRPK79D-Isoformen der BRP-Phänotyp aufgehoben wird, lässt eine funktionelle Redundanz der einzelnen Isoformen erkennen. Die Frage, ob auch die Expression der SRPK79D-PE-Isoform den Phänotyp der BRP-Agglomerate in larvalen Nerven retten würde, bleibt offen, da das zur Herstellung transgener Fliegenlinien benötigte Konstrukt aus Zeitgründen nicht fertiggestellt werden konnte. Interessant zu klären wäre auch die Frage, in welchem Zellkompartiment die überexprimierte SRPK79D-PE-Isoform zu finden wäre. Darüber kann allerdings nur spekuliert werden. Die Beobachtungen über die unterschiedliche Verteilung der sich im N-Terminus, aber nicht in der zwischen den Untereinheiten der Kinasedomäne gelegenen Spacer-Region unterscheidenden Isoformen SRPK79D-PC und -PB lässt vermuten, dass im Falle der SRPK79D von *Drosophila melanogaster* nicht der Spacer, sondern der N-Terminus für die subzelluläre Lokalisation einzelner Isoformen von entscheidender Bedeutung ist (Nieratschker et al., 2009). Demzufolge dürfte die SRPK79D-PE-Isoform nicht zu den Aktiven Zonen transportiert werden und könnte eventuell auch in diskreten Strukturen im Perikaryon akkumulieren.

Wie durch Immunofluoreszenz-Färbungen gezeigt werden konnte, ko-lokalisiert die SRPK79D-PC-Isoform an den Aktiven Zonen nicht nur mit Bruchpilot (Nieratschker et al., 2009), sondern auch teilweise mit DLiprin- $\alpha$ , DSyd-1 und Rab3 (Schubert, in Vorbereitung). Da alle diese Proteine

entweder strukturell oder funktionell am Aufbau der Aktiven Zone von *Drosophila melanogaster* beteiligt sind (Fouquet et al., 2009; Graf et al., 2009; Oswald et al., 2010), wäre es denkbar, dass auch die SRPK79D in diesen Prozess involviert ist. In *C. elegans* wurde das Protein RSY-1 ('regulator of synaptogenesis-1') als Antagonist präsynaptischer Spezialisierung beschrieben, dessen Verlust zur Bildung zusätzlicher Synapsen und zum Transport überschüssigen synaptischen Materials zu präsynaptischen Stellen führte (Patel und Shen, 2009). Interessanterweise kodiert das zugehörige Gen zwei Isoformen von RSY-1, wobei die aus 589 Aminosäuren bestehende Isoform A eine Prolin-reiche Region, eine 'coiled coil'-Domäne und eine Serin/Arginin-reiche (SR) Domäne besitzt. Diese SR-Domäne enthält zusätzlich mehrere mutmaßliche Kernlokalisationssequenzen ('nuclear localisation sequence', NLS). Der mit nur 517 Aminosäuren kleineren Isoform B fehlt die SR-Domäne, welche durch 22 Aminosäuren mit einer einzigen mutmaßlichen NLS ersetzt ist. Angenommen, es gäbe in *Drosophila melanogaster* einen verwandten Mechanismus, bei dem ein SR-Protein als Ko-Faktor mit Bruchpilot entlang der Axone zu den präsynaptischen Terminals transportiert wird, wäre es theoretisch denkbar, dass die SR Proteinkinase an der Aktiven Zone das SR-Protein phosphoryliert, und somit die in Teilen oder vollständig zusammengebauten Komponenten, in dem Fall die aus Bruchpilot bestehenden T-Bars, freigegeben und durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen an der Aktiven Zone verankert werden. Dieser Ko-Faktor müsste in einem korrekten stöchiometrischen Verhältnis mit BRP vorhanden sein, um die Entstehung der riesigen elektronendichten Strukturen in Axonen zu verhindern. Dieses Verhältnis wäre dann entweder durch BRP-Überexpression oder durch verminderte Expression des unbekanntes Faktors beeinträchtigt. Alternatives Spleißen zur Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits die Expression anderer Gene steuern, ist ein bekannter Mechanismus vor allem bei der Geschlechtsdetermination von *Drosophila melanogaster* (Penalva und Sánchez, 2003). Auf diese Weise wäre es vorstellbar, dass die Mutation des *Srpk79D*-Gens letztendlich die Genexpression des unbekanntes Faktors beeinflusst. Alternativ könnte die Entstehung des hypothetischen Proteins selbst durch alternatives Spleißen geregelt werden.

Für die Theorie des mit Bruchpilot ko-transportierten Faktors sprechen zwei Versuche. Zum einen scheiterten Versuche, die Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven durch simultane Überexpression von BRP und SRPK79D-PC-Isoform zu verhindern (Nieratschker et al., 2009). Umgekehrt ist es auch nicht möglich, die Akkumulation von BRP durch Knock-down des BRP-Proteins mittels RNAi im *Srpk79D<sup>FN</sup>* Null-Hintergrund zu unterbinden, was durch Rekombination des *UAS-RNAi-Brp(C8)*-Konstrukts mit dem *Srpk79D<sup>FN</sup>* Null-Allel auf dem dritten Chromosom und anschließende pan-neuronale *elav-Gal4*-getriebene Expression des RNAi-Konstrukts gegen BRP im *Srpk79D<sup>FN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund gezeigt werden konnte. In beiden Fällen blieben die

Agglomerate bestehen. Die Wiederherstellung des korrekten stöchiometrischen Verhältnisses von BRP zu unbekanntem Faktor kann offensichtlich nicht einfach durch geänderte Expression von BRP oder SRPK79D erreicht werden. Auch wenn die Vorstellung eines ähnlichen Inhibitors plausibel erscheint, ist die Situation der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante anders als bei der *rsy-1*-Mutante von *C. elegans*, da es in *Drosophila melanogaster* nicht zur Bildung zusätzlicher Synapsen kommt, und die vorhandenen Synapsen auch keinen Überschuss an präsynaptischen Proteinen aufweisen. Stattdessen ist das Vorkommen sehr komplexer präsynaptischer Strukturen auf die Axone der larvalen Nerven beschränkt. Wenn es diesen Ko-Faktor gibt, würde das bedeuten, dass der Zusammenbau von Bruchpilot zu einzelnen T-Bars im wildtypischen Axon nicht unkontrolliert verläuft, sondern ähnlich dem Aufbau der T-Bars an der Aktiven Zone ein hoch regulierter molekularer Prozess ist, und dass T-Bars eine vorgegebene Größe erreichen, darüber hinaus aber nicht weiter „wachsen“ können. Bei Mutation des *Srpk79D*-Gens kann der Ko-Faktor übermäßiges Wachstum vorgefertigter Aktiver Zonen aber nicht blockieren und es kommt aus ungeklärter Ursache zu einer Verschmelzung einzelner T-Bars, die dann hoch komplexe Strukturen bilden.

Einer zweiten These zur Erklärung, warum die SRPK79D an den Aktiven Zonen zu finden ist, zufolge könnte der Prozess des Spleißens, von dem angenommen wurde, dass er auf den Zellkern beschränkt ist, auch außerhalb dieses Kompartiments stattfindet. Zahlreiche Arbeiten belegten eine lokale Translation von mRNAs in Axonen von Invertebraten und Vertebraten. Diese lokale Proteinsynthese vermittelt einem Neuron die Fähigkeit, die Ausbildung synaptischer Kontakte als Reaktion auf Aktivierung zu regulieren. So kann ein Neuron ohne Kontrolle des Perikaryons nur diejenigen Verknüpfungen festigen, die Reize wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren empfangen (Piper und Holt, 2004). Denkbar wäre also auch, dass konstitutives und/oder alternatives Spleißen in Axonen und Dendriten stattfindet, wozu die Phosphorylierung von SR-Proteinen durch die SRPK79D nötig wäre. Da in manchen Fällen die SR-Proteine auch nach dem Export aus dem Nukleus mit der mRNA assoziiert bleiben und so die Translation erleichtern (Stamm, 2008), könnte die lokale Aktivierung der SR-Proteine unter Umständen auch für deren Translation notwendig sein. Die lokale Synthese von Proteinen verhilft einem Neuron zu größerer Flexibilität bei der Umgestaltung von Synapsen und spielt daher für die synaptische Plastizität und damit für Lernen und Gedächtnis eine wichtige Rolle (Piper und Holt, 2004). Im Gegensatz zu Synapsin, für das eine 50%ige Reduktion im Vergleich zu Wildtyp-Werten bei Deletion des Gens gezeigt wurde (Michels et al., 2005), scheint die SRPK79D für das assoziative Lernen jedenfalls nicht von Bedeutung zu sein, denn Larven der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante zeigten bei olfaktorischer Konditionierung in einem Zwei-Duft-Paradigma (nach Scherer et al., 2003) im Vergleich zum Wildtyp keine Defizite. In verschiedenen Verhaltens-Assays zeigten adulte Tiere der *Srpk79D*-Mutanten dagegen mehrere

Phänotypen. So war eine signifikant höhere Prozentzahl adulter *Srpk79D<sup>PI</sup>* und *Srpk79D<sup>VN</sup>* Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen im Test nach Benzer et al. (1973) flugunfähig. In vergleichbarer Weise war die spontane Laufaktivität auf einer ebenen Fläche, gemessen an der Anzahl überquerter Linien eines Gitternetzes in einer vorgegebenen Zeit, in den Mutanten signifikant eingeschränkt. Ebenso war die Überlebensrate mutanter Tiere signifikant reduziert verglichen mit wildtypischen Kontrollen. Von den genannten Phänotypen konnten die Flugfähigkeit und die Laufaktivität durch Re-Expression der SRPK79D-PF-Isoform vollständig gerettet werden. Lediglich bei der Überlebensrate war nur ein partieller Rescue zu beobachten (Nieratschker et al., 2009). Da Fliegen mit einem Knock-down des Proteins Bruchpilot durch RNA-Interferenz zu einem hohen Prozentsatz flugunfähig sind (Wagh et al., 2006), woraus sich auch der Name für dieses Protein ableitet, und gleichzeitig die *Srpk79D* Mutanten, die den Phänotyp der BRP-Agglomerat-Bildung in larvalen Nerven zeigen, ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Flugunfähigkeit zeigen, wurden Fliegen mit pan-neuronaler Expression des *UAS-RNAi-Brp(C8)*-Konstrukts im *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutanten-Hintergrund im Flug-Assay nach Benzer et al. (1973) auf ihre Flugfähigkeit getestet. Wie sich herausstellte, gab es keinen additiven Effekt beider Mutationen in Bezug auf den Flug-Phänotyp. Somit sind Bruchpilot und die SR Proteinkinase 79D vermutlich Bestandteile desselben Signalwegs.

### 4.3 SR-Proteine

Die Funktion von SR Proteinkinasen ist die Phosphorylierung von SR-Proteinen (Gui et al., 1994a; Gui et al., 1994b), einer Familie von konservierten Spleißfaktoren (Roth et al., 1991; Zahler et al., 1992; Fu, 1995; Manley und Tacke, 1996). Daher wurde die Expression aller sieben im Genom von *Drosophila melanogaster* identifizierten SR-Proteine (Adams et al., 2000; Mount und Salz, 2000) durch RNAi reduziert, um zu sehen, ob der Knock-down potentieller Zielproteine der SRPK79D zum gleichen Phänotyp der Bildung von Bruchpilot-Agglomeraten in larvalen Nerven führt. Es zeigte sich, dass lediglich die reduzierte Expression des SR-Proteins dASF/SF2 auch zur Akkumulation von Bruchpilot führt (Schubert, in Vorbereitung). Damit ist dieser Spleißfaktor ein mögliches Substrat der SRPK79D. *In vitro* Kinase-Assays hatten bereits zuvor gezeigt, dass sowohl SRPK79D-PC, als auch SRPK79D-PB in der Lage sind, das synthetische Peptid SRPK1tide, das den Aminosäuren 204 bis 218 der RS-Domäne des menschlichen SR-Spleißfaktors ASF-1/SF2 entspricht, zu phosphorylieren (Nieratschker, 2008; Nieratschker et al., 2009).

Knock-down der übrigen sechs SR-Proteine in *Drosophila melanogaster* hatte keinen Phänotyp

hinsichtlich der Verteilung von BRP in larvalen Nerven zur Folge, wobei allerdings die Effektivität des Knock-downs noch nicht überprüft wurde.

In einem Cytotrap Yeast two-hybrid Screen mit der SRPK79D-PB-Isoform wurde Caper (CG11266) als Interaktionspartner identifiziert (Schubert, in Vorbereitung). Laut Flybase enthalten die größeren Isoformen von Caper einige Serin/Arginin-Dipeptide, aber keine RS-Domäne im klassischen Sinn. Somit könnte es sich um ein SR-verwandtes Protein handeln. Den kleineren Isoformen fehlen diese RS-Sequenzen allerdings. Alle Isoformen besitzen aber RNA-Bindungsdomänen ('RNA recognition motif', RRM). Auf diesen Sequenz-Ähnlichkeiten basierend wird als molekulare Funktion mRNA-Bindung vorhergesagt. Außerdem gibt es experimentelle Hinweise, dass das Protein an der Regulation alternativer Spleißvorgänge im Zellkern beteiligt ist. Es wird interessant sein, zu erfahren, welche Interaktionspartner der Cytotrap für die SRPK79D-PC-Isoform hervorbringt. Ist das Substrat der SRPK79D erst einmal identifiziert, können mit diesem Immunoprecipitations-Experimente zur Isolierung der daran gebundenen RNAs durchgeführt werden, wie es bereits für die zwei SR-Proteine dASF und B52 realisiert wurde (Gabut et al., 2007). Diese Analysen ergaben, dass dASF/SF2 mit einer ganzen Reihe von mRNAs interagiert, von denen mehrere Transkripte unter dem Einfluss dieses Spleißfaktors alternativ gespleißt werden. Einige der zugehörigen Gene spielen eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems.

#### 4.4 Neuropeptide

Bruchpilot ist als Protein der Aktiven Zone offenbar nicht nur an der Neurotransmitter-Ausschüttung beteiligt (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006), sondern hat unter Umständen auch Funktionen bei der Ausschüttung von mit Neuropeptiden beladenen Vesikeln. Zumindest ist Bruchpilot in den ersten drei abdominalen Median- und Transvers-Nerven (MeN/TVN) von *Drosophila melanogaster* zu finden, von denen bekannt ist, dass sie die Neurohämäl-Organen beherbergen (Santos et al., 2006). Wie in Immunofluoreszenz-Studien gezeigt werden konnte, kolo-kalisiert Bruchpilot mit den CAPA-Peptiden in den ersten drei abdominalen MeNs/TVNs, die von den zugehörigen gepaarten Va-Neuronen exprimiert werden (Wegener et al., 2006). Unter Verwendung einer *Va-Gal4*-Treiber-Linie konnte eine Ko-Lokalisation von Bruchpilot und membranständigem GFP in den Va-Neuronen demonstriert werden. Die Ko-Lokalisation von CAPA-Peptiden mit GFP (Santos et al., 2006) konnte reproduziert werden. Die spezifische Expression von RNAi-Konstrukten gegen Bruchpilot in den Va-Neuronen durch Kreuzung mit der *Va-Gal4*-Treiber-Linie als Negativ-Kontrolle belegte, dass BRP tatsächlich in den ersten drei

abdominalen MeNs/TVNs vorliegt. Während die Verwendung der *UAS-RNAi-Brp(C8)*-Linie zu einer Reduktion der Größe der BRP-Strukturen in den abdominalen MeNs/TVNs führte, hatte die Kreuzung mit der *UAS-RNAi-Brp(B12)*-Linie einen nahezu kompletten Verlust der BRP-Färbung in diesen Nerven zur Folge. Interessant dabei ist, dass dieser Knock-down von BRP im Median-/Transvers-Nervensystem nicht letal ist, was im Gegensatz zur Letalität bei pan-neuronaler Expression des *UAS-RNAi-Brp(B12)*-Konstrukts durch die Treiber-Linie *elav-Gal4* steht. Möglicherweise ist die Ausschüttung von Neuropeptiden nicht so stark von Bruchpilot abhängig wie die von Neurotransmittern an Aktiven Zonen. Es wäre spannend, durch immuno-elektronenmikroskopische Experimente zu erfahren, wo Bruchpilot in den Median- und Transvers-Nerven lokalisiert ist. In immuno-elektronenmikroskopischen Studien zeigten Santos et al. (2006) mit Antikörpern gegen die CAPA-Peptide, dass große, klare Vesikel mit der Membran in Bereichen erhöhter Dicke und Elektronendichte fusionierten. Vermutlich stellen diese Regionen Aktive Zonen dar, die Proteine der Exocytose-Maschinerie sowie Calcium-Kanäle enthalten. Da in diesen Nerven präsynaptische Strukturen wie T-Bars gänzlich fehlten (Santos et al., 2006), wird es interessant sein, die Organisation von BRP herauszufinden. Möglicherweise bildet BRP in den Median- und Transvers-Nerven die elektronendichte Matrix und koordiniert Calcium-Influx mit Vesikelfusion. Somit gibt es noch viele spannende Fragen zu beantworten.

## 5. Ausblick

Die Aufklärung der Ultrastruktur der in larvalen Nerven der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante auftretenden Bruchpilot-Agglomerate durch Standard-Elektronenmikroskopie ergab, dass es sich dabei um elektronendichte T-Bar-ähnliche Strukturen handelt, die von einer Vielzahl von Vesikeln umgeben sind. Da auf lichtmikroskopischer Ebene keine Färbung der BRP-Akkumulationen mit Antikörpern gegen weitere synaptische Proteine wie Synapsin, Synaptotagmin, Synaptobrevin oder auch Syntaxin sichtbar war (Nieratschker et al., 2009), könnten diese Vesikel, basierend auf den Erkenntnissen aus der Literatur (Tao-Cheng, 2007), durch Immuno-Elektronenmikroskopie mit den Antikörpern gegen diese Proteine näher charakterisiert werden. Die in der Nullmutante für die SRPK79D beobachteten komplexen Strukturen sind in weniger komplexer Form auch im Wildtyp beobachtet worden (Nieratschker et al., 2009), was einen Hinweis darauf gibt, dass auch in *Drosophila* Proteine der Aktiven Zone und synaptischer Vesikel eventuell in einem vorgefertigten Multi-Vesikel-Aggregat transportiert werden, wie bereits für Neurone des Hippocampus embryonaler Rattengehirne in Zellkultur gezeigt wurde (Tao-Cheng, 2007). Die Ultrastruktur wildtypischer larvaler Nerven sollte daher ebenfalls durch Immuno-EM mit den genannten Antikörpern gegen bekannte synaptische Proteine aufgeklärt werden. Alternativ könnte eine Immunopräzipitation mit dem MAK nc82 gegen Bruchpilot durchgeführt werden, und in einem nachfolgenden Western Blot mit Antikörpern auf ko-immunopräzipitierte präsynaptische Proteine getestet werden. Bisher ist nicht bekannt, in welcher Vesikel-Klasse die Cacophony-Untereinheit des Calcium-Kanals von *Drosophila melanogaster* vom Zellkörper zu den präsynaptischen Aktiven Zonen transportiert wird, und ob sie unter Umständen Bestandteil der BRP-Agglomerate in den Axonen der *Srpk79D<sup>VN</sup>* Nullmutante ist. Um dem auf den Grund zu gehen, könnten nach Kombination des *UAS-cacophony-GFP*-Konstrukts mit dem *Srpk79D<sup>VN</sup>* Null-Hintergrund immunohistochemische Doppel-Färbungen mit MAK nc82 und einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper an Larven, die Cacophony-GFP exprimieren, gemacht werden.

Das *Srpk79D*-Gen enthält neben zwei alternativen Transkriptionsstartpunkten ein in beide Transkripte alternativ gespleißtes Exon, was schlussendlich die Expression vier verschiedener Protein-Isoformen erlaubt (Nieratschker et al., 2009). Um die Charakterisierung der einzelnen SRPK79D-Isoformen zu vervollständigen, sollte die Klonierung des Vektors mit der *UAS-Srpk79D-RE*-cDNA zur Herstellung transgener Fliegenlinien beendet werden, damit Rescue-Experimente bezüglich des BRP-Agglomerate-Phänotyps in larvalen Nerven und Überexpressionsstudien zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation der SRPK79D-PE-Isoform durchgeführt werden können.

Anschließende Umklonierung der *Srpk79D-RE*-cDNA, wie auch der *Srpk79D-RF*-cDNA, in einen Zellkultur-Expressionsvektor würde *in vitro* Kinase-Assays erlauben, wie sie schon für die SRPK79D-PB- und PC-Isoformen realisiert wurden (Nieratschker et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit zur funktionellen Differenzierung der einzelnen Isoformen der SR Proteinkinase 79D wäre die Klonierung der *Srpk79D-RE*- und *-RF*-cDNAs in die entsprechenden Vektoren zur Durchführung eines Cytotrap Yeast two-hybrid Screens, wie es bereits für die SRPK79D-PB und -PC-Isoformen umgesetzt wurde (Schubert, in Vorbereitung). Es wäre interessant, zu erfahren, ob es unterschiedliche Interaktionspartner für die verschiedenen Isoformen gibt.

Die verfügbaren Antikörper gegen die sich jeweils im N-Terminus unterscheidenden Isoformen SRPK79D-PB/-PE beziehungsweise SRPK79D-PC/-PF sind in der Lage, die mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems überexprimierten Isoformen in Western Blots und immuno-histochemischen Färbungen zu erkennen (Nieratschker et al., 2009). Dass die endogene SRPK79D-PC/-PF-Isoform von ihrem spezifischen Antikörper erkannt wird, wurde durch ihre Anreicherung mittels IP aus Wildtyp-Fliegen gezeigt (Schubert, in Vorbereitung). Jedoch sind beide Antiseren nicht dafür geeignet, die endogene Kinase in immuno-histochemischen Färbungen nachzuweisen. Die Herstellung neuer Isoform-spezifischer Antikörper oder der Erwerb eines kommerziell produzierten Antikörpers gegen die SRPK79D könnte helfen, die subzelluläre Lokalisation der endogenen Kinase aufzudecken.

Da die *Srpk79D<sup>IV</sup>* Nullmutanten eine reduzierte Lebenserwartung haben (Nieratschker et al., 2009), könnten weiterhin Gehirnschnitte von alten adulten Fliegen angefertigt werden, um im Vergleich zum Wildtyp gegebenenfalls Veränderungen hinsichtlich der Gehirnstruktur zu identifizieren, die darauf hinweisen könnten, dass es zu einer Degeneration von Neuronen mit zunehmendem Alter der Fliegen kommt, die dann den frühen Tod der Mutanten im Vergleich zu wildtypischen Fliegen verursacht.

Die BRP-Strukturen im larvalen abdominalen Median- und Transvers-Nervensystem von *Drosophila melanogaster* wurden mit dem gegen den C-Terminus von Bruchpilot gerichteten monoklonalen Antikörper nc82 detektiert. Zur weiteren Charakterisierung dieser Strukturen könnten zunächst immuno-histochemische Färbungen mit den gegen den N-Terminus beziehungsweise gegen die D2-Domäne von BRP gerichteten Antikörpern gemacht werden. Außerdem würden immuno-elektronenmikroskopische Färbungen helfen, die ultrastrukturelle Organisation von BRP in diesen Nerven zu entschlüsseln.

## 6. Zusammenfassung

Das Gehirn als Organ mit seinen erstaunlichen Fähigkeiten hat die Menschen von jeher fasziniert. Seit langem versuchen sie daher, die Funktionsweise seiner einzelnen Bausteine, der Neurone, zu ergründen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Proteinen identifiziert, die am molekularen Aufbau und der Funktion der Synapsen beteiligt sind. Diese Stellen der Kommunikation zwischen Neuronen besitzen spezialisierte Bereiche – Aktive Zonen (AZs) genannt –, die aus einem hochkomplexen Netzwerk von Proteinen aufgebaut sind und die Maschinerie für den Prozess der Neurotransmitter-Ausschüttung und das Vesikel-Recycling beinhalten. In *Drosophila* ist das Protein Bruchpilot (BRP) ein wichtiger Baustein für die T-förmigen Bänder („T-Bars“) der präsynaptischen Aktiven Zonen. BRP ist notwendig für eine intakte Struktur der Aktiven Zone und eine normale Exocytose von Neurotransmitter-Vesikeln. Auf der Suche nach Mutationen, welche die Verteilung von Bruchpilot im Gewebe beeinträchtigen, wurde eine P-Element-Insertion im Gen *CG11489* an der Position 79D identifiziert, welches eine Kinase kodiert, die einen hohen Grad an Homologie zur Familie der SR Proteinkinasen (SRPKs) von Säugern aufweist. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine evolutionär hoch konservierte zweigeteilte Kinasedomäne aus, die durch eine nicht konservierte Spacer-Sequenz unterbrochen ist. SRPKs phosphorylieren SR-Proteine, die zu einer evolutionär hoch konservierten Familie Serin/Arginin-reicher Spleißfaktoren gehören und konstitutive sowie alternative Spleißprozesse steuern und damit auf post-transkriptioneller Ebene die Genexpression regulieren.

Mutation des *Srpk79D*-Gens durch die P-Element-Insertion (*Srpk79D<sup>P1</sup>*) oder eine Deletion im Gen (*Srpk79D<sup>ΔN</sup>* Nullmutante) führt zu auffälligen BRP-Akkumulationen in larvalen und adulten Nerven. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass diese BRP-Akkumulationen auf Ultrastruktur-Ebene ausgedehnten axonalen Agglomeraten elektronendichter Bänder entsprechen und von klaren Vesikeln umgeben sind. Charakterisierung durch Immuno-Elektronenmikroskopie ergab, dass diese Strukturen BRP-immunoreaktiv sind. Die sie umgebenden BRP-positiven klaren Vesikel könnten sogenannte Piccolo-Transport-Vesikel (PTV) für Komponenten der Aktiven Zonen darstellen. Um die Bildung BRP-enthaltender Agglomerate in Axonen zu verhindern und damit eine intakte Gehirnfunktion zu gewährleisten, scheint die SRPK79D nur auf niedrigem Niveau exprimiert zu werden, da die endogene Kinase mit verschiedenen Antikörpern nicht nachweisbar war. Wie in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, ist die Expression der PB-, PC- oder PF-Isoform der vier möglichen SRPK79D-Varianten, die durch alternativen Transkriptionsstart in Exon eins beziehungsweise drei und alternatives Spleißen von Exon sieben zustande kommen, zur

Rettung des Phänotyps der BRP-Akkumulation im *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutanten-Hintergrund ausreichend. Zur Charakterisierung der Rescue-Eigenschaften der SRPK79D-PE-Isoform wurde mit der Klonierung der cDNA in einen UAS-Vektor begonnen, der aus Zeitgründen leider nicht fertiggestellt werden konnte. Ziel dieses Versuchs war die Herstellung transgener Fliegenlinien zur gezielten Expression dieser Isoform im Nervensystem unter Verwendung des Gal4/UAS-Systems.

Offenbar beruht die Bildung der axonalen BRP-Agglomerate nicht auf einer Überexpression von BRP in den betroffenen Neuronen, denn auch bei reduzierter Expression des BRP-Proteins im *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutanten-Hintergrund entstehen die BRP-Agglomerate. In Köpfen der *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutante ist die Gesamtmenge an Bruchpilot-Protein im Vergleich zum Wildtyp nicht deutlich verändert. Auch die auf Protein-Ebene untersuchte Expression der verschiedenen Isoformen der präsynaptischen Proteine Synapsin, Sap47 und CSP weicht in der *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutante nicht wesentlich von der Wildtyp-Situation ab, sodass sich keine Hinweise auf verändertes Spleißen der entsprechenden prä-mRNAs ergeben. Jedes der sieben bekannten SR-Proteine von *Drosophila* ist ein potentiell Zielprotein der SRPK79D. Knock-down-Experimente für die drei hier untersuchten SR-Proteine SC35, X16/9G8 und B52/SRp55 im gesamten Nervensystem durch RNA-Interferenz zeigten allerdings keinen Effekt auf die Verteilung von BRP im Gewebe.

Die Mutation des *Srpk79D*-Gens führt offenbar nicht zu generellen Defiziten in der Lernfähigkeit der Tiere, denn die *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutanten zeigten in Versuchen zur larvalen olfaktorischen Konditionierung in einem Zwei-Duft-Paradigma keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Hinsichtlich der Flugfähigkeit der Tiere hat die *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutation keinen additiven Effekt zum Knock-down des BRP-Proteins, denn die Doppelmutanten zeigten bei der Bestimmung des Anteils an flugunfähigen Tieren vergleichbare Werte wie die Einzelmutanten, die entweder die Nullmutation im *Srpk79D*-Gen trugen, oder BRP reduziert exprimierten. Vermutlich sind Bruchpilot und die SR Proteinkinase 79D somit Teil desselben Signalwegs.

Durch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen BRP und CAPA-Peptide wurde abschließend entdeckt, dass Bruchpilot auch im Median- und Transvers-Nervensystem (MeN/TVN) von *Drosophila* zu finden ist, welche die Neurohämäl-Organen beherbergen. Aufgabe dieser Organe ist die Speicherung und Ausschüttung von Neuropeptid-Hormonen. Daher ist zu vermuten, dass das BRP-Protein neben Funktionen bei der Neurotransmitter-Exocytose möglicherweise eine Rolle bei der Ausschüttung von Neuropeptiden spielt. Anders als in den Axonen der larvalen Segmental- und Intersegmentalnerven der *Srpk79D<sup>1N</sup>* Nullmutante, die charakteristische BRP-Agglomerate aufweisen, hat die Mutation des *Srpk79D*-Gens in den Axonen der Va-Neurone, die das MeN/TVN-System bilden, keinen sichtbaren Effekt auf die Verteilung von Brp, denn das Muster bei Färbung gegen BRP weist keine deutlichen Veränderungen zum Wildtyp auf.

## 7. Summary

Mankind has always been fascinated by the brain as an organ with astonishing abilities. That's why they are trying for a long time to determine the function of its single elements called neurons. In the recent years a huge number of proteins being involved in the molecular assembly and function of synapses has been identified. These sites of communication between neurons contain specialized regions termed active zones (AZs) which are composed of a highly complex network of proteins comprising the exocytotic machinery for neurotransmitter release and vesicle recycling. In *Drosophila* the Bruchpilot (BRP) protein is an important building block of the T-shaped ribbons („T-bars“) at presynaptic active zones. BRP is required for intact AZ structure and normal evoked neurotransmitter release. By screening for mutations affecting the tissue distribution of Bruchpilot, a P-transposon insertion in the *Srpk* gene at the position 79D has been identified (*Srpk79D*, *CG11489*). This gene codes for a kinase which shows high homology to the mammalian family of serine/arginine protein kinases (SRPKs). Members of this family have an evolutionarily highly conserved bipartite kinase domain in common which is separated by a non-conserved spacer sequence. SRPKs phosphorylate SR proteins, an evolutionarily highly conserved family of serine/arginine-rich splicing factors that control the processes of constitutive and alternative splicing and therefore regulate gene expression at the post-transcriptional level.

Mutation of the *Srpk79D* gene caused by the P-element insertion (*Srpk79D<sup>PI</sup>*) or by a deletion in the gene (*Srpk79D<sup>VN</sup>* null mutant) leads to conspicuous accumulations of BRP in larval and adult axons. This thesis shows that these BRP accumulations at the ultrastructural level correspond to extensive axonal agglomerates of electron-dense ribbons surrounded by clear vesicles. Using immuno electron microscopy, these accumulation were characterized as BRP immuno-reactive structures. Surrounding BRP positive clear vesicles might represent Piccolo transport vesicles (PTV) for active zone components. To prevent the assembly of BRP containing agglomerates in axons and to maintain intact brain function the SRPK79D seems to be expressed only at low levels because the endogenous kinase was not detectable using various antibodies. It was shown in other thesis that the expression of the PB, PC or PF isoform of the four possible SRPK79D variants resulting from two alternative transcription start sites in exon one and three, respectively, and alternative splicing of exon seven is sufficient to rescue the phenotype of BRP accumulation in the *Srpk79D<sup>VN</sup>* null-mutant background. Cloning of the cDNA for the SRPK79D-PE isoform into a UAS vector has been started in order to characterize the ability of this isoform to rescue the BRP-phenotype. Unfortunately, the experiment could not be finished for lack of time. The aim of this experiment

was to establish transgenic fly lines allowing the targeted expression of this isoform in the nervous system using the Gal4/UAS system.

It seems as if the formation of axonal BRP agglomerates is not due to BRP overexpression in the affected neurons as was shown by reduced expression of the BRP protein in the *Srpk79D<sup>VN</sup>* null-mutant background which still leads to BRP agglomerates.

The overall amount of Bruchpilot protein in adult heads of the *Srpk79D<sup>VN</sup>* null mutant is not clearly altered compared to wild type. No clear alteration was observed between *Srpk79D<sup>VN</sup>* null-mutant and wild-type flies comparing the expression of different presynaptic proteins like Synapsin, Synapse-associated protein of 47 kDa (Sap47), and Cysteine string protein (CSP). The experiment does not point towards altered splicing of the corresponding pre-mRNAs. Each of the seven known SR proteins of *Drosophila* is a potential target protein of the SRPK79D. Pan-neuronal knock-down experiments for the three SR proteins SC35, X16/9G8, and B52/SRp55 investigated in this thesis by RNA interference did not show an effect on the tissue distribution of BRP.

Animals with mutation of the *Srpk79D* gene do not show major deficits concerning their learning ability. The *Srpk79D<sup>VN</sup>* null-mutant animals performed equally well to wild-type animals in a two-odour paradigm for larval olfactory conditioning. It was shown that the *Srpk79D<sup>VN</sup>* null mutation has no additive effect on the knock-down of the BRP protein regarding the flight ability of the respective animals because the double mutants showed similar values of non-flyers as each of the single mutants with either null mutation of the *Srpk79D* gene or knock-down of BRP. Presumably, Bruchpilot and the SR protein kinase 79D are part of the same signaling pathway.

Performing double fluorescence stainings with antibodies against BRP and the CAPA peptides it was shown that Bruchpilot is also present in the median and transverse nerve system (MeN/TVN) of *Drosophila* containing the neurohaemal organs. These organs are responsible for storage and release of neuropeptide hormones. In contrast to the larval segmental and intersegmental nerves of the *Srpk79D<sup>VN</sup>* null mutant which show characteristic BRP agglomerates, mutation of the *Srpk79D* gene does not affect the distribution of BRP in the axons of the Va neurons which form the MeN/TVN system. The staining pattern of BRP in these nerves does not show clear alterations in the *Srpk79D<sup>VN</sup>* null mutant compared to wild type. The finding that BRP is present in the median and transverse nerve system opens the field for speculation of a role for the Bruchpilot protein not only in the neurotransmitter exocytosis but also in the release of neuropeptides.

## • **8. Literaturverzeichnis**

**Aberle H.**, Haghghi A.P., Fetter R.D., McCabe B.D., Magalhaes T.R., and Goodman C.S. (2002). *wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in Drosophila*. Neuron Vol. 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., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.-H. C., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C.R., Miklos G.L.G., Abril J.F., Agbayani A., An H.-J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K.C., Busam D.A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J.M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L.B., Davies P., de Pablos B., Delcher A., Deng Z., Deslattes Mays A., Dew I., Dietz S.M., Dodson K., Doup L.E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B.C., Dunn P., Durbin K.J., Evangelista C.C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A.E., Garg N.S., Gelbart W.M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J.H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N.L., Harvey D., Heiman T.J., Hernandez J.R., Houck J., Hostin D., Houston K.A., Howland T.J., Wei M.-H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G.H., Ke Z., Kennison J.A., Ketchum K.A., Kimmel B.E., Kodira C.D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A.A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T.C., McLeod M.P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N.V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S.M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D.M., Nelson D.L., Nelson D.R., Nelson K.A., Nixon K., Nusskern D.R., Pacleb J.M., Palazzolo M., Pittman G.S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M.G., Reinert K., Remington K., Saunders R.D.C., Scheeler F., Shen H., Shue B.C., Sidén-Kiamos I., Simpson M., Skupski M.P., Smith T., Spier E., Spradling A.C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A.H., Wang X., Wang Z.-Y., Wassarman D.A., Weinstock G.M., Weissenbach J., Williams S.M., Woodage T., Worley K.C., Wu D., Yang S., Yao Q.A., Ye J., Yeh R.-F., Zaveri J.S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X.H., Zhong F.N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H.O., Gibbs R.A., Myers E.W., Rubin G.M., and Venter J.C. (2000). *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science Vol. 287: 2185-2195

- Ahmari** S.E., Buchanan J., and Smith S.J. (2000). *Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets*. Nature Neurosci. Vol. 3 (No. 5): 445-451
- Allemand** E., Dokudovskaya S., Bordonné R., and 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 1*. Mol. Biol. Cell Vol. 13: 2436-2447
- Arnold** C., Reisch N., Leibold C., Becker S., Prüfert K., Sautter K., Palm D., Jatzke S., Buchner S., and Buchner E. (2004). *Structure-function analysis of the cysteine string protein in Drosophila: cysteine string, linker and C terminus*. J. Exp. Biol. Vol. 207: 1323-1334
- Aubol** B.E., Chakrabarti S., Ngo J., Shaffer J., Nolen B., Fu X.-D., Ghosh G., and Adams J.A. (2003). *Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2*. PNAS Vol. 100 (No. 22): 12601-12606
- Auluck** P.K., Chan H.Y.E., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y., and Bonini N.M. (2002). *Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease*. Science Vol. 295: 865-868
- Benzer** S. (1973). *Genetic dissection of behavior*. Sci. Am. Vol. 229 (6): 24-37
- Blencowe** B.J. (2000). *Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases*. TIBS Vol. 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
- Botella** J.A., Bayersdorfer F., Gmeiner F., and Schneuwly S. (2009). *Modelling Parkinson's disease in Drosophila*. Neuromol. Med. Vol.11: 268-280

- Bowman** A.B., Patel-King R.S., Benashski S.E., McCaffery M., Goldstein L.S.B., et al. (1999). *Drosophila roadblock and Chlamydomonas LC7: A conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis*. J. Cell Biol. Vol. 1: 165-180
- Brand** A.H. and Perrimon N. (1993). *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Dev. Vol. 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
- Cai** Q. and Sheng Z.-H. (2009). *Molecular motors and synaptic assembly*. Neuroscientist Vol. 15 (No. 1): 78-89
- Castle** W.E., Carpenter F.W., Clark A.H., Mast S.O., and Barrows W.N. (1906). *The effects of inbreeding, cross-breeding and selection upon the fertility and variability of Drosophila*. Proc. Am. Acad. Arts Sci. Vol. 41: 729-786
- Catterell** W.A. and Few A.P. (2008). *Calcium channel regulation and presynaptic plasticity*. Neuron Vol. 59.: 882-901
- Cesca** F., Baldelli P., Valtorta F., and Benfenati F. (2010). *The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity*. Prog. Neurobiol. Vol. 1028: 1-36
- Chevalier-Larsen** E. and Holzbaur E.L.F. (2006). *Axonal transport and neurodegenerative disease*. Biochim. Biophys. Acta Vol. 1762: 1094-1108
- Chua** J.J.E., Kindler S., Boyken J., and Jahn R. (2010). *The architecture of an excitatory synapse*. J. Cell Science Vol. 123: 819-823
- Colwill** K., Feng L.L., Yeakley J.M., Gish G.D., Cáceres J.F., Pawson T., and Fu X.-D. (1996a). *SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors*. J. Biol. Chem. Vol. 271 (No. 40): 24569-24575

**Colwill K.**, Pawson T., Andrews B., Prasad J., Manley J.L., Bell J.C., and Duncan P.I. (1996b). *The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution*. EMBO J. Vol. 15 (No. 2): 265-275

**Couteaux R.** and 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 Vol. 271: 2346-2349

**Ding J.-H.**, Zhong X.-Y., Hagopian J.C., Cruz M.M., Ghosh G., Feramisco J., Adams J.A., and Fu X.-D. (2006). *Regulated cellular partitioning of SR-protein-specific kinases in mammalian cells*. Mol. Biol. Cell Vol. 17: 876-885

**Dresbach T.**, Torres V., Wittenmayer N., Altmann W.D., Zamorano P., Zuschratter W., Nawrotzki R., Ziv N.E., Garner C.C., and 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. Vol. 281 (No. 9): 6038-6047

**Dulubova I.**, Lou X., Lu J., Huryeva I., Alam A., Schneggenburger R., Südhof T.C., and Rizo J. (2005). *A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?* EMBO J. Vol. 24: 2839-2850

**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.K.**, Zinsmaier K.E., Buchner S., Gruhn M., Jenni M., Arnold C., Leibold C., Reisch D., Walter N., Hafen E., Hofbauer A., Pflugfelder G.O., and Buchner E. (1998). *Wide distribution of the cysteine string proteins in Drosophila tissues revealed by targeted mutagenesis*. Cell Tissue Res. Vol. 294: 203-217

**Eckert M.**, Herbert Z., Pollák E., Molnár L., and Predel R. (2002). *Identical cellular distribution of all abundant neuropeptides in the major abdominal neurohemal system of an insect (Periplaneta americana)*. J. Comp. Neurol. Vol. 452: 264-275

- Eperon** I.C., Ireland D.C., Smith R.A., Mayeda A., and Krainer A.R. (1993). *Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF*. EMBO J. Vol. 12 (No. 9): 3607-3617
- Fejtova** A., Davydova D., Bischof F., Lazarevic V., Altroch W.D., Romorini S., Schöne C., Zuschratter W., Kreutz M.R., Garner C.C., Ziv N.E., and Gundelfinger E.D. (2009). *Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon*. J. Cell Biol. Vol. 185 (No. 2): 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., and Garner C.C. (2000). *Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon*. Neuron Vol. 25: 203-214
- Fiala** A. and Spall T. (2003). *In vivo calcium imaging of brain activity in Drosophila by transgenic Cameleon expression*. Sci. STKE Vol. 174 (pl 6): 1-12
- Fornasiero** E.F., Bonanomi D., Benfenati F., and Valtorta F. (2010). *The role of synapsins in neuronal development*. Cell Mol. Life Sci. Vol. 67: 1383-1396
- Fouquet** W., Oswald D., Wichmann C., Mertel S., Depner H., Dyba M., Hallermann S., Kittel R.J., Eimer S., and Sigrist S.J. (2009). *Maturation of active zone assembly by Drosophila Bruchpilot*. J. Cell Biol. Vol. 186 (No. 1): 129-145
- Fu** X.-D. (1993). *Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins*. Nature Vol. 365: 82-85
- Fu** X.-D. (1995). *The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors*. RNA Vol. 1: 663-680
- Fu** X.-D., Mayeda A., Maniatis T., and Krainer A.R. (1992). *General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89: 11224-11228
- Funk** N., Becker S., Huber S., Brunner M., and Buchner E. (2004). *Targeted mutagenesis of the Sap47 gene of Drosophila: Flies lacking the synapse associated protein of 47 kDa are viable and fertile*. BMC Neurosci. Vol. 5: 16-25

- Gabut M.**, Dejardin J., Tazi J., and 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. Vol. 27 (No. 8): 3087-3097
- Garner C.C.**, Zhai R.G., Gundelfinger E.D., and Ziv N.E. (2002). *Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis.* Trends Neurosci. Vol. 25 (No. 5): 243-250
- Ge H.** and Manley J.L. (1990). *A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro.* Cell Vol. 62: 25-34
- Gerber B.** and Stocker R.F. (2007). *The Drosophila larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review.* Chem. Senses Vol. 32: 65-89
- Gindhart J.G. Jr.**, Desai C.J., Beushausen S., Zinn K., and Goldstein L.S.B. (1998). *Kinesin light chains are essential for axonal transport in Drosophila.* J. Cell Biol. Vol. 141: 443-454
- Gindhart J.G.**, Chen J., Faulkner M., Gandhi R., Doerner K., et al. (2003). *The kinesin-associated protein UNC-76 is required for axonal transport in the Drosophila nervous system.* Mol. Biol. Cell Vol. 14: 3356-3365
- Godenschwege T.A.**, Reisch D., Diegelmann S., Eberle K., Funk N., Heisenberg M., Hoppe V., Hoppe J., Klagges B.R.E., Martin J.-R., Nikitina E.A., Putz G., Reifegerste R., Reisch N., Rister J., Schaupp M., Scholz H., Schwärzel M., Werner U., Zars T.D., Buchner S., and Buchner E. (2004). *Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour.* E. J. Neurosci. Vol. 20: 611-622
- Graf E.R.**, Daniels R.W., Burgess R.W., Schwarz T.L., and DiAntonio A. (2009). *Rab3 dynamically controls protein composition at active zones.* Neuron Vol. 64: 663-677
- Graveley B.R.** (2000). *Sorting out the complexity of SR protein functions.* RNA Vol. 6: 1197-1211
- Graveley B.R.** (2001). *Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world.* Trends Genet. Vol. 17: 100-107

- Gui J.-F.**, Lane W.S., and Fu X.-D. (1994a). *A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle*. Nature Vol. 369: 678-682
- Gui J.-F.**, Tronchère H., Chandler S.D., and Fu X.-D. (1994b). *Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 91: 10824-10828
- Hagopian J.C.**, Ma C.-T., Meade B.R., Albuquerque C.P., Ngo J.C.K., Ghosh G., Jennings P.A., Fu X.-D., and Adams J.A. (2008). *Adaptable molecular interactions guide phosphorylation of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1*. J. Mol. Biol. Vol. 382: 894-909
- Hata Y.**, Butz S., and Südhof T.C. (1996). *CASK: A novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal Calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins*. J. Neurosci. Vol. 16: 2488-2494
- Hirokawa N.** and Noda Y. (2008). *Intracellular transport and Kinesin superfamily proteins, KIFs: Structure, Function, and Dynamics*. Physiol. Rev. Vol. 88: 1089-1118
- Hofbauer A.**, Ebel T., Waltenspiel B., Oswald P., Chen Y., Halder P., Biskup S., Lewandrowski U., Winkler C., Sickmann A., Buchner S., and Buchner E. (2009). *The Würzburg hybridoma library against Drosophila brain*. J. Neurogenet. Vol. 23: 78-91
- Hurd D.D.** and Saxton W.M. (1996). *Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in Drosophila*. Genet. Vol. 144: 1075-1085
- Iijima-Ando K.** and Iijima K. (2010). *Transgenic Drosophila models of Alzheimer's disease and tauopathies*. Brain Struct. Funct. Vol. 214: 245-262
- Iijima K.**, Gatt A., and Iijima-Ando K. (2010). *Tau Ser262 phosphorylation is critical for A $\beta$ 42-induced tau toxicity in a transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease*. Human Mol. Genet. Vol. 19 (No. 15): 2947-2957
- Jahn R.** and Scheller R.H. (2006). *SNAREs-engines for membrane fusion*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Vol. 7: 631-643

- Jamison** S.F., Pasman Z., Wang J., Will C., Lührmann R., Manley J.L., and Garcia-Blanco M.A. (1995). *U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements*. Nucl. Acids Res. Vol. 23 (No. 16): 3260-3267
- Jin** Y. and Garner C.C. (2008). *Molecular mechanisms of presynaptic differentiation*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Vol. 24: 237-262
- Johnson** III E.L., Fetter R.D., and Davis G.W. (2009). *Negative regulation of active zone assembly by a newly identified SR protein kinase*. PLOS Biology Vol.7 (Issue 9): 1-17
- Kamal** A. and Goldstein L.S.B. (2002). *Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins*. Curr. Opinion Cell Biol. Vol. 14: 63-68
- Kandel** E.R., Schwartz J.H., and Jessell T.M. (1996). *Neurowissenschaften – Eine Einführung*. Lehrbuch Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- Kawasaki** F., Zou B., Xu X., and Ordway R.W. (2004). *Active zone localization of presynaptic calcium channels encoded by the cacophony locus of Drosophila*. J. Neurosci. Vol. 24 (1): 282-285
- Kean** L., Cazenave W., Costes L., Broderick K.E., Graham S., Pollock V.P., Davies S.A., Veenstra J.A., and Dow J.A.T. (2002). *Two nitridergic peptides are encoded by the gene capability in Drosophila melanogaster*. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. Vol. 282: R1297-R1307
- Keller** A., Sweeney S.T., Zars T., O'Kane C.J., and Heisenberg M. (2002). *Targeted expression of tetanus neurotoxin interferes with behavioral responses to sensory input in Drosophila*. J. Neurobiol. 50 (3): 221-233
- Kim** E. and Sheng M. (2004). *PDZ domain proteins of synapses*. Nat. Rev. Neurosci. Vol. 5: 771-781
- Kittel** R.J., Hallermann S., Thomsen S., Wichmann C., Sigrist S.J., and Heckmann M. (2006). *Active zone assembly and synaptic release*. Biochem. Society Transactions Vol. 34 (Part 5): 939-941

- Kittel R.J.**, Wichmann C., Rasse T.M., Fouquet W., Schmidt M., Schmid A., Wagh D.A., Pawlu C., Kellner R.R., Willig K.I., Hell S.W., Buchner E., Heckmann M., and Sigrist S.J. (2006). *Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca<sup>2+</sup> channel clustering, and vesicle release*. Science Vol. 312: 1051-1054
- Klagges B.R.E.**, Heimbeck G., Godenschwege T.A., Hofbauer A., Pflugfelder G.O., Reifegerste R., Reisch D., Schaupp M., Buchner S., and Buchner E. (1996). *Invertebrate synapsins: A single gene codes for several isoforms in Drosophila*. J. Neurosci. Vol. 16 (10): 3154-3165
- Kohtz J.D.**, Jamison S.F., Will C.L., Zuo P., Lührmann R., Garcia-Blanco M.A., and Manley J.L. (1994). *Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors*. Nature Vol. 368: 119-124
- Krainer A.R.**, Conway G.C., and Kozak D. (1990a). *Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells*. Genes Dev. Vol. 4: 1158-1171
- Krainer A.R.**, Conway G.C., and Kozak D. (1990b). *The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites*. Cell Vol. 62: 35-42
- Kraszewski K.**, Mundigl O., Daniell L., Verderio C., Matteoli M., and De Camilli P. (1995). *Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of Synaptotagmin*. J. Neurosci. Vol. 15 (6): 4328-4342
- Krueger S.R.**, Kolar A., and Fitzsimonds R.M. (2003). *The presynaptic release apparatus is functional in the absence of dendritic contact and highly mobile within isolated axons*. Neuron Vol. 40: 945-957
- Küppers-Munther B.**, Letzkus J.J., Lürer K., Technau G., Schmidt H., and Prokop A. (2004). *A new culturing strategy optimises Drosophila primary cell cultures for structural and functional analyses*. Dev. Biol. Vol. 269: 459-478
- Kuroyanagi N.**, Onogi H., Wakabayashi T., and Hagiwara M. (1998). *Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles*. Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 242: 357-364

- Lai K.O.** and Ip N.Y. (2009). *Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling*. Curr. Opin. Neurobiol. Vol. 19: 275-283
- Landy A.** (1989). *Dynamic, structural, and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination*. Ann. Rev. Biochem. Vol. 58: 913-949
- Lee C.W.** and Peng H.B. (2008). *The function of mitochondria in presynaptic development at the neuromuscular junction*. Mol. Biol. Cell Vol. 19: 150-158
- Li Q.**, Lee J.-A., and Black D.L. (2007). *Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing*. Nature Rev. Neurosci. Vol. 8: 819-831
- Lukasiewicz R.**, Velazquez-Dones A., Huynh N., Hagopian J., Fu X.-D., Adams J., and Ghosh G. (2007). *Structurally unique yeast and mammalian serine-arginine protein kinases catalyze evolutionarily conserved phosphorylation reactions*. J. Biol. Chem. Vol. 282 (No. 32): 23036-23043
- Ma C.-T.**, Hagopian J.C., Ghosh G., Fu X.-D., and Adams J.A. (2009). *Regiospecific phosphorylation control of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1*. J. Mol. Biol. Vol. 390: 618-634
- Ma C.-T.**, Velazquez-Dones A., Hagopian J.C., Ghosh G., Fu X.-D., and Adams J.A. (2008). *Ordered multi-site phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 by SRPK1*. J. Mol. Biol. Vol. 376: 55-68
- Maicher A.** (2009). *Funktionelle Charakterisierung der SRPK79D von Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Manley J.L.** and Tacke R. (1996). *SR proteins and splicing control*. Genes Dev. Vol. 10: 1569-1579
- Mao D.Y.L.**, Ceccarelli D.F., and Sicheri F. (2008). *„Unraveling the tail“ of how SRPK1 phosphorylates ASF/SF2*. Mol. Cell Vol. 29: 535-537
- Marqués G.** (2005). *Morphogens and synaptogenesis in Drosophila*. J. Neurobiol. Vol. 64: 417-434

- Marqués G.**, Bao H., Haerry T.E., Shimell M.J., Duchek P., Zhang B., and O'Connor M.B. (2002). *The Drosophila BMP type II receptor wishful thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function*. Neuron Vol. 33: 529-543
- Marsh J.L.**, Pallos J., and Thompson L.M. (2003). *Fly models of Huntington's disease*. Human Mol. Genet. Vol. 12 (Issue 2): R187-R193
- Martin M.**, Iyadurai S.J., Gassman A., Gindhart J.G. Jr., Hays T.S., et al. (1999). *Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport*. Mol. Biol. Cell Vol. 10: 3717-3728
- Mathew R.**, Hartmuth K., Möhlmann S., Urlaub H., Ficner R., and Lührmann R. (2008). *Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome*. Nature Struct. Mol. Biol. Vol. 15 (No. 5): 435-443
- Matteoli M.**, Coco S., Schenk U., and Verderio C. (2004). *Vesicle turnover in developing neurons: how to build a presynaptic terminal*. Trends Cell Biol. Vol. 14 (No. 3): 133-140
- Meinertzhagen I.A.**, Govind C.K., Stewart B.A., Carter J.M., and Atwood H.L. (1998). *Regulated spacing of synapses and presynaptic active zones at larval neuromuscular junctions in different genotypes of the flies Drosophila and Sarcophaga*. J. Comp. Neurol. Vol. 393: 482-492
- Michels B.**, Diegelmann S., Tanimoto H., Schwenkert I., Buchner E., and Gerber B. (2005). *A role for Synapsin in associative learning: The Drosophila larva as a study case*. Learning and Memory Vol. 12: 224-231
- Misteli T.**, Cáceres J.F., Clement J.Q., Krainer A.R., Wilkinson M.F., and Spector D.L. (1998). *Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo*. J. Cell Biol. Vol. 143 (No. 2): 297-307
- Mount S.M.** and Salz H.K. (2000). *Pre-messenger RNA processing factors in the Drosophila genome*. J. Cell Biol. Vol. 150 (No. 2): F37-F43

**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., and Olson E.N. (2005). *Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2*. Genes Dev. Vol. 19: 2066-2077

**Ngo J.C.K.**, Chakrabarti S., Ding J.-H., Velazquez-Dones A., Nolen B., Aubol B.E., Adams J.A., Fu X.-D., and Ghosh G. (2005). *Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2*. Mol. Cell Vol. 20: 77-89

**Ngo J.C.K.**, Giang K., Chakrabarti S., Ma C.-T., Huynh N., Hagopian J.C., Dorrestein P.C., Fu X.-D., Adams J.A., and Ghosh G. (2008). *A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1*. Mol. Cell Vol. 29: 563-576

**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., and Buchner E. (2009). *Bruchpilot in ribbon-like axonal agglomerates, behavioral defects, and early death in SRPK79D kinase mutants of Drosophila*. PLOS Genetics Vol. 5 (10): 1-16

**Oh H.-W.**, Campusano J.M., Hilgenberg L.G.W., Sun X., Smith M.A., and O'Dowd D.K. (2008). *Ultrastructural analysis of chemical synapses and gap junctions between Drosophila brain neurons in culture*. Dev. Neurobiol. Vol. 68 (3): 281-294

**Owald D.**, Fouquet W., Schmidt M., Wichmann C., Mertel S., Depner H., Christiansen F., Zube C., Quentin C., Körner J., Urlaub H., Mechtler K., and Sigrist S.J. (2010). *A Syd-1 homologue regulates pre- and postsynaptic maturation in Drosophila*. J. Cell Biol. Vol. 188 (No. 4): 565-579

- Pack-Chung** E., Kurshan P.T., Dickman D.K., and Schwarz T.L. (2007). *A Drosophila kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport*. Nature Neurosci. Vol. 10 (No. 8): 980-989
- Papoutsopoulou** S., Nikolakaki E., and Giannakouros T. (1999a). *SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities*. Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 255: 602-607
- Papoutsopoulou** S., Nikolakaki E., Chalepakis G., Kruft V., Chevallier P., and Giannakouros T. (1999b). *SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1*. Nucl. Acids Res. Vol. 27: 2972-2980
- Patel** M.R. and Shen K. (2009). *RSY-1 is a local inhibitor of presynaptic assembly in C. elegans*. Science Vol. 323: 1500-1503
- Penalva** L.O.F. and Sánchez L. (2003). *RNA binding protein Sex-Lethal (Sxl) and control of Drosophila sex determination and dosage compensation*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 67 (No. 3): 343-359
- Philips** G.R., Huang J.K., Wang Y., Tanaka H., Shapiro L., Zhang W., Shan W.S., Arndt K., Frank M., Gordon R.E., Gawinowicz M.A., Zhao Y., and Colman D.R. (2001). *The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution*. Neuron Vol. 32: 63-77
- Piper** M. and Holt C. (2004). *RNA translation in axons*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Vol. 20: 505-523
- Prokop** A., Landgraf M., Rushton E., Broadie K., and Bate M. (1996). *Presynaptic development at the Drosophila neuromuscular junction: Assembly and localization of presynaptic active zones*. Neuron Vol. 17: 617-626
- Rana** T.M. (2007). *Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. Vol. 8: 23-36
- Reichmuth** C., Becker S., Benz M., Debel K., Reisch D., Heimbeck G., Hofbauer A., Klagges B., Pflugfelder G.O., and Buchner E. (1995). *The sap47 gene of Drosophila melanogaster codes for a*

*novel conserved neuronal protein associated with synaptic terminals.* Mol. Brain Res. Vol. 32: 45-54

**Reuther S.** (2005). *Die Herstellung von Antikörpern gegen die „Bruchpilot-related protein kinase“ und die „Rettung“ des Wildtyp-Phänotypes von homozygoten P487/16-Jump-out-Mutanten.* Diplomarbeit; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Roos J.** and Kelly R.B. (2000). *Preassembly and transport of nerve terminals: a new concept of axonal transport.* Nature Neurosci. Vol. 3 (No. 5): 415-417

**Roscigno R.F.** and Garcia-Blanco M.A. (1995). *SR proteins escort the U4/U6·U5 tri-snRNP to the spliceosome.* RNA Vol. 1: 692-706

**Roth M.B.,** Zahler A.M., and Stolk J.A. (1991). *A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription.* J. Cell Biol. Vol. 115 (No. 3): 587-596

**Santos J.G.,** Pollák E., Rexer K.-H., Molnár L., and Wegener C. (2006). *Morphology and metamorphosis of the peptidergic Va neurons and the median nerve system of the fruit fly, Drosophila melanogaster.* Cell Tissue Res. Vol. 326: 187-199

**Scherer S.,** Stocker R.F., and Gerber B. (2003). *Olfactory learning in individually assayed Drosophila larvae.* Learning and Memory Vol. 10: 217-225

**Schoch S.** and Gundelfinger E.D. (2006). *Molecular organization of the presynaptic active zone.* Cell Tissue Res. Vol. 326: 379-391

**Schroll C.,** Riemensperger T., Bucher D., Ehmer J., Völler T., Erbguth K., Gerber B., Hendel T., Nagel G., Buchner E., and Fiala A. (2006). *Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in Drosophila larvae.* Curr. Biol. Vol. 16: 1741-1747

**Schubert A.** (in Vorbereitung). *Immunohistochemische und funktionelle Charakterisierung der Serin-Arginin-Proteinkinase SRPK79D mit Identifizierung von Interaktionspartnern in Drosophila melanogaster.* Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Shapira M.**, Zhai R.G., Dresbach T., Bresler T., Torres V.I., Gundelfinger E.D., Ziv N.E., and Garner C.C. (2003). *Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles*. Neuron Vol. 38: 237-252

**Sharp D.J.**, Rogers G.C., and Scholey J.M. (2000). *Roles of motor proteins in building microtubule-based structures: a basic principle of cellular design*. Biochim. Biophys. Acta Vol. 1496: 128-141

**Siebel C.W.**, Feng L., Guthrie C., and Fu X.-D. (1999). *Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96: 5440-5445

**Siksoo L.**, Rostaing P., Lechaire J.-P., Boudier T., Ohtsuka T., Fejtová A., Kao H.-T., Greengard P., Gundelfinger E.D., Triller A., and Marty S. (2007). *Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix*. J. Neurosci. Vol. 27 (26): 6868-6877

**Stamm S.** (2008). *Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation*. J. Biol. Chem. Vol. 283: 1223-1227

**Steffan J.S.**, Bodai L., Pallos J., Poelman M., McCampbell A., Apostol B.L., Kazantsev A., Schmidt E., Zhu Y.-Z., Greenwald M., Kurokawa R., Housman D.E., Jackson G.R., Marsh J.L., and Thompson L.M. (2001). *Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila*. Nature Vol. 413: 739-743

**Stojdl D.F.** and Bell J.C. (1999). *SR protein kinases: the splice of life*. Biochem. Cell Biol. Vol. 77: 293-298

**Südhof T.C.** (2004). *The synaptic vesicle Cycle*. Annu. Rev. Neurosci. Vol. 27: 509-547

**Takeuchi M.** and Yanagida M. (1993). *A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase *dsk1* with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization*. Mol. Biol. Cell Vol. 4 (247-260)

**Tang Z.**, Kuo T., Shen J., and Lin R.-J. (2000). *Biochemical and genetic conservation of fission yeast *Dsk1* and human SR protein-specific kinase I*. Mol. Cell. Biol. Vol. 20: 816-824

- Tang Z.**, Tsurumi A., Alaei S., Wilson C., Chiu C., Oya J., and Ngo B. (2007). *Dsk1p kinase phosphorylates SR proteins and regulates their cellular localization in fission yeast*. *Biochem. J.* Vol. 405: 21-30
- Tang Z.**, Yanagida M., and Lin R.-J. (1998). *Fission yeast mitotic regulator Dsk1 is an SR protein-specific kinase*. *J. Biol. Chem.* Vol. 273 (No. 10): 5963-5969
- Tao-Cheng J.-H.** (2007). *Ultrastructural localization of active zone and synaptic vesicle proteins in a preassembled multi-vesicle transport aggregate*. *Neurosci.* Vol. 150 (3): 575-584
- Tobaben S.**, Thakur P., Fernandez-Chacon R., Südhof T.C., Rettig J., and Stahl B. (2001). *A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine*. *Neuron* Vol. 31: 987-999
- Vardinon Friedman H.**, Bresler T., Garner C.C., and Ziv N.E. (2000). *Assembly of new individual excitatory synapses: Time course and temporal order of synaptic molecule recruitment*. *Neuron* Vol. 27: 57-69
- Verhage M.** and Sorensen J.B. (2008). *Vesicle docking in regulated exocytosis*. *Traffic* Vol. 9: 1414-1424
- Wagh D.A.**, Rasse T.M., Asan E., Hofbauer A., Schwenkert I., Dürrbeck H., Buchner S., Dabauvalle M.-C., Schmidt M., Qin G., Wichmann C., Kittel R., Sigrist S.J., and 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* Vol. 49: 833-844
- Wairkar Y.P.**, Toda H., Mochizuki H., Furukubo-Tokunaga K., Tomoda T., and DiAntonio A. (2009). *Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling*. *J. Neurosci.* Vol. 29 (2): 517-528
- Wang H.-Y.**, Arden K.C., Bermingham J.R. Jr., Viars C.S., Lin W., Boyer A.D., and Fu X.-D. (1999). *Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes*. *Genomics* Vol. 57: 310-315

- Wang H.-Y.**, Lin W., Dyck J.A., Yeakley J.M., Songyang Z., Cantley L.C., and Fu X.-D. (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. Vol. 140: 737-750
- Wang Z.**, Xiao X., Van Nostrand E., and Burge C.B. (2006). *General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control*. Mol. Cell. Vol. 23 (1): 61-70
- Wegener C.**, Herbert Z., Eckert M., and Predel R. (2002). *The periviscerokinin (PVK) peptide family in insects: evidence for the inclusion of CAP<sub>2b</sub> as a PVK family member*. Peptides Vol. 23: 605-611
- Wegener C.**, Reinl T., Jänsch L., and Predel R. (2006). *Direct mass spectrometric peptide profiling and fragmentation of larval peptide hormone release sites in Drosophila melanogaster reveals tagma-specific peptide expression and differential processing*. J. Neurochem. Vol. 96: 1362-1374
- Wieczorek D.F.**, Smith C.W.S., and Nadal-Ginard B. (1988). *The rat  $\alpha$ -tropomyosin gene generates a minimum of six different mRNAs coding for striated, smooth and nonmuscle isoforms by alternative splicing*. Mol. Cell. Biol. Vol. 8: 679-694
- Wu J.Y.** and Maniatis T. (1993). *Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing*. Cell Vol. 75: 1061-1070
- Xiao S.-H.** and 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 Dev. Vol. 11: 334-344
- Yeakley J.M.**, Tronchère H., Olesen J., Dyck J.A., Wang H.-Y., and Fu X.-D. (1999). *Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors*. J Cell Biol. Vol. 145 (No. 3): 447-455
- Yomoda J.-I.**, Muraki M., Kataoka N., Hosoya T., Suzuki M., Hagiwara M., and Kimura H. (2008). *Combination of Clk family kinase and Srp75 modulates alternative splicing of Adenovirus E1A*. Genes to Cells Vol. 13: 233-244

- Yun B.**, Farkas R., Lee K., and Rabinow L. (1994). *The Doa locus encodes a member of a new protein kinase family and is essential for eye and embryonic development in Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* Vol. 8: 1160-1173
- Zahler A.M.**, Lane W.S., Stolk J.A., and Roth M.B. (1992). *SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors*. *Genes Dev.* Vol. 6: 837-847
- Zahler A.M.**, Neugebauer K.M, Lane W.S., and Roth M.B. (1993). *Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing*. *Science* Vol. 260: 219-222
- Zahler A.M.** and Roth M.B. (1995). *Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92: 2642-2646
- Zaratiegui M.**, Irvine D.V., and Martienssen R.A. (2007). *Noncoding RNAs and gene silencing*. *Cell* Vol. 128: 763-776
- Zhai R.G.** and Bellen H.J. (2004). *The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal*. *Physiology* Vol. 19: 262-270
- Zhai R.G.**, Vardinon-Friedman H., Cases-Langhoff C., Becker B., Gundelfinger E.D., Ziv N.E., and Garner C.C. (2001). *Assembling the presynaptic active zone: A characterization of an active zone precursor vesicle*. *Neuron* Vol. 29: 131-143
- Zhen M.** and Jin Y. (2004). *Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly*. *Curr. Opinion Neurobiol.* Vol. 14: 280-287
- Ziv N.E.** and Garner C.C. (2001). *Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees*. *Curr. Opinion Neurobiol.* Vol. 11: 536-543

## 9. Abkürzungen

aa	– amino acid, Aminosäure
ATP	– Adenosin-Triphosphat
AZ	– Aktive Zone
BMP	– bone morphogenetic protein
bp	– base pairs, Basenpaare
BRP	– Bruchpilot
CAM	– cell adhesion molecule
CAST	– CAZ-associated structural protein
CAZ	– cytomatrix at the active zone
cDNA	– copy desoxyribonucleic acid
CS	– <i>CantonS</i>
CSP	– Cysteine string protein
ddH <sub>2</sub> O	– doppelt-destilliertes Wasser
DMSO	– Dimethylsulfoxid
DNA	– desoxyribonucleic acid
dsRNA	– doppelsträngige RNA
<i>DSyd-1</i>	– <i>Drosophila synapse defective-1</i>
DTT	– Dithiothreitol
eGFP	– enhanced green fluorescent protein
ELKS	– Glutamin-, Leucin-, Lysin- und Serin-reiches Protein
EM	– Elektronenmikroskop
ERC	– ELKS-Rab6-interacting protein CAST
Gal4	– Gal4-Transkriptionsfaktor
kDa	– Kilo-Dalton
MeN/TVN	– Median/Transvers-Nervensystem
miRNA	– microRNA
mRNA	– messenger RNA
ncRNA	– non-coding RNA
NMJ	– Neuromuscular junction
NSF	– <i>N</i> -Ethylmaleinimid-sensitives Fusionsprotein
nt	– Nukleotid

---

PCR	– polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PSD	– postsynaptic density
RIM	– Rab3-interacting molecule
RISC	– RNA-induced silencing complex
RNA	– ribonucleic acid
RNAi	– RNA-Interferenz
rpm	– rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
Sap47	– synapse associated protein of 47 kDa
siRNA	– small interfering RNA
SNAP	– soluble NSF attachment proteins
SNARE	– soluble <i>N</i> -ethylmaleinimide-sensitive factor attachment protein receptor
SRPK	– Serin/Arginin Proteinkinase
SR-Protein	– Serin/Arginin-reiches Protein
STED	– stimulated emission depletion
SV	– synaptic vesicle
TEM	– Transmissions-Elektronenmikroskop
UAS	– upstream activating sequence
VAMP	– vesicle-associated membrane protein

## 10. Anhang

### 10.1 Genomische Sequenz des *Srpk79D*-Genlokus

Die Sequenzen der 5' und 3' UTR (untranslated region) der Exon-Bereiche sind hier **blau** dargestellt, die translatierten Exon-Sequenzen in **rot**. Intron-Sequenzen sind in **schwarz** abgebildet. Die Start-, sowie das Stop-Kodon sind in **bordeaux** markiert. Primer sind in **braun** eingefügt. Die Sequenz des alternativ gespleißten Exon 7 ist in **orange** wiedergegeben. Die Sequenz der zweigeteilten Kinasedomäne ist **grün** hinterlegt.

22191287	<b>GAGAGTTCGA</b>	<b>GCCAAGTGCG</b>	<b>GACAAAGAAG</b>	<b>ACTTTTCCGT</b>	<b>GCTGCTGCTT</b>	<b>CTGCCAAAAA</b>
22191347	<b>CACAAAGTGG</b>	<b>AAAATGTGAT</b>	<b>GTGTTTCGCTT</b>	<b>TATTTGTCGA</b>	<b>GGATAAATCA</b>	<b>ATTCCGCTAT</b>
22191407	<b>TAACTAGACT</b>	<b>ACGGGCACGT</b>	<b>ACCTGGCCAA</b>	<b>AAGCATCGAA</b>	<b>GAAAGGCGAA</b>	<b>AGGGAATCCA</b>
22191467	<b>ATAGGCCCAA</b>	<b>TTGAGGGCAG</b>	<b>ACCGTGGA</b>	<b>AACCCTCTTC</b>	<b>TATCGCGAAC</b>	<b>CAGTTCGTGG</b>
22191527	<b>CAGTGTGTGC</b>	<b>GTGCGTGTGT</b>	<b>GGATTTTCGC</b>	<b>CTTACTTTTT</b>	<b>TCATGCGCAA</b>	<b>TTTGGGTTAC</b>
22191587	<b>AAAGCGAGAA</b>	<b>AAGCGCTGCT</b>	<b>TAAAATGCAT</b>	<b>GTTTTAAGCG</b>	<b>CGTCCCTTCA</b>	<b>TTGATTTTCC</b>
22191647	<b>TACGCACAAG</b>	<b>GAATGATATA</b>	<b>CGAAGTCCTC</b>	<b>ACCAGGAACA</b>	<b>AAGGGCGCAG</b>	<b>GCCAACGATG</b>
22191707	<b>AGGACAAAGA</b>	<b>CGCGAGGAAG</b>	<b>CTGCTTCTAG</b>	<b>CTTCCCAGCA</b>	<b>TTCATTAGGA</b>	<b>CAGGGCGAGG</b>
22191767	<b>ACCAGCCCCG</b>	<b>CGCAGATCAG</b>	<b>GAAACTCATC</b>	<b>CCGGGAGGCA</b>	<b>TCCTGGCTCC</b>	<b>CGTACTGCCC</b>
22191827	<b>AGTAGCGGCA</b>	<b>TGGCCGGCCT</b>	<b>CATCGGTGCC</b>	<b>GCAAATGGCA</b>	<b>AACACCACCA</b>	<b>CCCACACCTC</b>
				7f		
22191887	<b>ATCTCGCCCA</b>	<b>CCCACACGTC</b>	<b>ACTGC</b> <i>CGGCC</i>	<i>GGCATATGTA</i>	<i>G</i> <b>TAGTGACAG</b>	<b>CGGCATCTCC</b>
22191947	<b>ACTTTGAGTG</b>	<b>CCATCTCGCC</b>	<b>GCCACTCTCC</b>	<b>ACCTCGACCA</b>	<b>CCACGGCCTC</b>	<b>CGGTGCAGGC</b>
22192007	<b>GGAGGAGTGG</b>	<b>GCGGCAGCCC</b>	<b>TCAGCTGCGC</b>	<b>ACCTCACCTG</b>	<b>CGCTGAGTAT</b>	<b>GCTGGGTAGC</b>
22192067	<b>GCCACGGCGA</b>	<b>CGGCCAGCGG</b>	<b>CGTTACCGCC</b>	<b>TCCTCAGGAT</b>	<b>GCGGTCTAAC</b>	<b>TGCCGGGATC</b>
22192127	<b>CTGGGCCCCG</b>	<b>CGGCCAGCAT</b>	<b>TGACCTGGGC</b>	<b>AGCTCGCCGC</b>	<b>TTTCTCACCG</b>	<b>AAACTACAGC</b>
22192187	<b>AACTCACTGA</b>	<b>AGGGCTTTAG</b>	<b>TTTCCGTCGC</b>	<b>AGCTTCGACG</b>	<b>ACAAGATCAT</b>	<b>CAATACGCCG</b>
22192247	<b>TACTTGTCGC</b>	<b>GCGCTCCAGC</b>	<b>CTACACCCAC</b>	<b>GGCATTCCCT</b>	<b>ATCCGCATTT</b>	<b>TCACGGTACT</b>

22192307 CAGCCTGCGG CCACCACGCC GCACCACCTC CACCTACACC ACCATGGGAA CGGCACAGCT  
 22192367 GCGGGATCAG GTTCCGGTGT GGGATCGGGA CCGGGATCTG GCAGCGGTGC AGGAGGACTC  
 22192427 TACCAGCAGC CTCTGTGCTT GGCCTCGATG ACAGCGGCCC TGCCACTGGC TCCGCTCTAT  
 22192487 GGATCCCCGC TGTCCCTGCC GCTGACCTCC TCTCAGTCCA CCACCAAGCT CTCCTACCGC  
 22192547 GACGACTTTC TGCAGCAGAT TGGCTATCTG CCAACTACGC GCATCTACAG CACCCCGACC

Insertionsort des P-Elements P487/16



22192607 AGCATCGTCC ACGAGGACAA GGCCAGCA|G GACTTCCTCT CGCTGTGCTG GTCGCCGCCG  
 22192667 CTCAACCGAC GCGGGATAT GCCGGCACTG CGCGGCCCAT TCGTCAGTCT GTAAGTACTT

1. Intron n.P.sense

22192727 CATCGATATC GTTGTCCCTA TTTGGTAAAA CATTTTTATT GTGCTATAAA ATTAATATAA  
 22192787 GAATTTAGTA TATATTTCTA TTTTCGGCTA CAAATACCAT ATTTGCCAAT ATTATAAGAT  
 22192847 AAACCTCCTT CGATCACTTC ATGATCACTT GAACACTTCA TCTTCAAAAA AAATGTTCTT  
 22192907 GACATGAACT GACACTGAGA CATGATCAGA AGATCAGGAT CTTTTAACAA ATAGAGCTGG  
 22192967 GCGTGTCCGT CCGTCCGTAA TTTTGTATAA AGTTCGACCA CACGTTTATT TCAAGACGTG  
 22193027 TTCATGACGG ACTACTAGAA ACGTTAACTA AACTGCTCA TTGGAAAGCG ACGTCTCTTT  
 22193087 AACGCTTTTC TGTTAAGATA TCTCAACTCA ATCTCTCAAC TGAGTAACGA AGTAACTCGA

1. Intron n.P.anti

CCA AGGTAAAGAC TCACTGTGT  
 22193147 CCAAATGCAT TTAATTTGTA TTGACAAAAT GGTATTAGGT TCCATTTCTG AGTGACACAG  
 22193207 TATAAGCCTG TAATGTAAAT AAAAATATAA ATTGACAATT AATGAAATAA TATTAAAGGG  
 22193267 CATAACCAGCT TCGACTTAGT AAAGTAAGCT TTTTCCAGT TTTCTTTCCC ATCACTCTCA  
 22193327 TGCGGATAAA ATATGAACAT AAAGTATACG CCGCGTGTAT TCCACGTGTC TCTCACAGGC  
 22193387 AGGAAATAAA TTTATCGAAC CGTAACGAGC TGCTCCAATA TGTGAGCCGT TCGGGGATGG  
 22193447 CCTCACTATT CGCGTTCCCA CTGTGCGGGC ACAGTGGGCC TCATTGTTGA CGCAACCCAT  
 22193507 TAGTTCGATA CCCTTCGCCA CACAGTGTGC TTATCCCGAA TGGGATGTGA TTCCACACAC  
 22193567 TACATACTTA CTTATGTGGT CCAGTTTTTT CGACAGTGGT ACCAAGCAAA CTTTACCTCC  
 22193627 TGCGTCCCAT AATCCTACAT CGATCCCCC GCATGAGTTC TTCCATTAGT TCCGCTCGGT  
 22193687 TTGTTTACGT TTTTAAATTG CCCTAACCGC AAGTAGGCAC CACGTGACGC CAGTGGCTAA

22193747	CCAATGAGCA	CCCCCAACCC	AATCACCAAC	CTCCAACCCC	CAGCGCATCC	CCGCAATAAC
22193807	ACAAACTCAC	TGCAATCGAG	CAAACGATG	ACGTTTTACT	GCCTCTGGCT	GCTCTGTATT
22193867	CGCACTGATT	TTCTAGCCGA	CTTATTGTTT	TCATTGCTT	CTTTCGGCGT	CTATAAATAA
22193927	TAATTTTATT	GTGTTGTGCG	GGGGGGGGG	GGGTTTGGTG	GTGGTGTTGT	TATGTACGCC
22193987	GAGTAGAGCG	CGTTCGTGTG	TCAGAAATAG	GGTGACTCAA	GATGTCAGCA	AGCTTTTCCT
22194047	TCTAAAGAAA	TCGCCATGGC	TCCATAAGGA	TCAACGGCTG	ACTCAAGTTG	GGAACGGGGC
22194107	TGCAAAATCA	ATAAGGCCGG	TTAGTCCCAA	TACGAACTCA	CACATTTGCA	TATTGTGCAG
22194167	GCGGCGGACG	GAAGTGCAGT	TGCATTGCGA	GGAATTTTTC	AATCGCACCT	AATCGCTCGA
22194227	AACTACCTTT	CGAAGTGGTT	TCGAAACCTT	TTGGAATTCG	AGGTATTCGA	AATCCTGCCT
22194287	GTCGAACACC	CCTCTGCACG	GGCGAGGGAA	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	TACAC <b>CTGTC</b>
22194647	<b>TTTCAGTTTT</b>	<b>TATTTAGTTA</b>	<b>TTTACGAAGC</b>	<b>CACTAAATTA</b>	<b>CGATCCTGTA</b>	<b>AAGTAGAAGG</b>
22194707	TATCTGTTGG	CCAAAGACTG	CGACCTAACT	GCTTTGTAAG	GAAGTGTTCT	CGCAGTGTAT
22194767	CACTCTAAGG	AAAACATATG	GCGGGCATGG	GTTCTAGGTG	ATCCACACAC	CTCACCCCTT
22194827	GCCGGACTGT	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	ATATTT <b>CAGA</b>
22195067	<b>TTTTCCGCCG</b>	<b>TGCGATATAT</b>	<b>TTTATTTATT</b>	<b>TACCCCGCTC</b>	<b>GGGCCACTGT</b>	<b>TATGTAAGGA</b>
22195127	<b>GAGTGTGTGC</b>	<b>AGCGTGGTGT</b>	<b>TTGTGTTTGA</b>	<b>CCAAACTCGT</b>	<b>TCGGCGGTGT</b>	<b>CCGTGATGCA</b>
22195187	<b>AGTGGGGGTC</b>	<b>TACGAAAGTC</b>	<b>AAGGTCGCCA</b>	<b>CCCCCTACAC</b>	<b>GCACGCCAC</b>	<b>AGCCATCCCC</b>

22195247	TGTTACTGCG	CCCAGTTGCC	ATGAATTCGC	GAAGGTCTAA	TCGGAAATCC	AATTGTGCGAA
			GFPcEcosense			
		GGGGGAA	TTCATGGATG	ACTTTGGCTC	G	
			attB1-SrpK79D			
22195307	GGGGAC AAGTTTGTAC	AAAAAAGCAG	GCTATGGATG	ACTTTGGCTC	GACCGC	
	TCGAGCAGTG	AATCGAATCA	GAAATGGATG	ACTTTGGCTC	GACCGCATCC	GACTTGGGAAG
22195367	AGGCCACCTG	CCCCATGCAG	GCCAATGCCA	CGTTCAGCAT	CGATTGGCGA	GTGACCCTGC
		8F				
22195427	TGGACCACTG	GTTGGATCTC	TATCTTGGCT	ACATGAACCG	CCTACACATG	CTGCTATCAC
22195487	TAGCCGGCAG	GCTGCATCTT	CTAAGCCGGC	ACATCCTGGG	TACTCTCGGC	CAGGATCCGA
22195547	TTTTTATGGG	TGTGCTGCAG	GGCAGCCTGT	TAATGCTCTT	CCTCTTCTG	ATGCACCTGC
22195607	TGCGGCTGTG	GAGCTGTGGA	TACGCAGTTG	AGCGGCCGCT	GAACCCCACT	CCGGACGTGG
			6F			
22195667	CAAAAGAGCT	GAGCTGCGAC	TTCAACTTCG	TCTCCGAGCA	AGAGAAGCGA	GCTGCCCAAG
22195727	AAGCCGCGAC	GGAGGCTCTG	CTAGAGGTTG	AGGAGAAGAA	GCGCCGCAAG	CGGTTTACAA
22195787	AGAAGCGCAA	CTGCGTGTC	GCCGGGCCGA	TCCTTATTGC	CTTGCGCCAT	CAGTCTAAGC
22195847	GACCAAAGCA	CCATCGTCAC	GCTGCTCTAC	CCTTTGAGCC	CGTTACCCCC	GGGGAAATAA
22195907	TCCTGGATAC	CTACTTGCCG	CCGCGGGAAC	TGCCGCTCAC	GATAAGACTG	CCTCAGTTGG
22195967	CGGAGCCGGT	CAAGGAAGAG	GAAGTCGAAT	ATATCGAGCT	TAAGTGGGTT	GCAACGGGAA
22196027	TTCTCACAGA	GTTTACATTT	TAAAACATGT	ATTGTTCTTT	GTCAACTAAT	GGCCAAACCT
22196087	TTTTTTCTTT	ACAGATCGGA	GCCCCGGGGG	ACCCTCAGTA	CGACCGACGA	AATTTACCCG
22196147	GATTTCGTCG	ACAGCAGTCT	TTACGTTTCA	GACGAGGAGC	AGGAAGACCG	CTCTCAGTAT
				8R		
				CCTCTGTATA	AACTGTTGGC	CA
22196207	TCCCGCGGTG	GATACCATCG	AGTAGTCATC	GGAGACATAT	TTGACAACCG	GTTTCGAGTG
22196267	GTCAGAAAAC	TGGGCTGGGG	CCATTTTTC	ACTGTCTGGC	TATGCCGGCA	TCTCAAGTAT
22196327	GTGATGAAAT	GTCGAACTTA	CCATAAAACA	AGCTCTTTCA	AACTTCATGC	TTTCCCCAG
22196387	GATGAGAAGT	ACGTGGCCCT	CAAGGTTGTT	AAGAGTGCTC	CGCATTACAT	AGAGACGGCA

	7R					
		<i>GAGGA</i>	<i>CCTTCGATAG</i>	<i>GCACT</i>		
22196447	<b>GCGGACGAGA</b>	<b>FCCGGCTCCT</b>	<b>GGAAGCTATC</b>	<b>CGTGACGCAG</b>	<b>ACCCCATGGA</b>	<b>CGTTAAGCGG</b>
22196507	<b>GAGAGGATCG</b>	<b>FGGSSCTGAT</b>	<b>GAACCACTTC</b>	<b>ACTGTGCCCG</b>	<b>GTGTGAATGG</b>	<b>AATGCACACC</b>
22196567	<b>TGCCTGGTTT</b>	<b>TCGAGGCCCT</b>	<b>GGGCTGCAGC</b>	<b>TTGTATAAGC</b>	<b>TGATAGTGAA</b>	<b>GAACAACACTAC</b>
	6R					
		<i>T</i>	<i>CCACGCATTG</i>	<i>TATTAGGCG</i>		
22196627	<b>CAGGGTCTGG</b>	<b>CCATCGCTCA</b>	<b>GGTCCGTAAC</b>	<b>ATAATCCGCC</b>	<b>AGGTTTTGGA</b>	<b>GGGACTGGAC</b>
22196687	<b>TACCTGCACA</b>	<b>GCAAGTGTAG</b>	<b>CATCATAAC</b>	<b>ACGGACATTA</b>	<b>AGCCGGAGAA</b>	<b>CATCCTGCTG</b>
22196747	<b>GTGATCGATA</b>	<b>ATGCCGCCGC</b>	<b>GATGAACCAG</b>	<b>CAGATCGACG</b>	<b>ATGAGATCAA</b>	<b>CAGTCTGCGC</b>
22196807	<b>GTGAAGGGTG</b>	<b>TCGACTTCCC</b>	<b>CGACTCGTAC</b>	<b>AGTGAGTATC</b>	<b>AGTATCCAAG</b>	<b>TTGAGTTGCC</b>
22196867	AATGGCTAAT	GCGTTCACC	CTTAG <b>TCAGC</b>	<b>TCCATCGAGA</b>	<b>AGCAGACCAA</b>	<b>GTCGCGGGCC</b>
22196927	<b>AAGTGCCAC</b>	<b>TGATCGAGCC</b>	<b>AAATGGATCG</b>	<b>ACCAACACCA</b>	<b>ACACTAACAC</b>	<b>TAGCAATAGC</b>
22196987	<b>ACGGCGACCA</b>	<b>ATTCCAATTC</b>	<b>GTCGACTCCG</b>	<b>CTGGCCGCCG</b>	<b>TGATCATGTC</b>	<b>CACGCTGGAC</b>
22197047	<b>AAGGAGGACA</b>	<b>CCACGACAAC</b>	<b>CACCTCGTCC</b>	<b>ACGCTCAATT</b>	<b>CCAACACCAC</b>	<b>ATCATCGCTG</b>
22197107	<b>GCCTCCAAGT</b>	<b>ACTCCAGTCT</b>	<b>GTTGGGGGAC</b>	<b>AGCGAGTGCA</b>	<b>ACGGAGGCCT</b>	<b>CGGCGGATCA</b>
22197167	<b>GCGAACATAA</b>	<b>ACAACCGCTA</b>	<b>CCGAACGGAG</b>	<b>AAGAAAATCA</b>	<b>CTGCCAAGGT</b>	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	<b>TCTTCTGGGG</b>	<b>ATTGCGACGA</b>	<b>AGATGCCGAG</b>
22197467	<b>TCCGACACGC</b>	<b>TGGGCGAGCA</b>	<b>GAGCACCTTG</b>	<b>GCGAGCACCA</b>	<b>TGGATTGCGC</b>	<b>CACCGATCTC</b>
	1/2R					
			<i>GTTCCGGG</i>	<i>TTGTGGCATG</i>		
22197527	<b>GATCCCGAAC</b>	<b>CCGAACTCGA</b>	<b>TTCCAAGCCC</b>	<b>AACACCGTAC</b>	<b>CCGAGCCAAG</b>	<b>TGAAGGACCG</b>
22197587	<b>ATCCAGAGG</b>	TAAAGTGGGT	TGGATGCGGG	ATAGTTGTTA	GTGATAGCCC	GGTCATTAGA
22197647	AAGAACCGCT	GGATAATCTG	TTCCACTTTG	GATTATATGT	GTTGTTATTT	GGGGCAAAT
22197707	CCGCTCTCT	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	AAAGTTCAAA	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	ATTGTAECTT
22198247	ATTATTGTAG	AGGCATTTCT	ATATTAAACC	TCCAGTGGCA	TGTCCAACCTC	AGCATATCAC
22198307	TGGGAGAGTA	ATCCGTGGCA	ATCACCGCTA	GGGTTTCGAC	ACGCAATCCG	AGCGTTGACT
22198367	GCCACGTCGT	TTGTGTTTCG	TTAATTGCAC	CAACTAGATA	AACCTTCAAA	GAAGCAAACC
22198427	AACATTGTGT	ATTCTTTTTT	TTCCTTTCTT	TGTGTGAACC	AATTTACATG	TATGCAACAC
22198487	ACTGCTATAC	AAACACGATG	CAGCAGCCCA	CCCCGAACCTC	CACCAATAGC	TCCTGCCCCT
22198547	CCCACAACAC	AGCCACGATA	GCTAAGTCCA	AGATCAACTC	GAATATTCTG	AGCACGTGCA
22198607	CGTCCTTGAC	ATCGACCAAC	GAATACTGTT	TCACCAACAC	GAACACCACA	ACAGCCTCCA
22198667	CACCAAGTGC	CCCTCCAAGT	GCCACTCCTT	CCTCCGCCCC	TGCCTTAGCC	TCTGCCACGC
22198727	CCCCCAGCAC	GTGCACGCC	TCGTTACAGC	AAATAGCTCC	TTCTGCAACA	GCTCCGGCTA
22198787	CCAGTACAAC	CTGTACAACA	TCAGCCGAGT	TCTATGATGG	CGATCATAAA	ACAACAAGCA
22198847	CATCAACAAC	AACAACATCC	AATGCGATAT	CCTCCGCAAC	AACAACAACC	GCGACAACGA
22198907	CAACAGCAAT	CGCTAAACTA	AATGTCCATG	CTAATGCCAT	TCCTTCGCAG	<b>AACCAGAGTC</b>
22198967	<b>AGAGTAGCCA</b>	<b>GAACAACACC</b>	<b>TACACGATCC</b>	<b>AGTCGCTCAT</b>	<b>TGACAACAGC</b>	<b>AACGTT</b> <b>CGGG</b>
22199027	<b>TAAAGATCGC</b>	<b>CGACTTGGGG</b>	<b>AACGCCTGCT</b>	<b>ACGAC</b> GTGAG	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

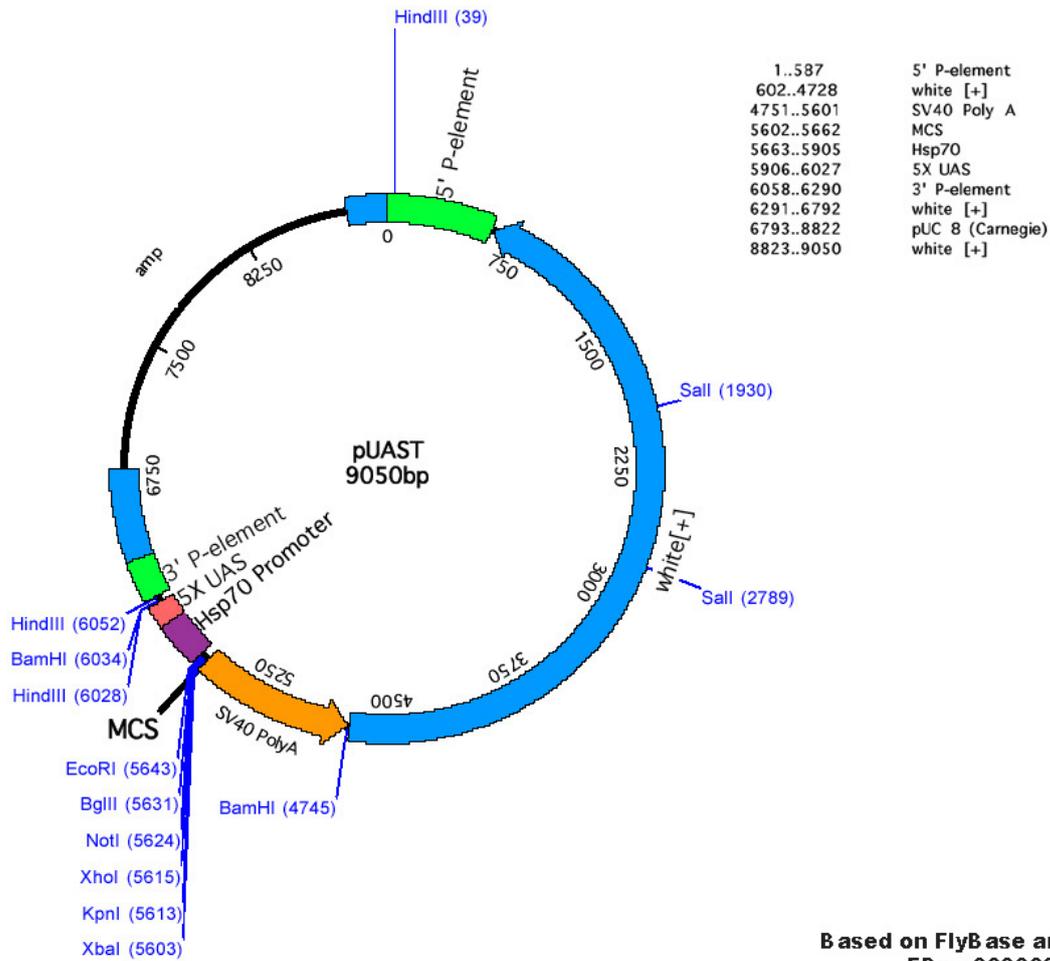
22199327	TTCATACGGA	CAGAAGAACA	AACGAACATG	GCTATATGGC	ATCCAAAATA	ACACTTCACT
22199387	CTACCTGTTA	CATACTTTTC	AATGATTCTA	GTGAACCCTT	TTACTTTACT	TTAAAGGGGG
22199447	TATGGAGTTA	TTTGTACTTT	AGATTCTTCC	GATTCGGTAT	AAACCAATTT	TTTGCCATTA
22199507	TTCTATTACG	GTTTTTATTT	TATTAGAATG	GGACCAATTG	TCTATAGAAA	ATGCAAATCA
22199567	GAAAATTTCA	AGAAATCAGG	TCTACCTAAA	TAGTGGACGT	GGGAGGGATA	ATTTTCCGAA
22199627	TTGAGGGCGT	GACAGTTTTT	TGTGGTTTTGT	AGGCATTAGA	GTGGGCAAAA	TGTTTTGGCA
22199687	TATCAATAGA	AATTGCAAGG	CAGAAGGACA	TGGCCAGATA	AACTCTTCTA	GTAATCCTGA
22199747	CCGAGAATAT	ATACCTTTTA	AGGTCGGAAA	CACGACCCCG	CACATGGTTT	TCAAAAGTAA
22199807	TAAGTCCGTT	TTCGGCTTTC	TATGAATTCT	CAG <b>TACCATC</b>	<b>ACTTTACTGA</b>	<b>GGACATTCAG</b>
22199867	<b>ACTCGCCAGT</b>	<b>ATCGATCAAT</b>	<b>CGAGTTCTT</b>	<b>TTGGGAGCGC</b>	<b>CGTACAATTA</b>	<b>TACCGCCGAC</b>
22199927	<b>ATCTGGAGCA</b>	<b>CAGCCTGTTT</b>	<b>GGCCTTCGAG</b>	<b>CTGGCCACCG</b>	<b>GCGACTACCT</b>	<b>GTTGACCCCT</b>
22199987	<b>CACGCCGGAG</b>	<b>AGTCTTACAG</b>	<b>TCGGGACGAG</b>	<b>GACCACTTGG</b>	<b>CGCATATTGT</b>	<b>GGAGCTGCTG</b>
22200047	<b>GGCTCCATAC</b>	<b>GGCAGTCGGT</b>	<b>GATCTTCCGC</b>	<b>GGTAAGCAAG</b>	<b>GGCTGAAGTA</b>	<b>CTTCACCAGC</b>
22200107	<b>TATG</b> GTAGGT	ATCAAATCGA	ATTTAGCTCA	AGGAATGGTG	TGTGATGTGT	GACCCCTGTT
22200167	GATTCCCATT	TGCAG <b>GTAGC</b>	<b>CTGAGGAACA</b>	<b>TCACCAAAGCT</b>	<b>GAAGCCCTGG</b>	<b>AGTCTAATGA</b>
22200227	<b>ACGTGCTGGT</b>	<b>GGAGAAGTAC</b>	<b>GACTGGGACC</b>	<b>CGGTGGAGGC</b>	<b>CAAGAAGTTC</b>	<b>TCCGACTTTC</b>
22200287	<b>TGCTGCCCAT</b>	<b>GCTTGAGTAC</b>	<b>AATCCGGTTA</b>	<b>TACGGGCGTC</b>	<b>GGCAGCGGAG</b>	<b>TGCCTGCAGC</b>
			GFPcNotanti			
		<i>CTC</i>	<i>CTCAAGCAGC</i>	<i>GCCGGCGAAA</i>	<i>A</i>	
			attB5r-EGFP			
	<i>CCAA</i>	<i>CCTCGTCCTC</i>	<i>CTCAAGCAGC</i>	<i>CTTGTTGAAA</i>	<i>CATATGTTTT</i>	<i>CAACAGGGG</i>
22200347	<b>ATCCGTGGTT</b>	<b>GCAGCAGGAC</b>	<b>GAGTTCGTT</b>	<b>AAGAGGCTCA</b>	<b>TGGAGTGACT</b>	<b>AGACAGCCAG</b>
22200407	<b>AGAGACACAG</b>	<b>GCATAGGCAC</b>	<b>AGTAAAATAT</b>	TGCATACATA	ACATACGTAT	TTCGTAICTCG
22200467	TATTGTATTT	CTAGGCTTAA	<b>CTTTTATATG</b>	<b>CAAACAATTT</b>	<b>GCCATAAAGA</b>	<b>GGAGGTAGCA</b>
22200527	<b>GGAAAATGGG</b>	<b>ATGAGGAGCT</b>	<b>AGCATTAAAG</b>	<b>GACTCGATCG</b>	<b>AAGCACACAC</b>	<b>ATTTTCACT</b>
22200587	<b>TACGAAATGC</b>	<b>GGACGATGTG</b>	<b>GGGGCGTTCC</b>	<b>GCGTCGAATT</b>	<b>TTTTAAGCTT</b>	<b>TTTAATTTTT</b>
22200647	<b>GTACTTGAGA</b>	<b>GCTTTAAAAT</b>	<b>GTAATTACTA</b>	<b>AAGAAGCGAT</b>	<b>TTTACTTTTA</b>	<b>ACGACAAAAG</b>

---

22200707	CAAACGAGAG	AAGTAGCGCA	AATGTTTTTC	AAGTTTTATT	TCGACGACGT	GCATATAAGT
22200767	ATATACATAC	ATATACACAT	ATATTTTTTA	TTAACTGAGA	AACAAAAACA	AAAGACAATG
22200827	ACGACAATTT	TTAGTCAACA	GATGCCATAA	CTGACTGACT	GAAAAGGAAT	ACATTTTCAT
22200887	GCGAAACCAA	GTAAAACCAA	ATCAGTGAGA	AATGCTAAAT	AGATTGTACG	AACTAGCAAA
22200947	ATATTCAGCA	TCACATAAAT	AACAATACCT	TCTATAATAT	TAATAAGCAA	GSTATGTGTAT
22201007	AATTAACGAA	ACCCCATTGT	AGATATCGAG	AATGTTTACA	AATACAGATG	TAAACTCAAA
22201067	TATTGACAGC	TTTTTAGCAG	AGTGTAGTGA	TTTTGGTACA	TTTAACCGAA	CCCATTTGTA
22201127	GATGTTTAGG	CCTATGTTGA	TTACGAGCAG	ATTTGAAAAG	ATGCCCTACT	TACCCGATTT
22201187	CGGTTTGCAA	AACTTATCAT	TTAACCATCC	GTGAAAAAGA	ACCTATCCCA	GATCATGTAA
22201247	TTCAAAAAGA	ATTAAAAACA	ATAATAAATC	ATTGCATAAA	AGTCTTTGTA	TCGGAATTGA
22201307	AAACTCAAAA	TCGAAATTTA	AATACTACCA	ATGATAACTA	CTGAGAAATC	ATATTACAAA
22201367	ATAACGAAAA	CATATTTTAC	TACTTGCCTA	CAAGTATTTG	TACACAAGCC	TACAAAGTAA
22201427	CATTGAACGT	GACCAAATAA	TTAATATATG	CGGAAGATTT	TTCCCCAAA	CTCATATTTA
22201487	ATATACACAC	ACGTGTGCGC	ATGTGTCCAA	ATGAAATTTA	ACAGAAATTG	AAGCGGAGGA
22201547	GCTGCACGTT	CGCGGGAGTG	GACACATATT	TCAATAAGCC	GAAATAAAGA	ATATACATAC
22201607	CGATCCGA					

## 10.2 Vektoren

### 10.2.1 pP[UAST] (Brand und Perrimon, 1993)

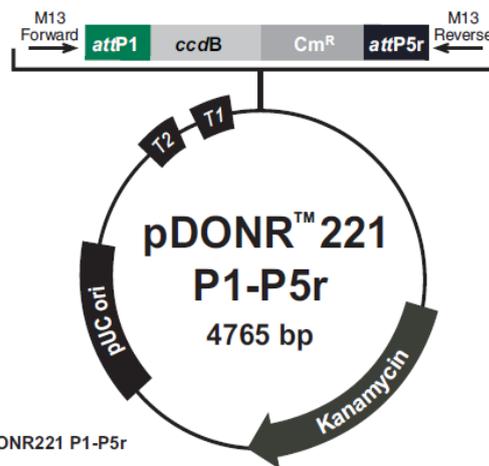


Based on FlyBase annotation  
FBmc0000383

Quelle:

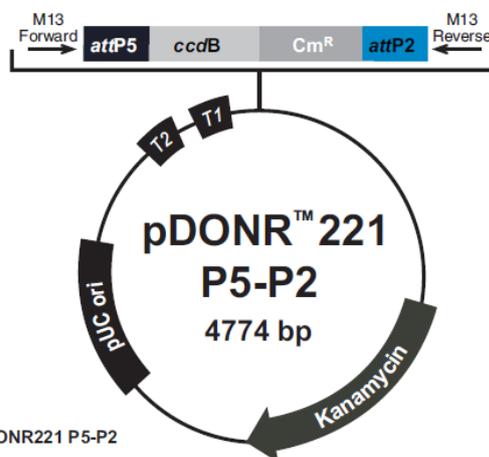
<http://dgrc.cgb.india-edu./images/vectors/maps/1000annotated-map.jpg>

## 10.2.2 MultiSite Gateway® Pro Donor-Vektoren



Comments for pDONR221 P1-P5r  
4765 nucleotides

*rrmB* T2 transcription termination sequence: bases 268-295 (c)  
*rrmB* T1 transcription termination sequence: bases 427-470 (c)  
 M13 Forward (-20) priming site: bases 537-552  
*attP1* recombination site: bases 570-801  
*ccdB* gene: bases 1200-1502 (c)  
 Chloramphenicol resistance gene: bases 1847-2506 (c)  
*attP5r* recombination site: bases 2753-2984  
 M13 Reverse priming site: bases 3030-3046 (c)  
 Kanamycin resistance gene: bases 3159-3968  
 pUC origin: bases 4089-4762  
 (c) = complementary strand



Comments for pDONR221 P5-P2  
4774 nucleotides

*rrmB* T2 transcription termination sequence: bases 268-295 (c)  
*rrmB* T1 transcription termination sequence: bases 427-470 (c)  
 M13 Forward (-20) priming site: bases 537-552  
*attP5* recombination site: bases 570-801  
*ccdB* gene: bases 1197-1502 (c)  
 Chloramphenicol resistance gene: bases 1847-2506 (c)  
*attP2* recombination site: bases 2753-2984  
 M13 Reverse priming site: bases 3039-3055 (c)  
 Kanamycin resistance gene: bases 3168-3977  
 pUC origin: bases 4098-4771  
 (c) = complementary strand

Quelle: MultiSite Gateway® Pro User Manual von Invitrogen

Die komplette Sequenz ist abrufbar auf [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

### 10.3 Aminosäure-Sequenz des SRPK79D-PE-EGFP Fusionsproteins

Die *Srpk79D-RE*-cDNA und die *eGFP*-cDNA wurden durch MultiSite Gateway® Pro 2-Fragment Rekombination so in den Destination-Vektor *pTW* kloniert, dass sich die Aminosäure-Abfolge der SRPK79D-PE-Isoform am N-Terminus des Fusionsproteins befindet, an die C-terminal die Aminosäure-Sequenz für EGFP angehängt wird. Damit dieses Fusionsprotein entstehen kann, wurde das Stop-Kodon umgewandelt in ein Kodon für die Aminosäure Glycin (G), die rot abgebildet ist. Gelb hinterlegt ist die Aminosäure-Sequenz, die aus den Rekombinationssequenzen (*att sites*) resultiert.

MDDFGSTASDLEEATCPMQANATFSIDWRVTLLDHWLDLYLGYMNRLHMLLSLAGRLHLL  
SRHILGTLGQDPIFMGVLQGSLLMLFLFLMHLRLWSCGYAVERPLNPTPDVAKELSCDFNF  
VSEQEKRAAQEAATEALLEVEEKKRRKRFTKKRNCVSAGPILIALRHQSKRPKHHRHAALP  
FEPVTPGEIILDITYLPPRELPLTIRLPQLAEPVKEEEVEYIELKSEPRGTLSTTDEIYPDSSDSSL  
YVSDEEQEDASQYCRGGYHPVVIGDIFDNRFRVVRKLGWGHFSTVWLCRDLKDEKYVAL  
KVVKSAPHYIETADEIRLLEAIRDADPMDVKRERIVRLMNHFTVRGVNGMHTCLVFEAL  
GCSLYKLIVKNNYQGLAIAQVRNIIRQVLEGLDYLSKCSIIHTDIKPENILLVIDNAAAMNQ  
QIDDEINSLRVKGVDFPDSYISSIEKQTKSRAKWPLIEPNGSTNTNTNTSNSTATNSNSSTPLA  
AVIMSTLDKEDTTTTTSSTLNSNTTSSLASKYSSLLGDSECNGLGGSANINNRYRTEKKITA  
KSSGDCDEDAESDTLGEQSTLASTMDSPTDLDPEPELDSKPNTVPEPSEGPENQSQSSQN  
NTYTIQSLIDNSNVRVKIADLGNACYDYHHFTEDIQTRQYRSIEVLLGAPYNYTADIWSTAC  
LAFELATGDYLFDPHAGESYSRDEDHLAHIVELLGSIPQSVIFRGKHGLKYFTSYGSLRNITK  
LKPWSLMNVLVEKYDWDVPVEAKKFSDFLLPMLEYNPVIRASAAECLQHPWLEQEEFVEGQ  
LCIQKLMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPV  
PWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE  
GDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV  
QLADYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELY  
K

### 10.4 Signifikanz-Werte für den Flugversuch

In dieser Tabelle sind alle Werte des Student's T-Test mit Bonferroni-Korrektur bei 45 möglichen Paarungen für alle auf ihre Flugfähigkeit hin untersuchten Genotypen aufgelistet (siehe Punkt 3.10.2 in Ergebnisse).

Geno- typen	A1	A2	B1	B2	C	D	E	F	G	H
A1	X	18,434	0,0120	0,0499	0,0005	8,7463	0,0064	0,0005	0,0015	0,0004
A2	X	X	0,0006	0,0079	0,2103	8,8625	0,0006	3,137 E-06	7,511 E-06	1,238 E-05
B1	X	X	X	17,514	1,9813	0,0001	9,6141	5,8288	14,856	1,8205
B2	X	X	X	X	4,4078	0,0021	7,5352	4,8040	11,222	1,6630
C	X	X	X	X	X	0,0512	0,6715	0,1570	0,5530	0,0640
D	X	X	X	X	X	X	0,0002	9,454 E-07	2,027 E-06	4,110 E-06
E	X	X	X	X	X	X	X	21,214	13,398	9,7096
F	X	X	X	X	X	X	X	X	7,387	7,5384
G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,0954
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Die Bezeichnung der einzelnen Genotypen mit Buchstaben ist die gleiche wie im Ergebnisteil und hat folgende Bedeutung:

A1: Wildtyp  $CS^{45}$

A2: Wildtyp  $w^{1118}$

B1:  $SrpK79D^{VN}$

B2:  $SrpK79D^{VN(CS)}$

C:  $w,elav-Gal4;;$

D:  $w;;UAS-RNAi-Brp(C8)$

E:  $w,elav-Gal4/w;;UAS-RNAi-Brp(C8)/+$

F:  $w,elav-Gal4;;SrpK79D^{VN}$

G:  $w;;UAS-RNAi-Brp(C8),SrpK79D^{VN}$

H:  $w,elav-Gal4/w;;UAS-RNAi-Brp(C8),SrpK79D^{VN}/SrpK79D^{VN}$

## Danksagung

Ganz besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Erich Buchner für die Betreuung der Doktorarbeit, das entgegengebrachte Vertrauen und das Verständnis, sowie die Hilfe bei allen Problemen. Es war eine sehr angenehme Atmosphäre in dieser Arbeitsgruppe.

Ein herzliches Dankeschön geht an Prof. Dr. Thomas Raabe für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin danke ich den Instituts-Vorständen Prof. Dr. Martin Heisenberg emeritus und Prof. Dr. Charlotte Helfrich-Förster.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Georg Krohne, sowie die Technischen Assistentinnen der Abteilung Elektronenmikroskopie, Daniela Bunsen und Claudia Gehrig, für die großartige Hilfe bei der Durchführung der elektronenmikroskopischen Experimente.

Vor allem möchte ich Alice Schubert danken, die mir in der ganzen Zeit eine gute Freundin geworden ist. Wir waren ein gutes Team und ich werde Dich vermissen, wenn wir nicht mehr im gleichen Labor zusammen arbeiten.

Großer Dank geht auch an Soeren Diegelmann für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung des MultiSite Gateway® Cloning und so manch lustigen Abend ☺. Jörg Kleber hat bei der Erstellung der Karte des Destination-Vektors mit Hilfe des Programms SerialCloner sehr geholfen. Auch für manche Mini-Prep herzlichen Dank.

Danke an Christian Wegener für die Bereitstellung eines Antiserums und einer Fliegenlinie zur Durchführung von Experimenten.

Vielen Dank an Bertram Gerber, Birgit Michels, Timo Saumweber und Yi-chun Chen für die Hilfe bei der Durchführung der larvalen olfaktorischen Konditionierung und die nachfolgende Auswertung der Ergebnisse.

Vielen Dank an Benjamin Schmid, weil er immer zur Stelle war, wenn das Konfokalmikroskop mal

---

wieder nicht so wollte wie ich. Auch die Tiefen von Image J hat er mir etwas näher gebracht.

Vielen Dank an Andreas Eckart. Er hatte für jedes Computer-Problem zum Glück eine Lösung.

Danke auch an alle aktuellen/früheren Kollegen: an Vanessa, von ihr wurde das SRPK79D-Projekt übernommen; an Burkhard Poeck und Nicolai Peschel für Hilfe bei molekularbiologischen Problemen; an Tulip Nuwal und Partho Halder für Tipps zur Durchführung von Western Blots; an Susanne Clemens-Richter für Fliegen und Paraffin-Schnitte; an Dieter für Kryostat-Schnitte; an Alexander Kapustjanskij für die Bestellung der Verbrauchsmaterialien; an Nidhi Nuwal und Dan Bucher.

Danke an die Sekretärinnen Margit Mohr und Irina Stahl für alles Organisatorische, sowie alle technischen Assistentinnen, die jeden Tag dafür gesorgt haben, dass „der Laden läuft“, vor allem an Sylwia für die Herstellung der Breigläser zur Fliegenzucht.

Danke auch an alle Kollegen, die hier nicht namentlich erwähnt sind. Es war eine schöne Zeit am Lehrstuhl.

Danke sagen möchte ich außerdem den Richtern am Amtsgericht – Familiengericht – Würzburg und am Oberlandesgericht Bamberg, die mir das Recht auf Promotion zusprachen.

Finanziert wurde die vorliegende Doktorarbeit durch die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) im Rahmen der Sonderforschungsbereiche (SFB) 581 „Molekulare Modelle für Erkrankungen des Nervensystems“ und 554 „Mechanismen und Evolution des Arthropodenverhaltens: Gehirn-Individuum-Soziale Gruppe-Superorganismus“.

Zu guter Letzt möchte ich zum einen meinen Eltern danken für die uneingeschränkte Unterstützung während der letzten Jahre, und zum anderen meinen beiden Schwestern einfach für alles, was sie für mich getan haben.

Der allergrößte Dank geht an meine beiden Söhne, die so geduldig auf die Zeit nach dem Schreiben gewartet haben, und für die ich jetzt endlich wieder mehr Zeit habe.

**Meine Kinder sind mein größtes Glück!**

## Curriculum vitae

---

### Persönliche Daten

Name: Mandy Jauch  
Geburtsdatum/-ort: 09.01.1979/Pirna

---

### Promotion

April 2007 – Dezember 2010      Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Arbeitsort                              Universität Würzburg, Lehrstuhl für Neurobiologie &  
Genetik, Biozentrum, Am Hubland, Würzburg  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Erich Buchner

### Titel der Arbeit

„Die Serin/Arginin Proteinkinase 79D (SRPK79D) von *Drosophila melanogaster* und ihre Rolle bei der Bildung Aktiver Zonen von Synapsen“

### Erlernete Methoden

- Immuno-Histochemie
- Immuno-Fluoreszenzmikroskopie
- Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
- Elektronenmikroskopie
- Immuno-Elektronenmikroskopie
- DNA-präparative Methoden
- RNA-präparative Methoden
- Protein-präparative Methoden
- Arbeiten mit Bakterien
- Verhaltensversuche
- Zellkultur (während Diplomarbeit)

---

**Hochschulausbildung**

---

Oktober 2005 – Juni 2006                      Diplomarbeit  
Note: 1,3  
Arbeitsort    Zentrum für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ), Würzburg  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Raabe

Titel der Arbeit

„Interaktion der regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit der Casein Kinase II (CK2) von *Drosophila melanogaster* mit anderen Serin/Threonin-Kinasen“

August/September 2005                      Diplomprüfungen  
Abschluss: „Diplom-Biologin“, Universität  
Note: **1,3**  
Hauptfach: Genetik  
Nebenfächer: Biochemie, Biotechnologie

WS 2002/03 – SS 2005                      Beurlaubung vom Studium wegen Kindererziehung

WS 1998/99 – SS 2002                      Studium der Biologie,  
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

WS 2000/01 – SS 2002                      Hauptstudium mit Diplom

WS 1998/99 – SS 2000                      Grundstudium mit Vordiplom,  
bestanden am 05.10.2000  
Note: gut  
Fächer: Botanik, Zoologie, Chemie, Physik

## Schulbildung

---

1994-1998	Neusprachliches Gymnasium Memmingen <u>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife</u> Note: <b>2,2</b>
1990-1994	Neusprachliches Gymnasium Ottobeuren
1989-1990	Hauptschule Memmingen und Ottobeuren
1985-1989	Grundschule Dresden und Zwickau

## Publikationen

---

- ◆ Nieratschker V., Schubert A., Jauch M., Bock N., Bucher D., Dippacher D., Krohne G., Asan E., Buchner S. und Buchner E. (2009). *Bruchpilot in ribbon-like axonal agglomerates, behavioral defects, and early death in SRPK79D kinase mutants of Drosophila*. PLOS Genetics Volume 5 (Issue 10): 1-16
- ◆ Jauch E., Wecklein H., Stark F., Jauch M. und Raabe T. (2006). The *Drosophila melanogaster* DmCK2 $\beta$  transcription unit encodes for functionally non-redundant protein isoforms. Gene Volume 374: 142-152 (während Diplomarbeit)

## Vorträge

---

- ◆ „Bruchpilot in ribbon-like axonal agglomerates, behavioral defects and early death in SRPK79D kinase mutants of *Drosophila melanogaster*“ (2009): Symposium zu Ehren von Prof. Dr. Erich Buchner
- ◆ „Bruchpilot in ribbon-like axonal agglomerates, behavioral defects and early death in SRPK79D kinase mutants of *Drosophila melanogaster*“ (2009): Seminar des SFB 581 „Molekulare Modelle für Erkrankungen des Nervensystems“

## Tagungen/Kongresse/Konferenzbeiträge

---

- ◆ Schubert A., Jauch M., Nieratschker V., Bucher D. und Buchner E. (2010): „Axonal Bruchpilot accumulations, behavioral defects and early death in SRPK79D kinase mutants of *Drosophila*“ (Poster). Tagung des SFB 554/Teilprojekt A-2 „Mechanismen

und Evolution des Arthropodenverhaltens: Gehirn-Individuum-Soziale Gruppe-Superorganismus“ im Kloster Bronnbach

- ◆ Schubert A., Jauch M., Nieratschker V., Dippacher S., Asan E. und Buchner E. (2009): „SRPK79D – a new serine/threonine protein kinase in *Drosophila melanogaster*“ (Poster). Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V. Göttingen
- ◆ Bloch A., Jauch M., Nieratschker V., Asan E., Dippacher S. und Buchner E. (2008): „SRPK3 – a new serine/threonine protein kinase in *Drosophila melanogaster*“. Neurofly Würzburg
- ◆ Bloch A., Jauch M., Nieratschker V. und Buchner E. (2008): „The SR protein kinase 79D of *Drosophila melanogaster*“. Tagung des SFB 581 „Molekulare Modelle für Erkrankungen des Nervensystems“ im Kloster Bronnbach

Würzburg, den 08. Dezember 2010

---

Mandy Jauch