

Das Cysteine String Protein in *Drosophila melanogaster*:

Molekulare und funktionelle Analyse verschiedener CSP-Mutanten

Ein Modell zur räumlich und zeitlich kontrollierten CSP-Expression

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

vorgelegt von

Nataša Reisch

aus

Grünstadt

Würzburg, 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter :

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

1. EINLEITUNG	4
1.1. Die Synapse	5
1.2. Der SNARE-Komplex	6
1.3. Das CSP-Protein	8
1.4. Einzelne Domänen und Interaktionspartner von CSP	13
1.4.1. Die DnaJ-Domäne: Interaktion mit Hitzeschockproteinen.....	14
<i>Der trimere Chaperon-Komplex</i>	<i>15</i>
<i>In vivo Interaktion zwischen dem Hsc70-Drosophila-Homolog Hsc4 und CSP.....</i>	<i>17</i>
<i>Eine mögliche Rolle von CSP-Chaperon-Komplexen in neurodegenerativen Prozessen.....</i>	<i>18</i>
1.4.2. Interaktion mit Syntaxin, der Synprint Site der Ca ²⁺ -Kanäle und Gβγ	19
<i>Vorgänge in der Präsynapse während eines Aktionspotentials</i>	<i>19</i>
<i>Gβγ-Untereinheiten regulieren N-P/Q-Typ Ca²⁺-Kanäle via der Synprint Site</i>	<i>19</i>
<i>Syntaxin interagiert mit Gβγ und der Synprint Site.....</i>	<i>20</i>
<i>Gβγ interagiert mit CSP</i>	<i>22</i>
<i>Beschriebene Interaktionen von CSP und Syntaxin</i>	<i>23</i>
1.4.3. Interaktionen mit dem potentiellen Ca ²⁺ -Sensor Synaptotagmin.....	24
1.5. Aufgabenstellung	27
2. MATERIAL	28
2.1. Bakterien und Fliegenstämme.....	28
2.2. Vektoren und Marker	29
2.3. Oligonukleotide und Radionukleotide.....	30
2.4. Immunglobuline	30
2.5. Chemikalien und Reaktionskits	30
2.6. Medien und Pufferlösungen	31
2.7. Enzyme	33
2.8. Geräte und Hilfsmittel	33

3. METHODEN	34
3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden	34
3.1.1. DNA-präparative Methoden	34
3.1.2. Single Fly PCR	34
3.1.3. Linker-PCR und DNA-Sequenzierung	34
3.1.4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	35
3.1.5. RNA-präparative Methoden	35
3.1.6. Northern Blot	36
3.2. Membranfraktionen	36
3.3. Dichtegradientenzentrifugation	37
3.4. Immunpräzipitation	38
3.4.1. Verwendung von ProteinA-Agarose Beads der Firma GIBCO BRL	38
3.5. Western Blot Analyse	39
3.6. Immunhistochemie an Kryostatschnitten von <i>Drosophila melanogaster</i>	40
3.7. Keimbahntransformation	40
4. ERGEBNISSE	41
4.1. Biochemische und phänotypische Analyse verschiedener CSP-Mutanten	41
4.1.1. Das mutierte CSP-Protein	41
4.1.2. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Western Blot	44
4.1.3. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Membranfraktionen	46
4.1.4. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Glycerindichtegradienten	51
4.1.5. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Immunpräzipitation	56
4.1.6. Immunhistochemische Analyse der transgenen Mutanten	61
4.1.7. Phänotypische Charakterisierung der transgenen Mutanten	63
4.2. Räumlich und zeitlich kontrollierter Verlust der CSP-Expression in <i>Drosophila melanogaster</i>	66
4.2.1. Erzeugung eines CSP-Mosaiks in <i>Drosophila melanogaster</i> mithilfe des Flippase/FRT-Systems aus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66

4.2.2. Klonierung der FRT-Vektoren pS49-9 2xFRT und pCaCSP2xFRT	67
4.2.3. Funktionalität der Konstrukte	71
4.2.4. Spezifische Deletion des <i>Csp</i> -Gens	73
4.3. Der <i>Csp</i> -Genlocus 79 D3-4	78
4.3.1. Die Gene CG11523 und CG11489.....	80
4.3.2. Analyse der genomischen Situation	82
5. DISKUSSION	85
5.1. Verschiedene CSP-Mutanten	85
5.1.1. Welche Bedeutung hat die Palmytylierung für das Protein CSP?	85
5.1.2. Interaktionen zwischen CSP und anderen synaptischen Proteinen	90
5.2. Räumlich und zeitlich kontrollierter Verlust der CSP-Funktion in <i>D. melanogaster</i>	93
5.3. Der <i>Csp</i> -Genlocus 79 D3-4	96
6. ZUSAMMENFASSUNG	99
7. LITERATUR	104
8. ANHANG	113
9. ABKÜRZUNGEN	122

1. EINLEITUNG

Die Molekularbiologie und Biotechnologie unterliegen den Modetrends unserer Zeit und werden heute durch Schlagworte wie Genomics und Proteomics geprägt. Nach der vollständigen Sequenzierung ganzer Genome ist der „Run“ auf die patentierbaren Gene eröffnet. In der Pharmaindustrie steht Genomics für die Beziehung zwischen Genaktivität und Krankheit, unter dem Schlagwort Proteomics sind die Proteininteraktionen eines Organismus auf die Verbindung zwischen Genen, Proteinen und Krankheiten reduziert. Der dadurch entstandene Markt wird auch unter Pharmacogenomics zusammengefasst. Die Fülle an Daten, die durch die verbesserten und automatisierten molekularbiologischen Prozesse anfallen, sind mit den vorhandenen Ressourcen kaum auszuwerten. Daher legt die Pharmaindustrie Betonung auf Volkskrankheiten wie Herzinfarkt, Hirninfarkt, Adipositas und neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson. Dem gegenüber stehen die unzähligen mutierten Sequenzen von Proteinen, die auf phänotypische Veränderungen analysiert werden, sei es durch Inkubation mit unbekanntem Substanzen oder Beeinflussung von Genexpressionen. Die Liste an Möglichkeiten ist sehr lang.

Durch erweiterte Sequenzdatenbanken werden nun auch einzelne Sequenzpolymorphismen eingespeist (Altshuler et al 2000). Diese allgemeinen genetischen Variationen, SNPs (single nucleotide polymorphisms) gesehen über das gesamte Genom zeigen eine relative Häufigkeit von über einem Prozent in der Population. Ein Phänomen, welches als LD (linkage disequilibrium) bezeichnet wird, zeigt ein Muster von mehreren SNPs, die charakteristisch für bestimmte Krankheiten sein könnten.

Nicht der methodische Ansatz, sondern die Interpretation der Daten ist heute der limitierende Faktor. Die lange gültige Formel „Ein Gen, ein Protein“ wird nun von der vernetzten Betrachtung von genetischen Interaktionen und Gleichgewichten, von Expression und Regulation durch wiederum regulierte und regulierbare Proteine abgelöst. Es gibt oft nur eine schwache Korrelation zwischen dem Level der Aktivität verschiedener Gene und der relativen Häufigkeit der korrespondierenden Proteine. Trotz der nun zugänglichen Sequenz des menschlichen Genoms wird es noch einige Jahre und Jahrzehnte an Forschung und Auswertung in Anspruch nehmen, bevor Prozesse in der Zelle ansatzweise und schließlich vollständig verstanden werden.

Der Trend, die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten zu nutzen, ohne die Vorgänge im

Detail zu verstehen und kontrollieren zu können, zeigt sich in den vermehrten Klonversuchen an Tieren und ebenso in der Diskussion der Stammzellforschung. Das ethische Verständnis gegenüber unserem Leben verliert durch die ungeahnten Möglichkeiten der Manipulation des Genoms möglicherweise seinen Stellenwert.

Drosophila melanogaster gilt seit Jahrzehnten als Modellorganismus der Genetik und Molekularbiologie, seit kurzem ist auch hier die vollständige genomische Sequenz zugänglich (Adams et al 2000).

1.1. Die Synapse

Die Informationsflut, die täglich auf uns einströmt, wird automatisch gefiltert und wird so vorselektiert wahrgenommen. Autisten sind mit dieser Flut von Eindrücken überfordert, hier greifen die sonst gut koordinierten Filtersysteme unserer Wahrnehmung anders ineinander. Die Weiterleitung und Verarbeitung der Umweltreize wird nicht zuletzt vom menschlichen Gehirn gesteuert. Dies wird von den ca. 100 Milliarden Neuronen bewerkstelligt, die durch Synapsen miteinander verbunden sind und so ein hochkompliziertes neuronales Netzwerk entstehen lassen. Eine der bestuntersuchten und verstandenen Arten der regulierten Exozytose ist die chemische synaptische Transmission, welche dem Nervensystem als hauptsächliche Zell-Zell-Kommunikationsmöglichkeit dient. Seit nunmehr einem halben Jahrhundert wird die Exozytose synaptischer Vesikel untersucht (Fatt und Katz 1952, Lin und Scheller 2000). In den chemischen Synapsen werden zur Weitergabe eines Stimulus mit Neurotransmittern angereicherte Vesikel in den synaptischen Spalt freigesetzt. Die postsynaptische Seite nimmt wiederum diesen chemischen Stimulus auf und leitet ihn über komplizierte sensitive Kaskaden weiter. Die Freisetzung der Neurotransmitter erfordert eine Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Ebenso zwingend ist die Involution von Plasmamembran in der Endozytose zur Regeneration der synaptischen Vesikel. Dieser Vesikelkreislauf unterliegt genau regulierten und zeitlich festgelegten Prozessen. Einige der beteiligten Proteine sind inzwischen charakterisiert und in die entsprechenden Abläufe eingeordnet, dennoch tauchen immer neue Proteine auf, welche das Netzwerk von neuem verknüpfen und Lösungen für bisher unbeantwortete Fragen bieten.

1.2. Der SNARE-Komplex

Die jahrzehntelange Forschung hat einen Katalog von Proteinen zutage gefördert, die in der Vesikelsynthese, Targeting, Mobilisation, Docking, Priming, Fusion und Recycling wichtig sind. Basierend auf genetischen, biochemischen, strukturellen und funktionellen Experimenten wurden Modelle erstellt, die ihre Funktion beschreiben. Das Herzstück dieser Modelle ist die SNARE-medierte Membranfusion. Viele der erwähnten wichtigen Synapsenproteine wirken sich durch ihre Modifikation des SNARE-Komplexes (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) aus, indem sie ihn assoziieren oder dissoziieren. Das heutige Verständnis der SNARE-Proteine unterscheidet zwischen Q-SNAREs und R-SNAREs. Die den neuronalen SNARE-Komplex, oder auch Core Komplex formenden Proteine sind die an die Plasmamembran gebundenen Proteine Syntaxin1 und SNAP25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa), so wie das an die Vesikel gebundene VAMP2 (vesicle associated membrane protein auch Synaptobrevin genannt; Abb 1.1). Syntaxin und VAMP besitzen eine C-terminale Transmembrandomäne und sind so in der Membran verankert, während das Protein SNAP25 über Palmitylreste an die Membran gebunden ist. Syntaxin besitzt eine H3 Domäne, die sich der Transmembranregion anschließt und kann andere SNAREs binden (Abb1.1).

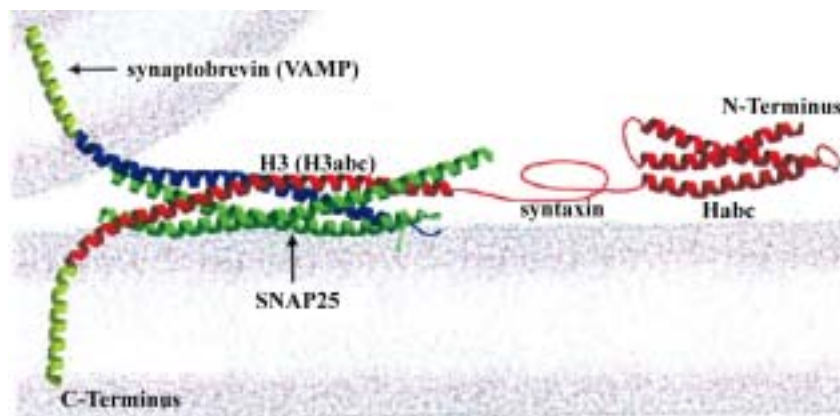


Abb. 1.1 Modell des SNARE-Core-Komplexes, die Syntaxin H3 (H3abc) Domäne interagiert mit den coiled-Coil-Domänen von SNAP25 und Synaptobrevin. Die einzelnen Domänen von Syntaxin sind beschriftet (siehe auch Abb 1.7), weitere Informationen sind im Text zu finden. Modifiziert nach Littleton et al 2001

Der N-terminale Teil wird durch die Domänen Ha, Hb und Hc beschrieben und bindet die H3 Domäne, so wird eine Bindung von SNAP25 oder VAMP verhindert. SNAP25 enthält zwei coiled-Coil-Regionen, die in der Mitte von einer cysteinreichen Region getrennt werden. VAMP ist durch eine lange coiled-Coil-Domäne gekennzeichnet, die den Großteil des zytosolischen Anteils beschreibt. Diese drei Proteine bilden ein 4-Helixbündel, indem sie sich über induzierte Helices in den eher unstrukturierten Proteinen VAMP und SNAP25 parallel anordnen. So werden Vesikel und Plasmamembran in enge Nachbarschaft gebracht. Diese vier assoziierten α -Helices können in 16 Schichten (+8 bis -7) von interagierenden Aminosäuren unterteilt werden und sind teilweise ähnlich gepackt wie die interagierenden Aminosäuren in tetrameren „Leucine-Zipper“ Proteinen. Sie werden durch die zentrale verborgene Schicht 0, die stark konservierte ionische Interaktionen zwischen Glutaminresten von Syntaxin und SNAP25 (Q-SNAREs) und dem Argininrest von VAMP (R-SNARE) zeigt, und den hydrophobischen Wechselwirkungen in den anderen Schichten zusammengehalten (Sutton et al 1998). Die ineinanderverschlungenen coiled-Coil-Domänen reichen bei Syntaxin und VAMP bis zur Transmembranregion, daher bringt diese stabile ($T_m > 90^\circ\text{C}$), SDS resistente Interaktion die gegenüberliegenden Membranen sehr nah aneinander. Die Anwesenheit von Kalzium-Ionen begünstigt die Formation des SNARE-Komplexes. Syntaxin liegt anfangs in seiner geschlossenen Konformation vor und die Nukleation des trimeren Komplexes ist das initiale Ereignis in der Membranfusion. Kalzium induziert dann ein schnelles Einfädeln der parallelen Helices und bringt so die Vesikel und die Plasmamembran in Kontakt. Die Loslösung der Vesikel vom Zytoskelett wird wahrscheinlich durch Rab-Proteine und Rabeffektor Proteine (zum Beispiel Rabphilin) bewerkstelligt, sie sind möglicherweise ebenso für die Kopplung der Vesikel (vesicle docking) zuständig. Die meisten Proteine, die für die synaptische Vesikel Exozytose verantwortlich sind, haben Homologe in anderen Formen der regulierten Exozytose, wie auch in der konstitutiven Exozytose, sogar in recht primitiven Organismen wie zum Beispiel der Hefe. Das zunehmende Verständnis der synaptischen Vorgänge ist daher auch auf andere exozytotische Prozesse übertragbar. Dennoch ist die proteinmedierte Membranfusion immer noch nicht als physikalisches Modell beschreibbar (Jahn und Grubmüller 2002).

1.3. Das CSP-Protein

Das Cysteine String Protein (CSP) wird seit langer Zeit als Bestandteil der exozytotischen Maschinerie gehandelt, allerdings konnte keine genaue Funktion beschrieben werden. Inzwischen sind einige Interaktionen bekannt, so dass sich mehrere spekulative Modelle der CSP-Funktion ergeben.

Das Cysteine String Protein wurde Ende der 80er Jahre durch Untersuchungen mit einer gehirnspezifischen Antikörperbibliothek für *Drosophila* entdeckt. DAB-Färbungen an *Drosophila*-Gehirnschnitten zeigten bevorzugte Bindung des Antikörpers an synapsenreiche Regionen des Neuropils und sparten die umgebenden Zellkörper aus. Ebenso war eine Färbung der synaptischen Boutons der Motorneurone nachweisbar (Zinsmaier et al 1990). Das *Csp*-Gen wurde auf den chromosomalen Abschnitt 79 E1-2 kartiert, dies ist aufgrund heutiger Erkenntnisse auf 79D3-4 korrigiert worden. Dieses Gen kodiert für mindestens drei alternativ gespleißte cDNAs, deren Translationsprodukte der Größe 32-36 kDa auf einem Western Blot nachzuweisen sind (Abb 1.2; Zinsmaier et al 1994).

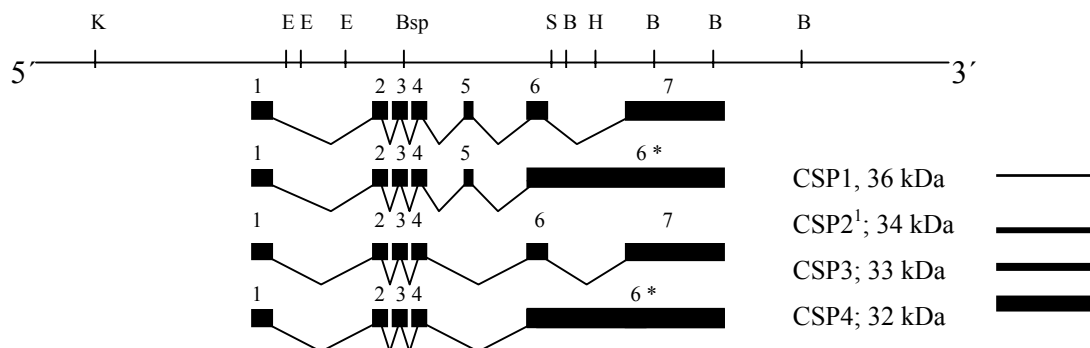


Abb 1.2 Schematische Übersicht des *Csp*-Genlokus mit den vier entstehenden Transkripten in *Drosophila melanogaster*. Das Bandenmuster der im Western Blot nachgewiesenen Proteinisoformen ist schematisch dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text. 6*: 7. Intron wird als Exon benutzt. ¹ noch nicht klonierte, hypothetische cDNA; B:BamHI; Bsp:Bsp1407I; E:EcoRI; H:HindIII; K:KpnI; S: SalI

Die Expression von CSP ist in *Drosophila* nicht nur auf das neuronale Gewebe beschränkt. Die größte der nachgewiesenen Isoformen ist in allen sekretorischen Geweben zu finden, wohingegen die kleinste Isoform spezifisch neuronal exprimiert wird (Eberle et al 1998). Der Nachweis des Cysteine String Proteins in der Ratte ergab, dass auch hier das Protein

Unabhängig von der Identifikation des *Drosophila* CSP konnte aus dem Zitterrochen *Torpedo californica* ein unbekanntes Protein isoliert werden, welches Einfluss auf die Funktion von in *Xenopus laevis* exprimierten N-Typ Ca^{2+} -Kanälen hatte und sich aufgrund von Sequenzhomologien als *Torpedo*-Cysteine String Protein herausstellte (Abb 1.3).

Diese beobachtete Interaktion von CSP und Ca^{2+} -Kanal lieferte den ersten Hinweis auf eine Beteiligung von CSP an präsynaptischen Vorgängen und somit der regulierten Exozytose (Gundersen und Umbach 1992). Subzelluläre Fraktionierungen zeigten kurz darauf, dass ca. acht Cysteine String Proteine an ein synaptisches Vesikel gekoppelt sind (Mastrogiacomo et al 1994; van de Goor und Kelly 1996). Diese Assoziation an die synaptischen Vesikel ist durch eine extensive Modifizierung mit Palmitylresten möglich. In dem *T. californica* Homolog sind mindestens 11 der 13 Cysteine mit Fettsäuren verestert. Nicht nur die dadurch mögliche Membranbindung sondern auch die amphipathische Struktur des Proteins schien für eine Funktion während der Fusion zweier Membranen prädestiniert zu sein (Gundersen et al 1994).

Die Palmitylierung der Cysteine String Proteine unterliegt keinem dynamischen Prozess, es können keine sich unterscheidende Palmitylierungsgrade des Proteins beobachtet werden (Gundersen et al 1996). Neben der Palmitylierung, die offenbar in Beziehung mit der Membranassoziation der Cysteine String Proteine steht, bestehen Hinweise auf eine weitere deacylierungsresistente Bindung an die Membran. CSP wurde daher unter physiologischen Bedingungen als integrales Membranprotein beschrieben, wobei Amino- und Carboxytermini im Cytosol zu finden sind (Mastrogiacomo et al 1998a).

Um die Funktion des Cysteine String Proteins in der Synapse näher untersuchen zu können, wurde in *Drosophila melanogaster* eine Nullmutante generiert (Abb 1.4; Zinsmaier et al 1994; Eberle et al 1998). Dazu wurde der Locus mit Hilfe von zwei das Gen flankierenden P-Elementen durch „jump-out“-Mutagenese und hitzeinduzierte Rekombination deletiert. Die entstandenen Mutanten, eine Nullmutante CspU1 und eine Deletionsmutante Csp^{K16}, die nur das erste Exon betrifft und eine sehr geringe immunhistochemisch nachweisbare Restexpression zeigt, wurden untersucht. Diese CSP-Mutanten zeigten Semiletalität und eine stark verkürzte Lebensdauer. Die wenigen überlebenden Fliegen wiesen starke motorische Störungen auf, die sich in unkoordinierten Bewegungen und spastischen Zuckungen äußerten. Zudem ist die synaptische Transmission in diesen Tieren bei erhöhter Temperatur gestört, was sich in temperaturabhängiger Paralyse und im Verlust der On- und Off-Transienten in Elektroretinogrammen äußert (Zinsmaier et al 1994).

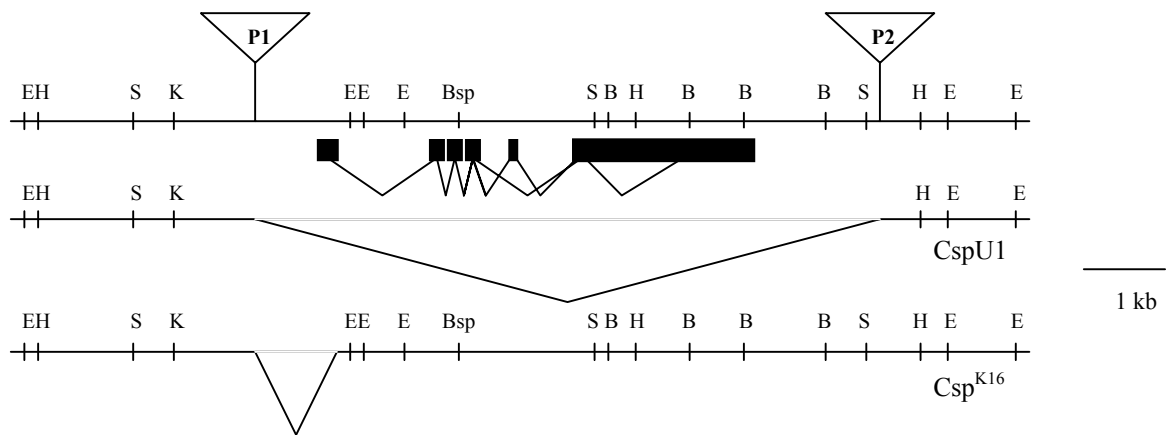


Abb 1.4 Schematische Darstellung der genomischen Ausgangssituation. Die inserierten P-Elemente P1 und P2 sind auf einem Chromosom dargestellt. Die Deletionsmutanten CspU1 und Csp^{K16} sind ebenfalls schematisch dargestellt. B: BamHI; Bsp: Bsp1407I; E: EcoRI; H: HindIII; K: KpnI; S: SalI

Eine elektrophysiologische Analyse der Nerv-Muskel Synapse in dritten Larven zeigt eine um ca. 50% verminderte Antwort auf elektrische Stimuli bei einer Umgebungstemperatur von 22°C. Nach einer Temperaturerhöhung auf 30°C verschwinden die excitatorischen Potentiale völlig, während Miniaturpotentiale, die spontane Fusionen von Vesikeln darstellen, bei beiden Temperaturen erhalten bleiben (Umbach et al 1994). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass dieser temperatursensitive Verlust der Neurotransmission in der larvalen Nerv-Muskel Synapse von CSP-Nullmutanten mit einem Block des Ca²⁺-Ionen-Einstroms einhergeht. Dies bestätigte wiederum die anfängliche Hypothese einer direkten Verbindung zwischen CSP-Funktion und Ca²⁺-Kanälen (Umbach et al 1998). Auch in Untersuchungen der larvalen Nerv-Muskel Synapse von CSP-Nullmutanten mit dem Spinnengift der schwarzen Witwe und unterschiedlichen Ionophoren lassen sich ähnlich wie im Wildtyp Fusionen der synaptischen Vesikel induzieren. Ebenso zeigen diese Versuche, dass die Endozytose durch einen Verlust von CSP nicht gestört ist und es im Gegensatz zu der Dynamin-Mutante *shibire* zu keiner Depletion von synaptischen Vesikeln an der Synapse kommt. (Umbach und Gundersen 1997; Ranjan et al 1998). In CSP-Mutanten ist die Verbindung zwischen Depolarisation der präsynaptischen Membran und Sekretion von Transmittern gestört. Die Reduktion der induzierten Exozytose in CSP-Mutanten kann durch erhöhte extrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen oder durch die Akkumulation internen Kalziums nach repetitiver Stimulation revertiert werden (Dawson-Scully et al 2000). Möglicherweise hat CSP die Fähigkeit, die Ca²⁺-Sensitivität der exozytotischen Maschinerie zu erhöhen (Dawson-Scully et al 2000; Zinsmaier und Bronk 2001).

Der Einfluss von CSP wurde in mehreren unterschiedlichen sekretorischen Systemen untersucht, zum Beispiel in Insulin sekretierenden β -Zellen und adrenalen Chromaffin Zellen. Kürzlich wurden auch cortikale Granula in *Xenopus* Oocyten als System für CSP-abhängige Prozesse vorgestellt (Mastrogiacomo et al 1998b; Gundersen et al 2001). Durch Suppression der CSP-Expression mithilfe von anti-sense RNA in Insulin sekretierenden β -Zellen des Pankreas zeigte sich, dass auch hier die Anwesenheit von CSP für die induzierte Exozytose unabdingbar ist (Zhang et al 1998). Injektionen von CSP-spezifischen Antikörpern in die Zellkörper von *Xenopus* Spinalmotorneuronen, ergaben eine Hemmung der induzierten Exozytose aber keine Veränderung der spontanen Fusionsereignisse (Poage et al 1999). Stabile CSP-Überexpression zeigt in PC12 Zellen einen positiven Einfluss auf die Exozytose, die nach Induktion von CSP um 50% erhöht ist. Dieser Effekt ist offenbar unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom (Chamberlain und Burgoyne 1998a). Zusammengefasst weisen diese Untersuchungen in verschiedenen sekretorischen Systemen CSP eine Rolle während der Exozytose zu. Die Vermutung, dass der Verlust der Neurotransmission durch Veränderung der CSP-Expression aufgrund einer defekten Ca^{2+} -Regulation und nicht durch die Inaktivierung von präsynaptischen Ca^{2+} -Kanälen zustande kommt, wurde geäußert (Zinsmaier und Bronk 2001).

Transiente CSP-Überexpression hat ebenfalls einen negativen Effekt auf die Exozytose in Insulin sekretierenden β -Zellen (Brown et al 1998; Zhang et al 1999) und in *Drosophila* (Nie et al 1999). Die transiente Überexpression von bovinem Csp1 in adrenalen Chromaffin Zellen zeigt eine Inhibition der Exozytose und eine Veränderung der Fusionskinetik in amperometrischen Messungen. Die Anzahl der durchschnittlich messbaren Stromspitzen war insgesamt um 82% reduziert. Die Amplitude (height) war unverändert, die totale Ladung jedoch deutlich erhöht. Die Ursachen der erhöhten Ladung ergaben sich bei der Auswertung einzelner Spitzen. Die Analyse der charakteristischen Parameter der Fusionskinetik zeigte eine breitere Amplitude auf halber Höhe (halfwidth) und eine Verlangsamung der Anstiegsrate im zeitlichen Verlauf (rise time). Diese Veränderungen weisen CSP eine Rolle während der späten Exozytose zu (Graham und Burgoyne 2000).

Das CSP-Protein ist bevorzugt an Vesikeln aller sekretorischen Gewebe zu finden. Die Lokalisation von CSP an der Plasmamembran von 3T3-L1 Adipozyten zeigt jedoch, dass CSP nicht generell als verbindendes fusionsinduzierendes Glied zwischen den Membranen zu betrachten ist (Chamberlain et al 2000). Eine mögliche Funktion in der Modulation des SNARE-Komplexes, und so ein direkter Einfluss auf die Kinetik der Fusionspore, wurde vorgeschlagen (Graham und Burgoyne 2000). Der gegensätzliche Effekt von CSP-

Überexpression in PC12 und β -Zellen auf die Exozytose wird den verschiedenen Versuchsansätzen zugeschrieben.

Die vorgeschlagene Regulation von Ca^{2+} -Kanälen durch CSP kann schon aufgrund der weitverbreiteten Expression von CSP in Geweben, die keine spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle haben, nicht die Hauptaufgabe von CSP sein. Auch wurden CSP-bedingte Effekte auf die Ca^{2+} -unabhängige Exozytose beschrieben (Chamberlain und Burgone 1998a, Zhang et al 1998, 1999). Ebenso zeigen Experimente in *Drosophila*, dass die Ca^{2+} -Ströme in peptidergen Synapsen in CSP-Nullmutanten nicht betroffen sind (Morales et al 1999). Chen et al (2002) argumentieren, dass CSP für die Rekrutierung unbeteiligter Ca^{2+} -Kanäle während der Exozytose verantwortlich ist. Durch direktes Einbringen von rekombinantem CSP in kultivierte Calyxsynapsen aus dem Huhn, war ein hoher Ca^{2+} -Strom messbar, der nicht allein der Modifikation von Kanälen zuzuschreiben ist. Dies unterstützt eine andere Hypothese, die dem CSP aufgrund seiner Position auf dem synaptischen Vesikel und der postulierten Bindung an Teile des Ca^{2+} -Kanals eine Rolle bei der Rekrutierung von Kanälen zuteilt (Buchner und Gundersen 1997).

1.4. Einzelne Domänen und Interaktionspartner von CSP

Die Analyse der unterschiedlichen Domänen von CSP charakterisiert im wesentlichen fünf Abschnitte (Abb 1.5). Der N-Terminus enthält eine PKA-Phosphorylierungsstelle an einem konservierten Serin (Evans et al 2001; Abb 1.3). Gefolgt wird diese von der DnaJ-Domäne, die innerhalb der CSPs 78%ige Identität aufweist. Der Abschnitt hochkonservierter Aminosäuren zwischen der DnaJ-Domäne und dem charakteristischen Cysteinstrang, 11 aufeinanderfolgenden Cysteinen flankiert von zwei Cysteinpaaren in *Drosophila*, wird als Linkerregion bezeichnet. Der Cysteinstrang wird schließlich von einem variableren C-Terminus begrenzt.

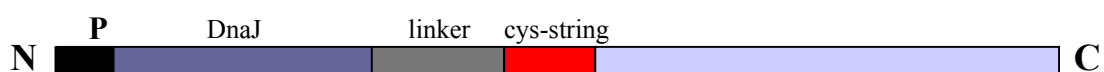


Abb 1.5 Domänenmodell des Cysteine String Proteins. Die Phosphorylierungs-Stelle, die DnaJ-, die Linkerdomäne, der Cysteinstrang und die C-terminale Region sind dargestellt.

Die jüngeren Erkenntnisse über die zahlreichen Interaktionspartner des Cysteine String Proteins und die Abhängigkeit dieser Interaktionen von einzelnen CSP-Domänen wird im Folgenden beschrieben.

1.4.1. Die DnaJ-Domäne: Interaktion mit Hitzeschockproteinen

Die J Domäne des Cysteine String Proteins zeigt eine starke Homologie zu der J Domäne des bakteriellen Proteins DnaJ. Dieses Protein interagiert in dem Bakterium *E. coli* mit DnaK, dem Homolog zum Hsp70 Protein aus Vertebraten, einer ATPase, deren Aktivität durch DnaJ Proteine stimuliert wird. Die als Chaperon bezeichneten Proteine der Hsp70-Familie sind in eine Fülle von zellulären Prozessen involviert, zum Beispiel Faltung, Prävention von Aggregation und Transport von Proteinen. Analog zu dem prokaryotischen System können DnaJ ähnliche Proteine, die durch die Aminosäureabfolge HPD gekennzeichnet sind, die ATPase-Aktivität von Hsc70/Hsp70 stimulieren (Abb 1.3).

Experimente von verschiedenen Gruppen zeigten eine spezifische Interaktion der J-Domäne von CSP mit Hsc70/Hsp70 und postulieren eine Regulation von Hsc70 durch CSP in Exo- und Endozytose (Braun et al 1996; Chamberlain und Burgoyne 1997a). Die Grundlage der Analyse des charakteristischen HPD-Motivs in der DnaJ-Domäne von CSP bildeten die zwei bovinen CSP Isoformen aus adrenalen Chromaffin Zellen (Chamberlain und Burgoyne 1996). Diese zeigen eine 95%ige Homologie zu den entsprechenden CSP-Isoformen der Ratte (Kohan et al 1995) und unterscheiden sich nur in der Länge des C-Terminus. Es wurden einzelne Aminosäuren des HPD-Motivs mutiert und anschließend die Stimulation der intrinsischen ATPase-Aktivität von Hsc70 *in vitro* untersucht. Wildtypisches CSP kann die ATPase-Aktivität von Hsc70 um das 14 fache steigern, Mutationen des HPD-Motivs unterbinden diese Eigenschaft. Durch die Interaktion zwischen CSP und Hsc70, die durch eine direkte Bindung entsteht, kommt es zu einer Konformationsänderung von Hsc70. Die Mutation des HPD Motivs verändert aufgrund der fehlenden Bindung an Hsc70 die Stimulation der ATPase-Aktivität. CSP gilt jedoch nicht nur als Co-Chaperon, sondern kann unabhängig von den Punktmutationen auch ohne Hsc70 die Aggregation zum Beispiel von Luciferase *in vitro* unterbinden (Chamberlain und Burgoyne 1997b). Dabei unterscheiden sich die beiden Isoformen in ihrer Effizienz, was wohl auf den unterschiedlichen C-Terminus zurückzuführen ist. Versuche mit Insulin sekretierenden β -Zellen zeigen eine Inhibition der Exozytose, die ebenfalls unabhängig von einer Mutation des HPD-Motivs ist (Zhang et al

1999). Auch hier scheint der C-Terminus eine regulatorische Rolle zu spielen, denn Überexpression des trunkierten Csp2 zeigen diesen inhibitorischen Effekt auf die Exozytose nicht. Dies impliziert die Interaktion zwischen der DnaJ Domäne und der C-terminalen Domäne von CSP während der Exozytose.

Nach der bewiesenen Interaktion der Proteine Hsc70 und CSP wurden mithilfe eines „Yeast two hybrid“-Screens die Domänen in Hsc70 bestimmt, die für die Interaktion mit CSP verantwortlich sind (Stahl et al 1999). Es stellte sich heraus, dass Teile der N-terminalen ATPase-Domäne und der angrenzenden Substratbindungsdomäne für die CSP-Bindung nötig sind, die durch die C-terminale Hsc70-Domäne reguliert wird. Eine ähnliche Interaktion wurde zwischen Hsc70 und dem synaptischen Protein Auxilin beobachtet. Allerdings spielt hier die C-terminale Domäne des Hsc70 für die Bindung der beiden Proteine keine Rolle. Dagegen scheint die C-terminale Domäne die intrinsische ATPase-Aktivität zu kontrollieren. Ein Verlust dieser Domäne zeigt eine Aktivierung der ATPase-Aktivität, die durch die Bindung von Auxilin nicht mehr gesteigert werden kann. Auxilin rekrutiert Hsc70 für das Entmanteln synaptischer Vesikel (Ungewickell et al 1995 und 1997) und bildet so in der Clathrin-vermittelten Endozytose mit Hsc70 eine regulatorische Einheit. Eine ähnliche funktionelle Einheit zwischen Hsc70 und CSP in einem Chaperon/Co-Chaperon-Komplex während der Exozytose ist vorstellbar. Da der Verlust von CSP in Mutanten einen temperaturabhängigen Block der Neurotransmission zeigt, könnte die Funktion dieses Komplexes der Stabilisierung der Bestandteile der exozytotischen Maschinerie dienen (Chamberlain und Burgoyne 2000).

Der trimere Chaperon-Komplex

Der C-Terminus von Hsc70 zeigt regulatorische Eigenschaften bezüglich der intrinsischen ATPase-Aktivität, eine Bindung dieser Domäne durch andere Proteinen könnte die Bindung von CSP unterstützen. Ein weiterer „Yeast two hybrid“-Screen einer Rattengehirn-Bibliothek nur unter der Verwendung des Ratten-CSPs, ausschließlich der DnaJ Domäne, förderte einen neuen Interaktionspartner zu Tage (Tobaben et al 2001).

Das zytosolische SGT-Protein (small glutamine rich tetratricopeptide repeats Protein) enthält drei tandem Tetratricopeptid repeat Domänen und hat eine Größe von 35 kDa. Diese Motive sind relativ weit verbreitet und vermitteln Proteininteraktionen. Eine direkte Interaktion zwischen diesen Domänen und dem vesikelassoziierten Proteinen CSP mit dem zytosolischen

in Nervenendigungen angereicherten Protein Hsc70 konnte gezeigt werden. Durch die bereits mehrfach beschriebene Interaktion zwischen CSP und Hsc70 ergibt sich ein trimerer Komplex (Abb 1.6).

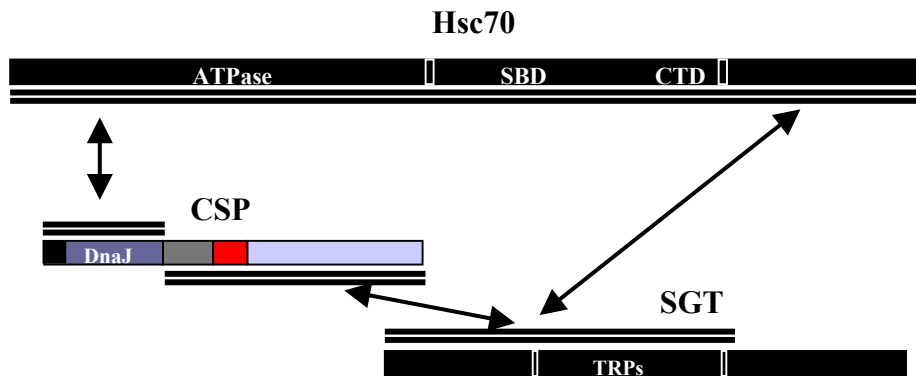


Abb 1.6 Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Hsc70, CSP und SGT, modifiziert nach Tobaben et al 2001. ATPase: ATPase Aktivität; SBD: Substrat bindende Domäne; CTD: C-terminale Domäne; TRPs: Tetratricopeptide Repeats; Weitere Erläuterungen im Text.

Dieser Komplex unterliegt dem für Chaperone üblichen Assoziations- und Dissoziationskreislauf, der durch ADP stabilisiert und ATP dissoziiert wird. Die ATPase-Aktivität von Hsc70 wird durch die Bindung beider Proteine synergistisch erhöht, denn einzeln gebundenes SGT hat kaum einen Einfluss auf die ATPase-Aktivität. Dies ist konsistent mit dem Ergebnis, dass nur der trimere Komplex denaturierte Luziferase zu 60% wieder herstellen kann. Andere TRP-enthaltende Proteine haben gebunden an Hsc70 eine hemmende Wirkung auf diesen Prozess (Wu et al 2001). Die Annahme, dass dieser trimere Komplex die funktionelle Form von CSP darstellt, wird durch folgende Experimente unterstützt. In CSP-Knock-out Mäusen ist bis zu 70% weniger SGT an synaptischen Vesikeln zu finden. Einer Überexpression von SGT folgt eine Reduktion der Poolgröße von Vesikeln, ebenso ist die Wahrscheinlichkeit einer Vesikelfreisetzung reduziert. CSP wäre in diesem Fall für die synaptische Lokalisation einer sonst eher unspezifisch verteilten Chaperonmaschinerie zuständig. Durch die Bindung von SGT und CSP an Hsc70 wird ausreichend Energie freigesetzt, so dass missgefaltete Proteine in ihre richtige Konformation gebracht werden können. Das physiologische Substrat dieses Komplexes ist nicht bekannt, aber wohl in der Nähe der synaptischen Vesikel zu suchen. Die Proteine Synaptobrevin und Syntaxin sind recht gute Kandidaten für eine Interaktion mit dem trimeren Chaperon-Komplex (Tobaben et

al 2001). Beiden Proteinen wurde ein eher unstrukturiertes Erscheinungsbild zugewiesen, tatsächlichen liegen weite Teile als „coiled Coils“ vor. Syntaxin liegt basierend auf neueren Erkenntnissen als t-SNARE Dimer vor, in dem die Region nahe der ionisierten Schicht ineinanderverschlungen vorstellbar ist und Synaptobrevin ein Syntaxin während der SNARE-Formation ersetzt. Dies erleichtert die Vorstellung der Prozesse während der SNARE-Formation (Zhang et al 2002b).

Die Modulation und Interaktion des CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), einem cAMP regulierten Cl-Kanal, wurde durch eine Interaktion mit den Chaperons CSP/Hsc70 beschrieben (Zhang et al 2002a). Hier stabilisiert CSP nachweisbar die unreife Form des Kanals und ist bereits im endoplasmatischen Retikulum an diese Form gebunden. Auch hier scheint das CSP für die Lokalisation des Chaperons Hsc70 verantwortlich zu sein. Eine Beteiligung von CSP in einem anderen Chaperon-Komplex aus Hsp90/Hsc70/CSP wurde für den Rab spezifischen α GDP Dissoziationsinhibitor (α GDI), der den Zyklus der Rab-GTPasen reguliert beschrieben (Sakisaka et al 2002).

In vivo Interaktion zwischen dem Hsc70-Drosophila-Homolog Hsc4 und CSP

Eine genetische Interaktion zwischen CSP und dem *Drosophila*-Homolog Hsc4, beziehungsweise eine Funktion der beiden Proteine im gleichen Reaktionsweg *in vivo*, wurde kürzlich beschrieben (Bronk et al 2001). Dabei wurden hypomorphe Mutationen von Hsc4 in *Drosophila* Larven elektrophysiologisch untersucht. Es ergaben sich eindeutige Hinweise auf eine Funktion des Hsc4 in späten Schritten der Exozytose. Die postsynaptische Antwort auf präsynaptisch eintreffende Aktionspotentiale war um ca. 50-60% reduziert und temperatursensitiv. Erhöhungen der Temperatur von 22/23°C auf 30°C zeigten eine deutlich verminderte und schließlich ausbleibende Antwort. Dieser Vorgang ist ähnlich wie bei CSP-Nullmutanten reversibel, sobald die Temperatur wieder gesenkt wird. Obwohl Hsc70 eine wichtige Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose spielt, zeigte die Mutante des Hsc4-*Drosophila* Homologs keine gestörte Endozytose. Der beobachtete Effekt bezieht sich nur auf Prozesse der Exozytose, endozytotische Vorgänge werden möglicherweise von anderen dem Hsc70-ähnlichen Protein übernommen oder die Restexpression von Hsc4 ist für diesen Vorgang ausreichend. Es konnte gezeigt werden, dass die Hsc4 mutanten Fliegenlinien einen Defekt nach dem Ca^{2+} -Einstrom während der Exozytose aufweisen. Die fehlenden Fusionsereignisse liegen in einer verminderten Ca^{2+} -Sensitivität, nicht aber in einem

verminderten Ca^{2+} -Einstrom begründet. Biochemisch konnte eine ATP abhängige Interaktion von Hsc4 und CSP gezeigt werden. Eine genetische Interaktion wurde in der elektrophysiologischen Analyse homozygoter Doppelmutanten und transheterozygoter Mutanten bewiesen. Ein Modell wurde vorgestellt, in dem CSP Hsc4 an die synaptischen Vesikel rekrutiert und dort entweder direkt oder über die Modulation von Proteinen durch die Chaperon-Aktivität die Ca^{2+} -Sensitivität für die Vesikelfusion erhöht und die Ca^{2+} -Klärung der Synapse bei thermischem Stress stabilisiert (Dawson-Scully 1999).

Die beschriebene Interaktion des dimeren Hsc4/CSP-Komplexes mit dem SGT Protein konnte in *Drosophila* noch nicht nachgewiesen werden. Das vorgestellte Modell lässt sich jedoch auf das von Tobaben et al 2001 vorgeschlagene erweitern (Abb 1.6). Ein Homolog des in Vertebraten bekannten SGT-Proteins ist in *Drosophila* vorhanden. Eine Mutation bzw. Deletion des SGT-Proteins in *Drosophila* müsste demzufolge ähnliche Defekte aufweisen, wie eine Mutation von CSP oder Hsc4.

Eine mögliche Rolle von CSP-Chaperon-Komplexen in neurodegenerativen Prozessen

CSP-Nullmutanten zeigen neben ihrer verkürzten Lebensspanne auch noch nicht genauer charakterisierte Anomalien im Fliegenhirn. Die Gehirnstrukturen erscheinen im Elektronenmikroskop verändert. Der frühe Tod ist möglicherweise auf einen CSP-abhängigen neurodegenerativen Prozess zurückzuführen. Ende der 90er Jahre konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von neurodegenerativen Prozessen durch Expression von Polyglutaminproteinen in *Drosophila* nachweisbar ist (Warrick et al 1998) und dass Hitzeschockproteine der Hsp70 Familie in der Lage sind polyglutamin-induzierte Aggregationen von Proteinen zu unterbinden. Die Co-Expression von Hsp70 und MJD, das Polyglutamin-Protein, welches für die spinalcerebrale Ataxie Machado Joseph verantwortlich ist, unterbindet den Aggregationseffekt, der bei alleiniger Expression von MJD zu beobachten ist (Warrick et al 1999). Eine mögliche Beteiligung des CSP-Proteins ist vorstellbar. Berichte über verstärkte CSP-Expression nach Lithium Ionen Zugabe in PC12 Zellen deuten auf eine mögliche Chaperon-Aktivität von CSP während der Therapie von wiederkehrenden manisch depressiven Phasen hin (Cordeiro et al 2000).

1.4.2. Interaktion mit Syntaxin, der Synprint Site der Ca^{2+} -Kanäle und $\text{G}\beta\gamma$

Die Interaktionen zwischen CSP und Syntaxin, der Synprint Site der Ca^{2+} -Kanäle und $\text{G}\beta\gamma$ wird im Folgenden beschrieben.

Vorgänge in der Präsynapse während eines Aktionspotentials

Aktionspotentiale können die Öffnung von Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen bewirken. Der resultierende Einstrom an Ionen führt zu einer weiteren Depolarisation der Membran und so zu vermehrten Kanalöffnungen. Der Ca^{2+} -Einstrom während eines Aktionspotentials hat Einfluss auf verschiedene Prozesse, zum Beispiel Impulsgeneration und Vermittlung sensorischer Prozesse, Muskelkontraktionen, Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern, Zelldifferenzierung und Genexpression. Noch während der Depolarisation werden Kanalschließungen initiiert, dieser Prozess wird als Inaktivierung bezeichnet (Hering et al 2000). Die daraus resultierende negative Rückwirkung begrenzt zum einen den ionalen Stromfluss und bestimmt gemeinsam mit dem K^+ -Ausstrom die Dauer des Aktionspotentials. Die Aktivierung der Kanäle erfolgt in Millisekunden, die Refraktärzeit und die Regenerationsphasen dauern mindestens 10 Millisekunden. Wenn nun ein Signal vor der Regeneration der Kanäle ankommt, dann fällt die Antwort geringer aus. Die schnelle Inaktivierung von Shaker K^+ -Kanälen durch Einklappen des N-terminalen Endes in die Pore und das Verschließen von Na^+ -Kanälen durch eine hebelartige, interne Domäne sind gut beschrieben. Mechanismen für die schnelle Inaktivierung im Fall der Ca^{2+} -Kanäle sind vielseitiger. Außer mehreren strukturellen Veränderungen der α_1 -Untereinheit und der intrazellulären Loops, aber auch der C-Termini der Kanaluntereinheiten, kommen auch Einflüsse anderer Proteine, zum Beispiel Syntaxin und $\text{G}\beta\gamma$ in Frage.

$\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten regulieren N-P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle via der Synprint Site

Die porenformende Untereinheit α_1 der spannungsabhängigen N-P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle besteht aus vier homologen Wiederholungen I-IV, die wiederum jede aus sechs Transmembransegmenten bestehen. Die intrazellulär lokalisierte Schleife zwischen Einheit II

und III wird aufgrund vielfältiger Interaktionen mit synaptischen Proteinen als Synprint Site bezeichnet. Das in der Signaltransduktion bedeutsame G-Protein besteht aus den drei Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$, wobei letztere zumeist als Dimere zu beobachten sind. Die $G\beta\gamma$ -Dimere binden direkt an die zytoplasmatische Region, welche die Domänen I und II der $Ca^{2+}\alpha_1$ -Untereinheit bilden und stabilisieren so den Kanal in seiner geschlossenen Form und ermöglichen durch weitere Interaktionen eine Feinregulation dieses Prozesses (Blackmer et al 2001). Durch sehr starke Membrandepolarisierung und Proteinkinase C abhängige Phosphorylierung des Kanals kann diese Wirkung aufgehoben werden. Dadurch werden Modifikationen des Kanals durch G-Protein-regulierende Proteine möglich. Darüber hinaus werden Kanäle dieser Art durch Proteine des präsynaptischen Freisetzungskomplexes modifiziert (Zamponi 2001). Sie interagieren insbesondere mit Syntaxin1, SNAP25, Synaptotagmin und CSP. Man geht davon aus, dass durch diese Interaktionen die Funktion und Feinregulation des Ca^{2+} -Kanals in komplexer Weise beeinflusst wird. Neben dem Einfluss auf den Ca^{2+} -Kanal wurde jedoch auch eine Inhibition der Exozytose durch $G\beta\gamma$ nachgewiesen, die unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom und diesem nachgeschaltet ist.

Syntaxin interagiert mit $G\beta\gamma$ und der Synprint Site

Die Interaktion von Syntaxin mit dem Ca^{2+} -Kanal äußert sich in der verminderten Verfügbarkeit des Kanals zur Öffnung und somit zum Kalziumeinstrom. Diese modulierende Interaktion erfolgt über die Synprint Site des Kanals. Die Synprint Site beschreibt den intrazellulären Loop II/III der α_1 -Untereinheit der N-P/Q-Typ Kanäle. Der vorhergehende Loop I/II wird von $G\beta\gamma$ gebunden.

In Co-Präzipitationsexperimenten von Syntaxin1A und 1B fällen beide $G\beta$ aus bovinem $G\beta\gamma$ -Extrakt oder Rattengehirnhomogenat. Die C-terminale helikale H3abc-Domäne des Syntaxin-Proteins ist in den Core-Komplex miteinbezogen und bindet an SNAP25, nSec-1 (*Drosophila*-Homolog ROP), Synaptotagmin, Synaptobrevin, α SNAP (soluble NSF attachment protein) und NSF. Zusätzlich interagiert nSec-1 auch mit der Hc Domäne und hält Syntaxin so in seiner offenen Form. Die zwei Helices Ha und Hb sind für die Fähigkeit von Syntaxin zuständig, die G-Protein Inhibition der N-Typ Kalziumkanäle zu unterstützen. Eine dieser beiden Domänen, Ha, scheint für die Verankerung des Proteins an die Synprintregion des N-Typ Kalziumkanals ausreichend zu sein. Eine Deletion der H3a und der H3b Domänen resultiert in einem kompletten Verlust der Bindung von $G\beta$ -Untereinheiten an Syntaxin1A.

Vermutlich stellen diese Domänen die Bindungsstelle von G β dar. Die α -Untereinheit des trimeren G-Proteins wird nicht von Syntaxin gebunden, ebenso kann sehr wenig beziehungsweise keine G γ -Untereinheit in Präzipitationen nachgewiesen werden. So scheint Syntaxin mit der G γ -Untereinheit um G β in Konkurrenz zu stehen. Die Modulation des N-Typ Kalziumkanals durch G-Proteine erfolgt durch die Interaktion des gesamten G $\beta\gamma$ -Komplexes. Die durch Syntaxin1A vermittelte tonische Inhibition des Kanals allerdings benötigt nur die G β -Untereinheit. Die geschlossene Form von Syntaxin ist durch das 4-Helixbündel aus den Domänen H3 und Ha/b/c charakterisiert (Abb 1.7). Die Verfügbarkeit von N-Typ Kalziumkanälen kann durch Syntaxin während mehrerer Schritte in der Neurotransmitterfreisetzung aufgrund seiner Konformation dynamisch reguliert werden (Jarvis et al 2002).

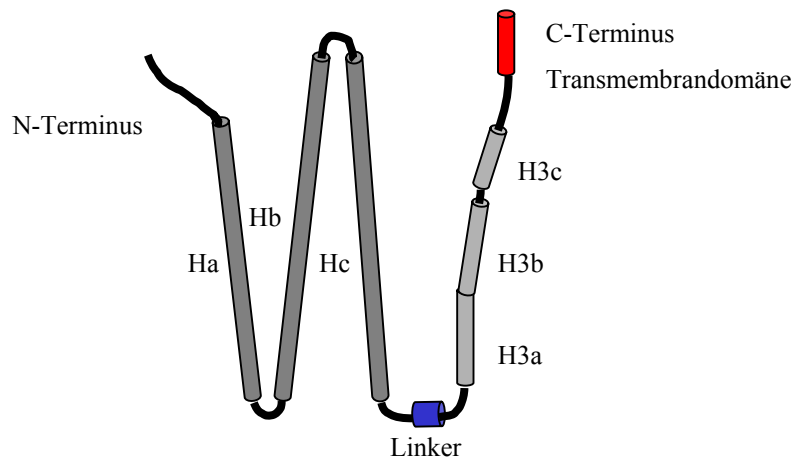


Abb 1.7 Schematische Abbildung der unterschiedlichen Domänen von Syntaxin1, unterteilt in 4 größere Helices Ha, Hb, Hc und H3abc, modifiziert nach Jarvis et al 2002.

Die Regulation des Kalziumkanals durch Syntaxin ist transient und nur unmittelbar nach der Kanalöffnung möglich. Sie erfolgt gleichzeitig mit der Freisetzung des Vesikels und der SNARE-Komplex-Dissoziation. In der Anwesenheit eines angedockten Vesikels sind die N-Typ Kalziumkanäle mit SNAP25 und Syntaxin in seiner offenen Konformation assoziiert und bereit zur Öffnung. Die folgende Membrandepolarisation mit Kalziumeinstrom durch den Kanal führt zum Aufbrechen des SNARE-Komplexes und Syntaxinschließung. Die Interaktion der geschlossenen Form von Syntaxin1A mit dem Kanal resultiert in einer reduzierten Verfügbarkeit des Kanals und zur Beendigung des Kalziumeinstroms. Die folgende Assoziation von Syntaxin mit nSec-1 und der damit verbundene Wechsel zur offenen Konformation entfernt den inhibitorischen Effekt. So wird also als Antwort auf die

Depolarisation der Membran Kalzium einströmen, während Syntaxin in offener Konformation vorliegt, gefolgt von einer Reduktion der Kanalverfügbarkeit sobald Syntaxin in die geschlossenen Konformation übergeht, um den Kanal nach der Bindung an nSec-1 wieder freizugeben. Die Proteine Munc13 und RIM sind Kandidaten für die Vorbereitung von offenem Syntaxin.

Bezprozvanny et al (2000) charakterisierten die H3 Domäne von Syntaxin näher und konnten so zeigen, dass ein Bereich dieser Domäne einen funktionellen Effekt auf die Modulation des Kanals hat. Diese zeigt aber in diesem Bereich keine biochemische Interaktion mit der Synprint Site. Die H3-Domäne ist während der Interaktion mit dem SNARE-Komplex von diesem maskiert, so dass die dem Syntaxin zugeschriebene Funktion nach der Fusion zu beobachten ist. Die Synprint Site scheint als Anker oder positionierendes Modul für Syntaxin zu dienen, ist jedoch für die Modulation des Ca^{2+} -Kanals nicht essentiell (Bezprozvanny et al 2000). Als Ersatz könnte dann der I/II-Loop dienen, oder aber $\text{G}\beta\gamma$.

Syntaxin reguliert die langsame Inaktivierung von N-Typ Ca^{2+} -Kanälen in *Xenopus* Oocyten. Die verschiedenen Phasen der Kanalaktivierung äußern sich möglicherweise nicht nur durch unterschiedliche Kinetik, sondern auch durch verschiedene zelluläre Signalwege. Syntaxin kann losgelöst von seiner Aufgabe als Mitglied des SNARE-Komplexes auch als Regulator von Ca^{2+} -Kanälen betrachtet werden. Zudem sind auch Interaktionen mit anderen Membrantransportproteinen wie CFTR, Norepinephrin-Transporter und GABA-Transporter bekannt (Degtiar et al 2000).

G $\beta\gamma$ interagiert mit CSP

Magga et al (2000) diskutieren den biochemischen zur Exozytose führenden Signaltransduktionsweg und offerieren eine Erklärung, die den Ca^{2+} -Einstrom mit der Fusion der synaptischen Vesikel koppelt. CSP ist essentiell für die synaptische Temperaturstabilität der Transmission und moduliert die G-Proteinregulierung von N-Typ Ca^{2+} -Kanälen (Leveque et al 1998). CSP/ $\text{G}\beta\gamma$ Komplexe, CSP/ Ca^{2+} -Kanal Komplexe und CSP/Hsc70-Komplexe können nachgewiesen werden. Möglicherweise sind in der Zelle größerer Multimere dieser Varianten vorhanden.

$\text{G}\alpha$ interagiert ATP-abhängig mit der J-Domäne von CSP und dies unabhängig von $\text{G}\beta\gamma$. Die $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheit interagiert mit dem C-Terminus von CSP in An- und Abwesenheit von ATP. Diese spezifische Interaktion wird durch die Anwesenheit von Hsc70 nicht beeinflusst.

Syntaxin interagiert ebenfalls mit diesen CSP-enthaltenden Komplexen durch direkte Assoziation mit G $\beta\gamma$ oder dem Synprint Motiv. Der Ablauf und die Involvierung von CSP in diesen Vorgang der Kanal-Inhibition sind noch nicht geklärt.

In isolierten Calyxsynapsen des Huhns wurden die Zusammenhänge zwischen CSP und der Modulation von N-Typ Ca²⁺-Kanälen untersucht. Die Ergebnisse argumentieren gegen einen CSP-Effekt durch die Interaktion mit G-Proteinen und favorisieren die Rekrutierung zusätzlicher Ca²⁺-Kanäle und damit ältere Modelle, welche CSP durch seine Bindung an synaptische Vesikel für die Vorbereitung der Exozytose mitverantwortlich machen (Chen et al 2002).

Beschriebene Interaktionen von CSP und Syntaxin

Generell sind widersprechende Berichte über die Interaktion von CSP und Syntaxin bekannt. Leveque et al (1998) zeigen eine Interaktion von CSP mit der Synprint Site und Synaptobrevin, nicht aber mit Syntaxin in Immunpräzipitationsexperimenten. Nie et al (1999) zeigen eine biochemische und eine genetische Interaktion dieser beiden Proteine in *Drosophila melanogaster*.

Die Untersuchung verschiedener Bereiche der H3-Domäne von Syntaxin zeigt, neben der Bindung der Synprintdomäne und Synaptotagmin, auch eine selektive Bindung von CSP in einem Verhältnis von 0,3:1 (CSP zu GST-syx; Wu et al 1999). Magga et al (2000) beschreiben wie erwähnt die Komplexe zwischen den Untereinheiten G $\beta\gamma$, CSP und Syntaxin. Aber es ergibt sich keine Verbindung zwischen den beiden Synapsenproteinen Syntaxin und CSP.

Die Modulation von Ca²⁺-Kanälen durch CSP stellt wohl einen sekundären Effekt dar, der eigentlich den G Protein-Untereinheiten zugeschrieben werden muss. CSP hat Einfluss auf die tonische Inhibition von Ca²⁺-Kanälen. CSP könnte als Chaperon die Bindung zwischen Ca²⁺-Kanälen und synprintinteragierenden Proteinen wie SNAP25 und Syntaxin zusätzlich zu G $\beta\gamma$ bewirken.

Das von Wu et al (1999) erstellte Modell der Syntaxinfunktion bezieht das Cysteine String Protein mit ein. CSP erleichtert die Syntaxin-vermittelte Inhibition der Ca²⁺-Kanäle und führt so zur Signalisierung der Anwesenheit von synaptischen Vesikeln. Nach dieser Vorstellung bereitet CSP die Maschinerie für eine Fusion vor. CSP konkurriert mit Syntaxin um die Synprintregion. Die Ca²⁺-Effektordomäne des Syntaxins bindet Synprint, CSP und

Synaptotagmin.

Im Zusammenhang mit der wichtigen Modulation der Inhibierung von Ca^{2+} -Kanälen, bei der CSP und Syntaxin ihre Aufgabe durch die Interaktion mit G-Protein-Untereinheiten bewerkstelligen, wurde beobachtet, dass die Interaktion zwischen Syntaxin und CSP phosphorylierungsabhängig ist. Maximal 5% des in der Zelle vorhandenen Syntaxins kann mithilfe von CSP präzipitiert werden. Die von cAMP stimulierte Phosphorylierung am Serin 10 durch PKA vermindert diese Bindungsaffinität um ein 10faches. Die Bindung von CSP an Hsc70 oder $\text{G}\beta\gamma$ wird durch die Interaktion von CSP und Syntaxin nicht beeinflusst (Evans et al 2001). Übermäßige Expression von CSP führt zu einer Inhibition der Exozytose. Liegt dieses CSP unphosphoryliert vor, ist eine Titration von verfügbarem Syntaxin möglich (Nie et al 1999) und vermindert so die Exozytose.

Die Hypothese, dass die Chaperon-Aktivität des CSPs während der Exozytose eine Rolle spielt und so möglicherweise Syntaxin von Ca^{2+} -Kanälen loslöst und die Inaktivierung dieser aufhebt (Buchner und Gundersen 1997, Tobaben et al 2001), ist nicht abschließend bewiesen.

1.4.3. Interaktionen mit dem potentiellen Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin

Die Kopplung von Ca^{2+} -Einstrom und regulierter Exozytose ist immer noch ungeklärt. CSP könnte an der Funktion eines Kalziumsensors beteiligt sein, besitzt aber keine Ca^{2+} -Bindungsstellen und scheidet so als direkter Kandidat aus. Aufgrund des beobachteten, supralinearen Zusammenhangs zwischen Ca^{2+} -Konzentration und exozytotischer Antwort, konzentrierte sich die Suche auf ein Protein, welches 3-5 Ca^{2+} -Ionen bindet.

Synaptotagmin ist unter anderem auf synaptischen Vesikeln zu finden, besitzt zwei Kalzium-bindende Domänen, C_2A und C_2B , und ist an endo- und exozytotischen Prozessen beteiligt.

Die C_2A -Domäne bindet Ca^{2+} -Ionen und interagiert Kalzium-abhängig mit Phospholipidmembranen. Zudem ist die Bindung an SNARE-Komplexe, Syntaxin und SNAP25 beschrieben. Diese Interaktionen sowie die mögliche Oligomerisation des Synaptotagmin-Moleküls sind ebenfalls Ca^{2+} -abhängig.

In *Drosophila* Synaptotagmin Nullmutanten ist die Antwort auf einen elektrischen Stimulus auf 6% reduziert (Loewen et al 2001) und die regulierte Exozytose ist massiv gestört. In Chromaffin Zellen konnte bestätigt werden, dass durch den Verlust von Synaptotagmin, die Ca^{2+} -Sensitivität verloren geht (Voets et al 2001). Mutationen des Polylysin-Motivs in der C_2B -Domäne zeigten in *Drosophila*, dass dieses Motiv essentiell für die

Neurotransmitterausschüttung ist (Mackler und Reist 2001). Eine weitere *in vivo*-Studie bewies nach der Einführung einer Synaptotagmin-Punktmutation in die Maus, dass die Ca^{2+} -Sensitivität der Neurotransmitterfreisetzung um das 2-fache sinkt (Fernandez-Chacon et al 2001). Analysen der Fusionskinetik in amperometrischen Messungen in PC12 Zellen verstärken den Verdacht, dass Synaptotagmin den in der regulierten Exozytose gesuchten Ca^{2+} -Sensor darstellt (Wang et al 2001). Die Rolle von Synaptotagmin ist eindeutig regulativer und nicht fusogener Natur.

Aufgrund der Interaktionen zwischen Synaptotagmin und den SNARE-Proteinen werden einige funktionelle Modelle der Synaptotagmin Funktion vorgeschlagen. Die Spekulation, dass Synaptotagmin die Konformation der SNARE-Proteine aufgrund eines Ca^{2+} -Signals steuert, ist verlockend, dazu kommt die Möglichkeit, dass so eine synchrone Exozytose der Vesikel reguliert wird (Littleton et al 2001).

Die beobachteten Phänotypen von Synaptotagmin Mutanten in Maus, *Drosophila* und *C. elegans* und von CSP Mutanten in *Drosophila* zeigen ein ähnliches Bild. Eine Überexpression des Synaptotagmins bewirkt in der Regel eine Verlangsamung der Fusionsporenöffnung. In CSP-Pulldown-Experimenten aus Rattengehirnmembranen konnte eine gut nachzuweisende Menge an Synaptotagmin isoliert werden. Die Phosphorylierung von CSP vermindert die Bindungsaffinität um das 10fache, außerdem stört die Substitution des phosphorylierbaren Serins durch Alanin die Interaktion der beiden Proteine. Eine Empfindlichkeit dieser Interaktion gegenüber variierenden Ca^{2+} -Konzentrationen konnte nicht gezeigt werden (Evans und Morgan 2002). Die tertiäre Struktur des N-Terminus von CSP scheint für die Interaktion von wesentlicher Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu ist die Bindung von CSP an Syntaxin offenbar von der N-terminalen Tertiärstruktur unabhängig. Diese neuesten Befunde über eine CSP-Synaptotagmin-Interaktion lassen die Schlussfolgerung zu, dass Protein Kinase A über die Phosphorylierung von CSP die Interaktion zwischen CSP und Synaptotagmin und so auch die Fusionsporenöffnung reguliert.

Obwohl Synaptotagmin auch in der Endozytose durch Interaktionen mit AP2 und stoned-Proteinen eine wichtige Rolle spielt, ist hier ähnlich wie bei Hsc70 und Auxilin keine Beteiligung von CSP in endozytotischen Prozessen zu erkennen.

Die Verknüpfung von CSP und Synaptotagmin bietet nun ein Modell zum Verständnis der Kopplung zwischen Ca^{2+} -Konzentration und Exozytose. Aber auch andere Proteine könnten in diesem Vorgang eine wichtige Rolle spielen. Complexine sind kleine (15-16 kDa), polare und lösliche Proteine, die in der Synapse angereichert sind und um die Bindung an SNARE-Komplexe mit α -SNAP konkurrieren (Bindungsverhältnis 1:1). Der Phänotyp von

Complexin-Mutanten, die sich in einer geringeren exozytotischen Antwort äußern, kann durch Erhöhung des extrazellulären Ca^{2+} -Spiegels normalisiert werden (Reim et al 2001). Diese kleinen Proteine könnten die Interaktion zwischen Fusionsmaschinerie, Ca^{2+} -Sensor und Kalzium erleichtern. Folgendes Modell beschreibt eine attraktive Idee: Um eine maximale Effizienz in der Umsetzung geringer Veränderungen im Ca^{2+} -Spiegel zu erreichen, ist vorstellbar, dass nur wenige Sensoren durch das Ca^{2+} aktiviert werden und durch die Complexine an die SNARE-Komplexe rekrutiert werden. Dadurch ergibt sich eine erhöhte Bindungsaffinität an den SNARE-Komplex und die regulierte Exozytose findet statt. Argumente für die Gültigkeit dieses Vorschlags sind die Reduktion der Empfindlichkeit beim Verlust von Complexinen und damit einhergehende, verminderte Exozytose. Wird der Ca^{2+} -Spiegel allerdings erhöht, werden alle Ca^{2+} -Sensoren aktiviert und die Exozytose findet statt (Reim et al 2001). Möglicherweise ist dies eine weitere Variation der Feinregulation dieses Prozesses. Eine Interaktion von Complexinen mit Synaptotagmin oder CSP wurde noch nicht beschrieben.

1.5. Aufgabenstellung

Verschiedene in einer früheren Dissertation generierten Cysteine String Varianten des CSP sollten im ersten Teil der vorliegenden Dissertation auf ihre biochemischen Eigenschaften bezüglich der Membranbindung und ihrer subzellulären Verteilung analysiert werden. Diese Untersuchungen schließen auch die Analyse der phänotypische Veränderungen der entsprechenden Tiere mit ein (Arnold 1999). Ähnliche Experimente sollten dann mit den neuen transgenen Mutanten von CSP L Δ 8 und C Δ 27 durchgeführt werden.

Aufgrund der sich häufenden Interaktionspartner sollte mithilfe der Immunpräzipitation untersucht werden, ob Berichte über entsprechende Interaktionen auch mit mutierten Isoformen des CSPs nachgewiesen werden können.

Der zweite Teil dieser Dissertation befasst sich mit der Entwicklung eines Systems zur zeitlich und räumlich kontrollierbaren Ausschaltung der Expression des *Csp*-Gens. Mithilfe des Gal₄-UAS-Systems und der Flippase-induzierten Rekombination sollte mit einem selbstklonierten, universell einsetzbaren Transformationsvektor die selektive Deletion eines wildtypischen *Csp*-Transgens in Nullmutanten versucht werden. Mithilfe dieser Methode könnten Verhaltensleistungen neuronalen lokalen Aktivitäten spezifisch zugeordnet werden. Der temperatursensitive Synapsen-Phänotyp sollte es erlauben, durch die Temperaturerhöhung definierte Gehirnregionen abzuschalten.

Im Hinblick auf die neu gewonnenen Erkenntnisse aus der Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms wurde der *Csp*-Lokus erneut analysiert. Neue Nachbar-Gene und deren mögliche Auswirkungen auf den *Csp*-Lokus werden im dritten Teil diskutiert.

2. MATERIAL

2.1. Bakterien und Fliegenstämme

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac ⁻ F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15 Tn10(<i>tet</i> ^r)]
<i>E. coli</i> DH5α	supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

w ¹¹¹⁸		
scDNA1; w ^{1118*} (S49-9(4); w ^{1118*})	X-chromosomal	C. Arnold
lcDNA1; w ^{1118*} (L49-9(2); w ^{1118*})	III. Chromosom	C. Arnold
SSP5; w ^{1118*}	X-chromosomal	
SSP8; w ^{1118*}	X-chromosomal	C. Arnold
CLP1; w ^{1118*}	III. Chromosom	C. Arnold
CLP2; w ^{1118*}	III. Chromosom	C. Arnold
CLP3; w ^{1118*}	III. Chromosom	C. Arnold
CLP4; w ^{1118*}	III. Chromosom	C. Arnold
CSLP5; w ¹¹¹⁸	II. Chromosom	C. Arnold
SCSP; w ^{1118*}	X-chromosomal	K. Prüfert
CΔ27; w ^{1118*}	X-chromosomal	K. Sautter
LΔ8; w ^{1118*}	X-chromosomal	N. Pohar
CspU1 ^{we}		M. Gruhn
CspU1 ^r		K. Eberle
CspU1 ^{roc}		
Csp ^{K16}		K. Eberle
P478/16 (P2)	ZH-Mutagenese	K. Eberle
P318/17 (P1)	ZH-Mutagenese	K. Eberle

* alle P-Insertionslinien ebenfalls im CSP-Nullmutantenhintergrund

P1617/TM3		Bloomington 11617
UAS-flp-tnt ⁻¹⁰ /CyO	II. Chromosom	A. Keller
GMR-Gal ₄	II. Chromosom	A. Keller
		Bloomington 1104
elaV-Gal ₄	II. Chromosom	A. Keller
		Bloomington 248
p[UAS-FLP; w ⁺]	III. Chromosom	J.Duffy, via A. Keller; Wang et al 1997
TM3/TM6b; w ¹¹¹⁸		
Scu/CyO; w ¹¹¹⁸		

Stammsammlung des Lehrstuhls für Genetik und Neurobiologie Universität Würzburg.
Alle übrigen Chromosomen und Genotypen sind in Lindsley und Zimm 1992 beschrieben.

Hefestämme

Y190	Clontech
HF7c	Clontech
AH109	Clontech

2.2. Vektoren und Marker

pBluescript KS	Stratagene
pW8	Klemenz et al 1987
pTZ18R	K. Zinsmaier 1990 (MBI)
pAS 2.1	Clontech
pOT2	Invitrogen
100 bp Leiter	NEB
1 kb Leiter	NEB
λHind-Marker	MBI
RNA Leiter	GIBCO BRL

2.3. Oligonukleotide und Radionukleotide

Sequenzspezifische Primer	MWG
³⁵ P-dCTP	Amersham

2.4. Immunglobuline

DCSP1 (ab49)	A. Hofbauer, Würzburg
DCSP2 (KZ6D6)	K. Zinsmaier, PA, USA
8C3 (α -syx)	S. Benzer, bezogen über Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA
G β	Transduction Laboratories, KY, USA
DSAP47 (nc46)	A. Hofbauer, Würzburg
DSYNORF1 (3C11)	T. A. Godenschwege, Würzburg
HRP-conjugated goat anti-mouse	BioRad

2.5. Chemikalien und Reaktionskits

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von verschiedenen Herstellern (Appllichem, Gibco BRL, ICN, Merck, Roth, Sigma) bezogen.

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix	Perkin Elmer
DNA Labelling Kit	MBI Fermentas
ECL Western blotting analysis system	Amersham Pharmacia
QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN

DNeasy Tissue Kit	QIAGEN
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
Oligotex mRNA Mini Kit	QIAGEN
RNeasy Tissue Kit	QIAGEN
TRIZOL Reagent	GIBCO BRL
Vectastain ABC Kit (Normal und Elite)	Vector Laboratories

2.6. Medien und Pufferlösungen

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Medien und Pufferlösungen wurden nach Angaben des Laborhandbuches Sambrook et al 1989 hergestellt. Bei Bedarf wurde steril und RNasefrei gearbeitet.

Single Fly PCR Homogenisierungspuffer

10mM Tris, pH 8,2

1mM EDTA

25mM NaCl

vor Benutzung 200µg/ml Proteinase K hinzufügen

10x Formaldehyd-Gellaufpuffer

0,2M MOPS pH7

50mM Natriumacetat

10mM EDTA pH8

10x Laemmli

125mM Tris, pH 6,8

28% Glycerin

1% SDS

0,025% Bromphenolblau

25% β-Mercaptoethanol

ad 10ml dH₂O

3x-Probenpuffer (nicht reduzierend)

200mM Tris/HCl pH 6,7

6% SDS

15% Glycerin

0,025% Bromphenolblau

Homogenisierungspuffer für Membranfraktion und Dichtegradientenzentrifugation

Puffer A

150mM NaCl

10mM HEPES pH7,4

1mM EGTA

0,1mM MgCl₂

IP-Puffer

50mM KCl

10mM HEPES pH 7,4

2mM MgCl₂

1% Triton X100

Vor Benutzung 0,5mM PMSF und entsprechende Menge an Proteaseinhibitoren zugeben.

IP-Wasch-Puffer

50mM KCl

10mM HEPES pH 7,4

2mM MgCl₂

0,1% Triton X100

Vor Benutzung 0,5mM PMSF und entsprechende Menge an Proteaseinhibitoren zugeben.

Injektionspuffer Keimbahntransformation

5mM KCl

0,1mM Natriumphosphatpuffer

60µg Vektor und 20µg Helferplasmid pUCHsπΔ2-3 über Nacht bei -20°C in Ethanol fällen und in 100µl Injektionspuffer aufnehmen, vor dem Injizieren kurz abzentrifugieren (10 min).

2.7. Enzyme

Es wurden Restriktionsenzyme der Firmen GIBCO BRL, MBI Fermentas, Boehringer Ingelheim (Roche), New England Biolabs (NEB) verwendet.

Proteinase K	Pharmacia
RNase A	Roth
Shrimp alkaline Phosphatase	USB
Taq-Polymerase	SAWADY (Peqlab)
T4 Ligase	NEB/MBI

2.8. Geräte und Hilfsmittel

Einsätze für die UZ; Spezialanfertigung	Konrad Beraneck
FastBlot	Biometra/PeqLab
feinmaschige Siebe	Gitternetzgrößen 500µm und 800µm
Glashomogenisatoren	GLW
Maxi-Gel Apparatur	Biometra
Mini-Gel Apparatur	Biometra
Mupid Gelelektrophoresekammer	Eurogentec
Polyallomerröhrchen, 5 x 51 mm und 14 x 95 mm	Konrad Beraneck
Polycarbonatröhrchen, 11 x 34 mm	Konrad Beraneck
Ultrazentrifuge	Beckmann

3. METHODEN

3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden wurden dem Laborhandbuch Sambrook et al 1989 entnommen. Die Verwendung von Kits und Enzymen erfolgte nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen.

3.1.1. DNA-präparative Methoden

Die Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien erfolgte nach Birnboim und Doly, 1979 oder mithilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kits beziehungsweise in größerem Maßstab mit dem Plasmid Midi Kit von QIAgen. Aufreinigungen von PCR-Reaktionen oder Elutionen von DNA aus Agarosegelen erfolgten unter zur Hilfenahme von PCR-Purification Kit und QIAquick Gelextraktion Kit von QIAgen.

Genomische DNA aus Fliegen wurde nach der K-Acetat Methode oder mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit bzw dem DNeasy Kit von QIAgen isoliert.

3.1.2. Single Fly PCR

Der Genotyp einer Fliege kann in einer Single Fly PCR überprüft werden. Zur Isolation der DNA aus einer einzelnen Fliege kann diese in 50µl Puffer versetzt mit 0,5µl Proteinase K mit einer gelben Spitze zerrieben werden. Dieser Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 2 min bei 96°C denaturiert und kurz zentrifugiert.

Der Überstand enthält ausreichend genomische DNA, welche ohne weitere Aufreinigung in die PCR eingesetzt werden kann.

3.1.3. Linker-PCR und DNA-Sequenzierung

In einer Linker-PCR können durch Anhängen von Restriktionsschnittstellen an Primersequenzen zusätzliche Klonierungsmöglichkeiten geschaffen werden. Dabei ist zu

beachten, dass die Länge der Überhänge ein Schneiden durch das Restriktionsenzym erlaubt und der Linker im Verhältnis zur komplementären Sequenz des Primers nicht zu lang ist. Die Annealingtemperaturen im Verlauf der PCR müssen entsprechend der Länge des Linkers und der tatsächlich komplementären Sequenz angepasst werden, so dass meist eine „two Step“-PCR entsteht.

Die Sequenzierung der doppelsträngigen DNA-Moleküle erfolgt nach der Sanger-Methode mithilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix und anschließender Analyse im ABIprism Sequencer von Perkin Elmer.

3.1.4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem Labelling Kit von MBI Fermentas durch Einbau eines radioaktiv markierten P³²dCTPs. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt.

3.1.5. RNA-präparative Methoden

Alle Lösungen wurden mit 0,1% DEPC versetzt, über Nacht gerührt und autoklaviert. Alle benutzten Glaswaren wurden mindestens 8h bei 180°C hitzesterilisiert. Die Elektrophoresekammer wurde nach gründlichem Spülen mit 3%igem Wasserstoffperoxid gefüllt. Schlitten und Kamm wurden für mindestens 10 min in diese Lösung gelegt. Dieser Behandlung folgte ein erneutes Spülen mit DEPC-Wasser.

Gesamt-RNA wurde durch Homogenisierung von 100 Fliegen in 1ml TRIzol-Reagenz von GIBCO BRL isoliert. Das Homogenat wurde nach 5 min RT mit 200µl Chloroform versetzt 15 s gut geschüttelt. Nach 2 bis 3 min ist eine Trennung der Phasen zu erkennen. Das Gemisch wurde für 15 min bei 12 000xg und 4°C zentrifugiert, anschließend die klare obere Phase in 500µl Isopropanol überführt. Die RNA kann in diesem Gemisch bei -20°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Zur anschließenden Isolation der mRNA wurde die RNA gefällt, das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen und vor dem Lösen in 100µl DEPC-Wasser kurz luftgetrocknet. 60µl der gelösten RNA wurden dem Protokoll von QIAGEN des Oligotex mRNA Mini Kits unterzogen.

3.1.6. Northern Blot

Die isolierte RNA wurde mit RNA-Probenpuffer (10x MOPS, 37%Formaldehyd, Formamid) versetzt und für 20 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die RNA-Proben in einem Agarose-Formamid Gel unter dem Abzug in 1x MOPS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht, die RNA wurde im UV-Stratalinker der Firma Stratagene kovalent an die Membran gebunden. Die Markerspur wurde abgetrennt und nach einer 5-10 minütigen Inkubation in 5%iger Essigsäure bei Raumtemperatur in 0,5M NaAc pH 5,2; 0,04% Methylenblau gefärbt. Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte für 1 h bei 42°C, die Hybridisierung mit der denaturierten, radioaktiv markierten Sonde erfolgte über Nacht ebenfalls bei 42°C.

3.2. Membranfraktionen

Die intrazelluläre Prozessierung von Proteinen führt zum Beispiel über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, und endet in der Lokalisation als membranassoziertes oder membranintegriertes oder aber als membrandurchspannendes Protein.

Mithilfe hoher Beschleunigungen bei der Zentrifugation von Zellhomogenaten lassen sich Membranproteine und im Zytosol befindliche Proteine trennen. Das entstehende Pellet enthält membranständige, wohingegen der Überstand alle zytosolischen Proteine beinhaltet. Das Protokoll von van de Goor 1995 wurde im folgenden stark modifiziert verwendet.

Zur Herstellung der Membranfraktionen wurden 100 mit CO₂-betäubte Fliegen auf Metallkragen aufgefädelt, um ein nahezu synchrones Dekapitieren zu ermöglichen und in insgesamt 200µl Puffer A in einem kleinen Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 1000xg und 4°C zentrifugiert. Der postnukleäre Überstand (PNS, S1) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden mindestens 100µl S1 in Polycarbonat-Zentrifugationsröhrchen überführt und 1 h bei 100 000xg und 4°C zentrifugiert.

Die Behandlung der Membranpellets (P2) mit Detergenzien führt nach erneuter Zentrifugation zur möglichen Freisetzung einiger Membranproteine in den Überstand (S3). Eine Deacylierung mit 1M Hydroxylamin pH7 für 20 h bei RT führt zur Depalmytylierung und somit Lösung von membranassozierten Proteinen von der Membran, die mit

Fettsäureresten verankert waren. Inkubation des Pellets mit Na_2CO_3 für 1 h bei 4°C führt durch die pH-Änderung und Salzzugabe zur Zerstörung polarer Wechselwirkungen. Nach der Zentrifugation, 1 h bei $100\,000\times g$ und 4°C , enthält der Überstand (S3) periphere Membranproteine, die zuvor an integrale Membranproteine gebunden waren. Zur Analyse wurden die Proben mit 10x oder 2x Laemmli Probenpuffer versetzt und der Western Blot Analyse unterzogen.

3.3. Dichtegradientenzentrifugation

Zur Auftrennung subzellulärer Membranfraktionen wie zum Beispiel endoplasmatisches Retikulum, Plasmamembran, Golgimembranen, synaptische Vesikelmembranen in einem Glycerindichtegradienten wurde das Fliegenkopfhomogenat (S1) auf einen Gradienten zunehmender Glycerinkonzentrationen geschichtet und anschließend eine Stunde bei $100\,000\times g$ und 4°C zentrifugiert (van de Goor 1995, stark modifiziert).

Der Glyceringradient wurde in einem 10ml Polyallomerröhrchen geschichtet. Als sogenanntes Kissen wurden $250\mu\text{l}$ 50%ige Succhrose in Puffer A vorgelegt. Darüber wurden behutsam jeweils $1000\mu\text{l}$ von 25% in 5%-Schritten absteigend bis 5% Glycerin in Puffer A geschichtet. Dieser Gradient wurde über Nacht bei 4°C gelagert.

Um eine ausreichende Menge an Protein zur Verfügung zu haben, wurden über mehrere Tage Fliegen abgeschüttelt und bei -70°C gelagert. Sind ca. 10-15g Fliegen vorhanden, wurden diese in flüssigem Stickstoff (LN_2) schockgefroren und anschließend kurz gevortext, dabei brechen die meisten Köpfe vom Rumpf ab und können im folgenden Ablauf durch ein feinmaschiges Sieb abgetrennt werden. Die gefrorenen Köpfe wurden in einen Porzellanmörser übertragen und zu Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in 2ml Puffer A gelöst und anschließend 10 min bei $1\,000\times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und nochmals zentrifugiert. Dieser Überstand wurde anschließend auf den Gradienten gegeben und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde das Polyallomerröhrchen bei 4°C in eine Halterung eingespannt und der Boden mit einer Kanüle vorsichtig angestochen. Anschließend wurden vorsichtig jeweils ca. $500\mu\text{l}$ der Suspension in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. $10\mu\text{l}$ jeder Fraktion wurden mit $2\mu\text{l}$ 10xLaemmli versetzt und der Western Blot Analyse unterzogen. Durch die Behandlung der Fliegenköpfe mit LN_2 können die Proteine unter Umständen in Mitleidenschaft gezogen werden. Alternativ erfolgt daher die Vorbereitung, wie unter 3.2

beschrieben, mit der doppelten Fliegenmenge (200 Stück). Der Gradient besteht dann aus einem 80µl Succhrosekissen und wird mit je 160µl der jeweiligen Glycerinlösungen überschichtet. Es wurden 180µl des Überstandes S1 auf den Gradienten gegeben und wie beschrieben zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden hier jeweils 2 Tropfen pro Reaktionsgefäß aufgefangen und pro Fraktion ebenfalls 10µl für die Western Blot Analyse abgenommen.

3.4. Immunpräzipitation

Die Voraussetzung der Immunpräzipitation ist die Tatsache, dass ein Teil eines Proteins durch einen Antikörper als Sequenzepitop oder aber als Konformationsepitop spezifisch erkannt werden kann. Die Bindung des Antikörpers an das Protein ermöglicht eine Aufreinigung desselben. Der konstante Teil des Immunglobulins kann abhängig von der Unterklasse des Antikörpers an ProteinA und/oder ProteinG binden. Mit diesen Substanzen beschichtete Agarose-Beads binden die Immunglobuline an denen unter optimalen Bedingungen das gewünschte Protein gebunden ist. Die Bindung zwischen Antikörper und Protein ist von Protein zu Protein unterschiedlich, daher müssen die Arbeitsabläufe und Lösungen für jedes Protein modifiziert werden.

Durch die Bindung des Proteins an den Antikörper kann das Antigen aus einem Homogenat isoliert werden. Interagierende Proteine, die eine direkte oder indirekte Interaktion mit dem Antigen eingehen, können ebenfalls präzipitiert werden.

3.4.1. Verwendung von ProteinA-Agarose Beads der Firma GIBCO BRL

Zur Durchführung der hier beschriebenen Immunpräzipitation wurden alle Gerätschaften, Porzellanmörser, Pistill und 2 feinmaschigen Siebe (siehe 3.3) bei -70°C vorgekühlt. Pro Ansatz wurden ca. 2g Fliegen abgeschüttelt und 30 min bei -70°C deponiert, bevor die Fliegenköpfe wie beschrieben vom Rumpf getrennt und im vorbereiteten Mörser zu feinem Pulver zerrieben wurden. Dabei ist darauf zu achten, dass der flüssige Stickstoff nur zur Kühlung der Werkzeuge und Hilfsmittel zu benutzen ist und nicht direkt mit den Fliegen oder aber dem Pulver in Berührung kommt. Das Pulver wurde in einen 2ml Glashomogenisator überführt und in 2 ml Immunpräzipitationspuffer (0,5mM PMSF und Proteaseinhibitorcocktail vor Benutzung hinzufügen) mit mehreren Stößen durchmischt. Das

Homogenat wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. Die anschließenden Zentrifugationsschritte bei 14000 rpm und 4°C wurden so oft wiederholt, bis das Pellet fast nicht mehr sichtbar war (5-7x). 1ml des so von Zelldebris gereinigten Homogenats werden mit 250µl Antikörper (ab49 oder KZ6D6) über Nacht unter ständigem Invertieren bei 4°C inkubiert.

140µl in PBS gewaschene Agarose-Beads wurden kurz abzentrifugiert, das tatsächliche Volumen der Beads beträgt ca. 70µl, und mit dem ebenfalls kurz abzentrifugierten Überstand aus Antikörper-Antigenkomplexen und überschüssigem Antikörper und Antigen versetzt. Die Inkubation des Gemisches erfolgte für 3 bis 4 h unter Invertieren bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die Beads 3 mal mit Immunpräzipitations-Waschpuffer gewaschen, durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand vorsichtig aber vollständig abgenommen. Das Lösen der Beads erfolgte durch Zugabe von 500µl Waschpuffer und vorsichtiges Invertieren. Zur Kontrolle des Arbeitsvorgang wurden jeweils Proben der einzelnen Waschschrte genommen und diese auf dem Western Blot analysiert.

Dem letzten Waschschrte folgte das Lösen der Beads in 50µl 2xLaemmli und eine 20 minütige Inkubation bei 37°C. Vor dem Beladen des Gels wurden die Beads durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit den anderen Proben auf 65°C erhitzt.

3.5. Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analyse wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an 2x oder 10xLaemmli Probenpuffer versetzt und 5 min bei 65°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12,5%; Biometra Appartur, Mini und Maxi). Nach der Auftrennung wurden die Proteine durch ein Semi-Dry-Blotverfahren auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Diese wurde nach einem Blockvorgang in erwärmter und anschließend filtrierter 5%iger Milch in 1xTBST (ÜN, 4°C) in einer entsprechend konzentrierten Antikörper-Lösung inkubiert.

Der Nachweis erfolgte mithilfe des ECL-Systems der Firma Amersham Pharmacia.

3.6. Immunhistochemie an Kryostatschnitten von *Drosophila melanogaster*

Die Anfertigung von Kryostatschnitten adulter Fliegenköpfe als auch ganzer Fliegen wurde nach dem Protokoll von Buchner et al 1986 durchgeführt. Die monoklonalen Antikörper zur Detektion von CSP und den mutierten Isoformen wurden entsprechend verdünnt und durch ein DAB-Präzipitat mithilfe des Vectastain Normal oder Elite Kits gefärbt.

3.7. Keimbahntransformation

Zur Erzeugung transgener Fliegen mithilfe der Keimbahntransformation wurde ein P-Element-Vektor mit dem gewünschten Transgen gemeinsam mit einem Helferplasmid pUCHs π Δ 2-3 in die embryonale Keimbahn eingebracht. Die Vektoren wurden über Nacht in einem Verhältnis von 3:1 (60 μ g P-Element und 20 μ g Helferplasmid) in Ethanol gefällt und am Tag der Injektion in 100 μ l Injektionspuffer gelöst.

Nach der Synchronisation der Eiablage wurden alle Embryonen verworfen und nach weiteren 30 min neue Embryonen abgesammelt und bei 18°C mit frisch verdünntem 7%igem Natriumhypochlorid für maximal 45 s dechorioniert. Die Embryonen wurden in der gleichen Orientierung aufgereiht, auf einen mit Heptankleber beschichteten Objektträger geklebt und nach 20 minütigem Trocknen mit Voltalef 10 S Öl überschichtet. Noch im Stadium des syncytialen Blastoderms, ca. 90 min nach der Eiablage, wurden die Embryonen am posterioren Pol injiziert. Die injizierten Embryonen wurden bis zum Schlüpfen bei 18°C in einer Feuchtkammer gehalten (detaillierte Beschreibung in Prüfert 2001).

Nach Rückkreuzungen mit w¹¹¹⁸ Fliegen wurden die Nachkommen der F1 Generation nach dem P-Element kodierten Augenfarbenmarker durchsucht. Die darauf folgenden Kreuzungen dienten der Etablierung transgener Stämme und gleichzeitig der Insertionsortbestimmung des P-Elements.

4. ERGEBNISSE

4.1. Biochemische und phänotypische Analyse verschiedener CSP-Mutanten

Die Fusion zweier Membranen, zum Beispiel während der Exozytose in der Synapse, wird durch die Interaktion vieler innerhalb der Synapse lokalisierter Proteine eingeleitet. Das synapsen-assoziierte Protein CSP spielt in diesem Prozess eine noch nicht genau charakterisierte Rolle. In dieser und vorangegangenen Arbeiten wurde versucht, mithilfe gegebener Mittel mehr über die Eigenschaften und die Funktion dieses Proteins in *Drosophila melanogaster* herauszufinden.

Die herausstechendste und namensgebende Domäne des Cysteine String Proteins wurde im Vorfeld mehrfach mutiert (Arnold 1999) und bereits ansatzweise biochemisch charakterisiert. Die im Folgenden beschriebenen Experimente runden die biochemische Analyse der Cysteine String-Mutanten ab. Neue CSP-Mutanten wurden generiert und ebenfalls biochemisch untersucht. Bekannte phänotypische Auswirkungen wurden quantitativ erfasst.

4.1.1. Das mutierte CSP-Protein

Das CSP-Protein ist ein Multidomänen-Protein und wird von einem Gen (III. Chromosom; 79D3-4) kodiert. Durch alternatives Spleißen entstehen mindestens 3 unterschiedliche Transkripte. Die im Western Blot nachgewiesenen 4 Proteinisoformen variieren in ihrer Größe zwischen 32 und 36 kDa (Abb 1.2).

Für die im Folgenden beschriebene funktionelle Analyse des Proteins wurde die größte Proteinisoform gewählt, die durch die *Csp*-cDNA 49-9 (cDNA1) kodiert wird (Abb 1.4). Die beiden Rescue-Vektoren enthalten in ihrer Länge variierende genomische Fragmente, die den *Csp*-Promotor und die nötigen regulatorischen Sequenzen bereitstellen, um eine wildtypische CSP-Expression zu gewährleisten (Abb 4.1). Rescue-Transformationen mit diesen Konstrukten im P-Elementvektor pW8 (Klemenz et al 1987) zeigten, dass bereits eine Isoform, exprimiert unter der Kontrolle des kürzeren genomischen Fragmentes (*scDnaI*),

hinreichend die beschriebenen Phänotypen der CSP-Nullmutante revertiert (Arnold 1999; Nie et al 1999).

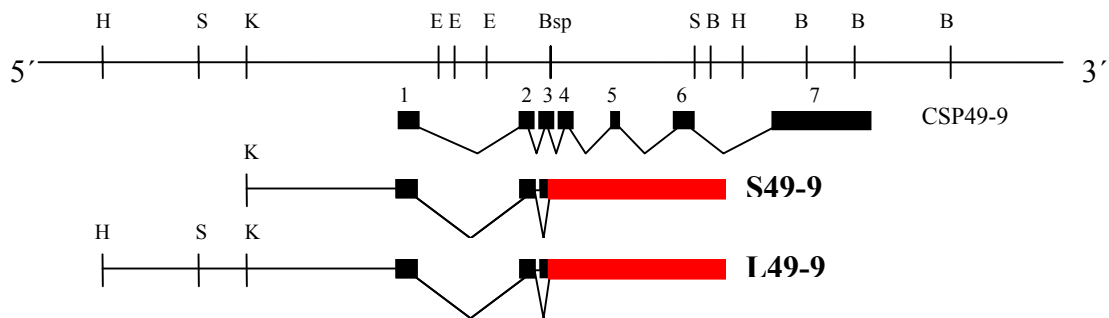


Abb 4.1 Schematische Darstellung der zwei Rescue-Konstrukte, die in den P-Elementvektor pW8 inkloniert wurden. Die jeweiligen genomischen Promotorfragmente wurden über die Bsp1407I Schnittstelle im 3. Exon an die cDNA 49-9 (cDNA1) ligiert; *S49-9* (*scDna1*): cDNA1 mit kurzem genomischen Fragment; *L49-9* (*lcDna1*): cDNA1 mit langem genomischen Fragment B: BamHI; Bsp: Bsp1407I; E: EcoRI; H: HindIII; K: KpnI; S: Sall

Die namensgebende Domäne des Proteins, der Cysteinstrang, stellt durch die Möglichkeit der Veresterung mit Fettsäuren einen potentiellen Membrananker dar. Eine Deacylierung des wildtypischen CSPs führt jedoch nicht zu einer Lösung des Proteins von der Membran, sondern entfernt lediglich die Palmitylreste von Cysteinen und erhöht die relative Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel (van de Goor und Kelly 1996).

Die Untersuchung der Deletion der vorhandenen Cysteine oder deren Austausch durch Serine (Abb 4.2) in den mutierten Proteinisoformen CLP (Cysteinless Protein) und SSP (Serine String Protein) zeigen in Membranfraktionierungen, dass der Cysteinstrang möglicherweise die Funktion eines „Leaders“ für den Transport des Proteins an die Membran übernimmt (Arnold 1999).

Zur weiteren Charakterisierung dieser Funktion des Cysteinstrangs wurden zusätzlich die Proteine CSLP (Cysteine stringless Protein) und SCSP (Short Cysteine String Protein; Abb 4.2) in Membranfraktionierungen untersucht. Mutationen in anderen hochkonservierten Bereichen des Cysteine String Proteins lieferten weitere Informationen, um das Puzzle der CSP-Funktion Teil für Teil zu vervollständigen.

Der Bereich der Linkerdomäne, zwischen der DnaJ-Domäne und dem Cysteinstrang (Abb 1.3 und 1.5), scheint bei der Exozytose ebenfalls eine Rolle zu spielen (Zhang et al 1999). Die Linkerdomäne wurde in der Deletionsmutante LΔ8, um 8 Aminosäuren verkürzt (Abb 4.2). Die Deletion der 8 Aminosäuren AEQFGREEN wurde mithilfe einer *in vitro* Mutagenese mit folgenden Oligonukleotiden in einem Schritt erzielt:

DnaJ...YDNYGSLGLYI... ...VNAYFVVTSPAVKAVVICC...Cysteinstrang
AEQFGEEN

LΔ8 forward:

5' C GGC TTG TAC ATA GTC AAC GCA. TAC TTC GTG GTC ACT TCA. CCG 3'
G L Y I V N A Y F V V T S P

LΔ8 reverse:

5' CGG TGA AGT GAC CA.C GAA GTA TGC GTT GAC TAT GTA CA.A GCC G 3'

Zur Klonierung des Transformationsvektors wurde das lange Promotorstück (HindIII/Bsp1407I) an die cDNA1 ligiert (Abb 4.1; Arnold 1999). Keimbahntransformationen führten zu zwei unabhängigen Transformanten.

In einer weiteren Mutante, CΔ27, wurde der variabelere C-terminale Bereich des Proteins deletiert. Die Deletion basiert auf der Insertion dreier Stopcodons. So werden in dieser Mutante die letzten 9 Codons des Proteins nicht translatiert (Abb 4.2, Sautter 2000).

	1
CSP1	MDKRKLS STSGDSLYEILGLPKTATGDDIKKTYRKLALKYHPDKNPDNVDA
SCSP	MDKRKLS STSGDSLYEILGLPKTATGDDIKKTYRKLALKYHPDKNPDNVDA
CSLP	MDKRKLS STSGDSLYEILGLPKTATGDDIKKTYRKLALKYHPDKNPDNVDA
SSP	MDKRKLS STSGDSLYEILGLPKTATGDDIKKTYRKLALKYHPDKNPDNVDA
CLP	MDKRKLS STSGDSLYEILGLPKTATGDDIKKTYRKLALKYHPDKNPDNVDA
CΔ27	MDKRKLS STSGDSLYEILGLPKTATGDDIKKTYRKLALKYHPDKNPDNVDA
LΔ8	MDKRKLS STSGDSLYEILGLPKTATGDDIKKTYRKLALKYHPDKNPDNVDA
	51
CSP1	ADKFKEVNRAHSILSDQTKRNIYDNYGSLGLYIAEQFGEENVNAYFVVT S
SCSP	ADKFKEVNRAHSILSDQTKRNIYDNYGSLGLYIAEQFGEENVNAYFVVT S
CSLP	ADKFKEVNRAHSILSDQTKRNIYDNYGSLGLYIAEQFGEENVNAYFVVT S
SSP	ADKFKEVNRAHSILSDQTKRNIYDNYGSLGLYIAEQFGEENVNAYFVVT S
CLP	ADKFKEVNRAHSILSDQTKRNIYDNYGSLGLYIAEQFGEENVNAYFVVT S
CΔ27	ADKFKEVNRAHSILSDQTKRNIYDNYGSLGLYIAEQFGEENVNAYFVVT S
LΔ8	ADKFKEVNRAHSILSDQTKRNIYDNYGSLGLYI... ...VNAYFVVT S
	101
CSP1	PAVKAVVIC CAVITGCCCCCCCCCFCC GKFKPPVNESH DQYSHLNRP
SCSP	PAVKAVVIC CAVITGCCCC... ... NFCC GKFKPPVNESH DQYSHLNRP
CSLP	PAVKAVVIC CAVITG... ... NFCC GKFKPPVNESH DQYSHLNRP
SSP	PAVKAVVIC CAVITGSSSSSSSSSNFCC GKFKPPVNESH DQYSHLNRP
CLP	PAVKAVVIC SAVITG... ... NFSS GKFKPPVNESH DQYSHLNRP
CΔ27	PAVKAVVIC CAVITGCCCCCCCCCFCC GKFKPPVNESH DQYSHLNRP
LΔ8	PAVKAVVIC CAVITGCCCCCCCCCFCC GKFKPPVNESH DQYSHLNRP

151

CSP1	DGNREGNDMPHLGQPPRLEDVDLDDVNLGAGGAPVTSQ PREQAGGQ PVF
SCSP	DGNREGNDMPHLGQPPRLEDVDLDDVNLGAGGAPVTSQ PREQAGGQ PVF
CSLP	DGNREGNDMPHLGQPPRLEDVDLDDVNLGAGGAPVTSQ PREQAGGQ PVF
SSP	DGNREGNDMPHLGQPPRLEDVDLDDVNLGAGGAPVTSQ PREQAGGQ PVF
CLP	DGNREGNDMPHLGQPPRLEDVDLDDVNLGAGGAPVTSQ PREQAGGQ PVF
CA27	DGNREGNDMPHLGQPPRLEDVDLDDVNLGAGGAPVTSQ PREQAGGQ PVF
LA8	DGNREGNDMPHLGQPPRLEDVDLDDVNLGAGGAPVTSQ PREQAGGQ PVF

201

CSP1	AMPPPSGAVGVN FTGA PVAANENTSLNTTEQTTYTPDMVNQKY
SCSP	AMPPPSGAVGVN FTGA PVAANENTSLNTTEQTTYTPDMVNQKY
CSLP	AMPPPSGAVGVN FTGA PVAANENTSLNTTEQTTYTPDMVNQKY
SSP	AMPPPSGAVGVN FTGA PVAANENTSLNTTEQTTYTPDMVNQKY
CLP	AMPPPSGAVGVN FTGA PVAANENTSLNTTEQTTYTPDMVNQKY
CA27	AMPPPSGAVGVN FTGA
LA8	AMPPPSGAVGVN FTGA PVAANENTSLNTTEQTTYTPDMVNQKY

Abb 4.2 Aminosäuresequenzen der verschiedenen CSP-Mutanten abgeleitet von der codierenden Sequenz der cDNA1, das Serin an Position 7, fett dargestellt, wird vermutlich in Anlehnung an die Phosphorylierung in Vertebraten durch PKA phosphoryliert. Die J-Domäne ist blau unterlegt, das charakteristische HPD-Motiv hervorgehoben. Der Cysteinstrang und die Mutationen sind in Rot dargestellt. Die Epitope, der in der Arbeit verwendeten Antikörper, sind in grün gezeigt. Das N-terminale Epitop wird von DCSP1 (ab49), das andere Epitop von DCSP2 (KZ6D6) erkannt.

Die biochemischen Eigenschaften und die Lokalisation des CSP-Proteins innerhalb der Synapse beziehungsweise an den Vesikelmembranen spielen eine zentrale Rolle für seine Funktion im Kreislauf der Transmitterausschüttung. Daher wurden alle mutierten Proteine (Abb 4.2) aus Kopfhomogenaten adulter Fliegen im Western Blot, in Membranfraktionierungen und in Glycerindichtegradienten analysiert. Die Verteilung der Proteine in immunhistochemischen Gehirnschnittpräparaten wurde untersucht und der Phänotyp der transgenen Tiere charakterisiert.

4.1.2. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Western Blot

Die mutierten Cysteine String Proteine CLP, SSP und CSLP zeigen im Western Blot die in Abb 4.3 dargestellten Eigenschaften. Zur Verdeutlichung der Expressionsstärke der verschiedenen Mutanten wurden Homogenate von ein und zwei Köpfen aufgetragen. Die 4 wildtypischen Isoformen sind gut zu erkennen, die kleinste CSP-Isoform wird am stärksten

exprimiert. Die intensive Bande des Rescue-Proteins CSP1 zeigt eine starke Expression dieser größten Isoform. Da die Expression vom *Csp*-eigenen Promotor und regulatorischen Sequenzen getrieben wird, aber kein Spleißen der cDNA stattfindet, entspricht die Proteinmenge der CSP1-Bande der Summe aller wildtypisch exprimierten CSP-Isoformen. Die mutierten CSP-Isoformen sollten daher ebenfalls in dieser Intensität nachweisbar sein, fallen aber teilweise um einiges schwächer aus.

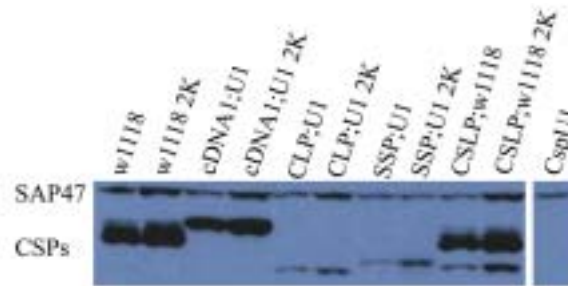


Abb 4.3 Western Blot von Fliegenköpfen, homogenisiert in 10µl 2x Laemmli. Übersicht der von Christine Arnold erzeugten Mutanten. Der Wildtyp ist durch w^{1118} -Fliegen vertreten; die Rescue-Transformante cDNA1;U1 dient als Positivkontrolle; CspU1: CSP-Nullmutante. Der Nachweis des Sap47 Proteins dient als Beladungskontrolle; weitere Erläuterungen im Text; Inkubation mit ab49 1:100, nc46 1:1000

Die rechnerisch bestimmten Molekulargewichte der mutierten Proteine CLP, SSP und CSLP lassen eine Verringerung von ca. 0-1 kDa erwarten. Tatsächlich ist hier ein Unterschied von 6-7 kDa zu beobachten. Wie bereits erwähnt sind einige Cysteine mit Fettsäureresten verestert. Der Verlust der Cysteine führt daher auch zum Verlust dieser Fettsäuren und so verringert sich das Molekulargewicht beträchtlich. Der Laufgeschwindigkeitsunterschied zwischen CLP und SSP entspricht tatsächlich etwa dem Molekulargewichtsunterschied von 1,219 kDa, der darauf beruht, dass dem CLP-Protein im Vergleich zum SSP-Protein 11 Aminosäuren fehlen. Der rechnerisch bestimmte Größenunterschied zwischen dem CSLP-Protein ohne Cysteinestrang und dem CLP-Protein ohne jegliche Cysteinreste beträgt 0,064 kDa, scheint im Gel aber beobachtbar zu sein.

Mutationen in anderen Bereichen des Cysteine String Proteins zeigen im Western Blot die im Folgenden beschriebenen Eigenschaften. Die errechnete Größe des nachgewiesenen LΔ8-Proteins ist im Vergleich mit der größten CSP-Proteinisoform CSP1 um 1,048 kDa verringert und daher im Wildtyphintergrund aufgrund von Überlagerungen der Banden schlecht zu erkennen. Die im Gel beobachtete Größe des LΔ8-Proteins stimmt mit der rechnerisch erwarteten in etwa überein. Die Intensität der LΔ8-Bande ist jedoch verglichen mit der CSP1-

Bande etwa halbiert und somit deutlich schwächer (Abb 4.4A).

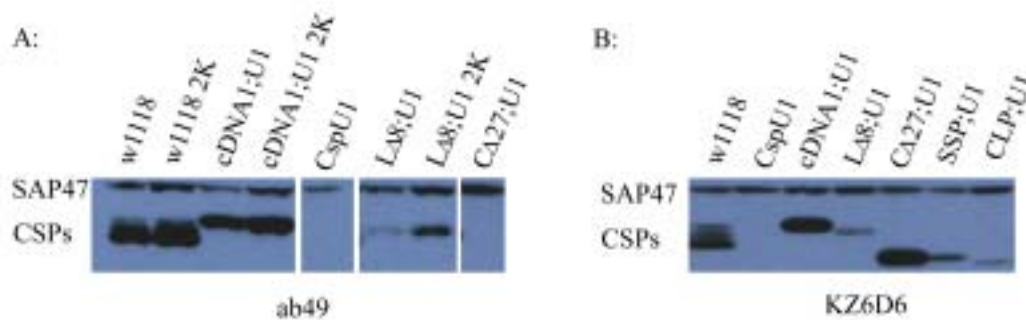


Abb 4.4 Western Blot von Fliegenköpfen, homogenisiert in 10µl 2xLaemmli. Gezeigt sind jeweils ein und zwei homogenisierte Köpfe (2K) der untersuchten Fliegen. Der Wildtyp ist durch w¹¹¹⁸-Fliegen vertreten; die Rescue-Transformante cDNA1;U1 dient als Positivkontrolle; CspU1: CSP-Nullmutante. Der Nachweis des Sap47 Proteins dient als Beladungskontrolle; weitere Erläuterungen im Text , **A**: Inkubation mit ab49 1:100 bzw. 1:150 (CΔ27;U1) ; nc46 1:1000; **B**: Inkubation mit KZ6D6 1:50, nc46 1:500

Obwohl die als Epitop identifizierten Aminosäuren in dem CΔ27 Protein noch vorhanden sind (Abb 4.2), muß der Nachweis dieses Proteins mit dem Antikörper DCSP2 (KZ6D6) erfolgen, da eine Detektion mit dem Antikörper DCSP1 (ab49) nicht möglich ist (Abb 4.4A).

Die Intensität der Banden ist abhängig von der eingesetzten Menge an Antikörper und fällt aufgrund des geringeren Antikörpertiters bei KZ6D6 schwächer aus. Der Verlust von 27 Aminosäuren verringert das scheinbare Molekulargewicht unter diesen Bedingungen nicht wie rechnerisch ermittelt um 3,868 kDa, sondern um ca. 6-7 kDa. Die Expressionsstärke ist mit der Überexpression des Rescue-Konstrukts *cDna1* vergleichbar.

4.1.3. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Membranfraktionen

In mehreren voneinander unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die mutierten Proteine, die keinen Cysteinstrang beinhalten (SSP und CLP), im Gegensatz zum wildtypischen CSP nicht an Membranen gebunden werden, so dass sie bei der Präzipitation von Membranen im Überstand bleiben (siehe Diskussion 5.1.1).

Alle bereits vorgestellten Proteine wurden hinsichtlich dieser Fragestellung analysiert. Dazu wurden mindestens 100 Fliegen zeitgleich dekapitiert (siehe 3.2). Nach Homogenisierung und

Ultra-Zentrifugation wurden zuerst Anteile von S2 (Überstand 2, membranfreier Überstand) und P2 (Pellet 2, Ansammlung der Membranen) auf dem Western Blot untersucht (Abb 4.5). Anschließend wurde in einem neuen Experiment P2 mit deacylierendem Hydroxylamin versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurden S3 (Überstand 3, herausgelöste Membranproteine) und P3 (Pellet 3, Ansammlung der Membranen) analysiert. Das Ergebnis der Membranfraktionierung zeigt folgende Aufteilung der Proteine zwischen membranfreier- (S2) und Membranfraktion (P2) (Abb 4.5).

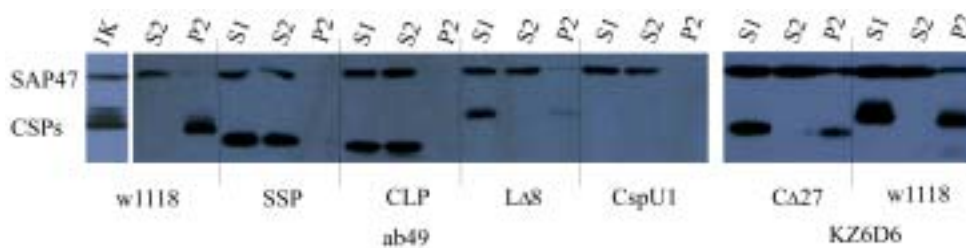


Abb. 4.5 Western Blot: Membranfraktionen, 2,5 Kopfäquivalente pro Spur. Die Proteine entstammen Fliegen im Nullmutantenhintergrund. S1=Überstand 1, Gehirnhomogenate ohne Zelldebris; S2= membranfreier Überstand 2 nach der Zentrifugation; P2= Membranpellet 2. w¹¹¹⁸ stellt die Positivkontrolle dar, CspU1 stellt als Nullmutante die Negativkontrolle des Experimentes dar. Weitere Erläuterungen im Text; Inkubation mit ab49 1:200, nc46 1:1000 und KZ6D6 1:50, nc46 1:500

Die Substitution des Cysteinstrangs durch einen Serinstrang (SSP) führt wie der Verlust des gesamten Cysteinstrangs (CLP) zu einer Lokalisation des gesamten Proteins in der membranfreien Fraktion, in der auch die löslichen Proteine des Zytoplasmas zu finden sind. Das SAP47 Protein, welches an keine Membran gebunden ist, dient hier als Vergleichs- und Positivkontrolle. Es ist nahezu ausschließlich in den Proben von S2 zu finden. Die Spuren, die mit Aliquots von S1 beladen sind, zeigen das Ausgangshomogenat nach der Abtrennung der partikulären Fraktion (Chitinfragmente, Zellkerne).

Abweichend verhalten sich die Proben der mutierten Proteinisoformen, in denen andere Bereiche des Proteins betroffen sind. Sowohl das LΔ8-Protein (siehe auch Abb 4.8 und 4.9) als auch das CΔ27-Protein scheinen, wie das wildtypische Protein, an der Membran lokalisiert zu sein. In der Spur LΔ8 P2 ist eine sehr schwache Bande des LΔ8-Proteins nachzuweisen. Dies deutet auf eine Degradation des Proteins während der Ultra-Zentrifugation hin. Der Verlust der letzten 27 Aminosäuren hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Lokalisation des mutierten Proteins (vergl. 4.1.6). Allerdings erscheint das Protein auf dem Blot wesentlich kleiner als der Verlust von 27 Aminosäuren vermuten lässt. Es läuft auf der Höhe von CLP

und SSP, deren Größe maßgeblich durch den Verlust der Palmitylreste, die nicht mehr mit den nicht vorhandenen Cysteinresten verestert werden, reduziert wird.

Die zu beobachtenden SAP47 Banden in den P2-Spuren der Fliegenlinien LΔ8, CΔ27 und w^{1118} widersprechen obiger Aussage als Positivkontrolle nicht. Im verwendeten Versuchsprotokoll besteht die Möglichkeit, dass der Überstand S2 nicht vollständig vom Membranpellet P2 abgenommen wird (Pellet wird nicht gewaschen).

Die Untersuchung des mutierten CSLP-Proteins gestaltete sich schwierig. Die generierten mutanten Fliegen konnten nur unter großem Aufwand in die Nullmutante eingekreuzt werden und waren im $CspUI^{we}$ -Hintergrund nicht lebensfähig. Auch eine erneute Transformation des neu klonierten Konstruktes brachte keine Veränderung der Situation. Daher wurden für die Versuche transgene Fliegen im Csp^+ -Hintergrund (w/w^- ; CSLP5/CSLP5; Csp^+/Csp^+) verwendet.

Das CSLP-Protein enthält den richtungsweisenden Cysteinstrang nicht mehr, wohl aber die flankierenden Cysteinpaare. Da nicht bekannt ist, welche der 15 Cysteine palmityliert werden, besteht die Möglichkeit, dass die verbliebenen 4 Cysteine ausreichen könnten, um das Protein an die Membran zu leiten.

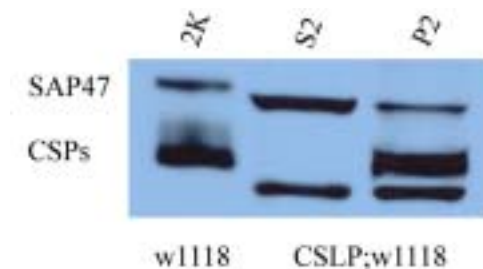


Abb. 4.6 Western Blot: Membranfraktionen von CSLP; w^{1118} , großes Biometra Gel; 2 Köpfe von w^{1118} Fliegen stellen die Positivkontrolle dar; S2= membranfreier Überstand 2 nach der Zentrifugation; P2= Membranpellet 2; SAP47 dient als Vergleichs- und Positivkontrolle; weitere Erläuterungen im Text. Inkubation mit ab49 1:200, nc46 1:500

Das Membranfraktionierungsexperiment zeigt, dass mehr CSLP an die Membran gebunden wird (Abb 4.6), als im Zytosol zu finden ist, während die wildtypischen Isoformen alle in der Membranfraktion zu finden sind. Der zu beobachtende Shift in der Größe der Vergleichsbande des SAP47 Proteins, beruht auf einer vielfach größeren Menge an Protein in den Spuren S2 und P2.

Da die phänotypisch untersuchten CSLP Mutanten im $CspUI^{we}$ Hintergrund ebenfalls

temperatursensitiv paralytisch reagieren, scheint diese mutierte Form des CSPs die Exozytose nicht zu unterstützen, oder aber die Menge des an die Membran gebundenen Proteins reicht für die Aufrechterhaltung der wildtypische CSP-Funktion nicht aus.

Die Frage, ob die Palmitylreste an den Cysteinen für die Membranverankerung verantwortlich sind, wurde durch Deacylierung der mutierten Proteine L Δ 8, C Δ 27 und SCSP untersucht. Dazu wurden Membranfraktionierungen durchgeführt und das Pellet P2 weiter mit Hydroxylamin behandelt. Die Inkubation der Membranpellets P2 mit 1M Hydroxylamin erfolgte 20h bei Raumtemperatur.

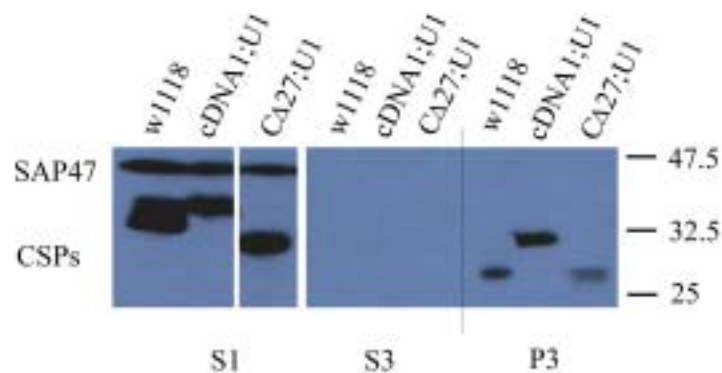


Abb.4.7 Western Blot: Membranfraktionen von Gehirnhomogenat der Fliegen w^{1118} , $cDNA1;U1$ und $C\Delta 27;U1$. Inkubation von P2 20h RT in 1M Hydroxylamin pH7, 2,5 Kopfüquivalente pro Spur, S3= Überstand mit herausgelösten Proteinen nach der Zentrifugation; P3= Membranpellet 3. w^{1118} und $cDNA1$ stellen die Positivkontrolle dar. Gezeigt ist die entstehende Gewichtsreduktion nach dem Verlust der Palmitylreste in P3, SAP47 dient als Beladungskontrolle. Weitere Erläuterungen im Text. Inkubation mit KZ6D6 1:50, nc46 1:500

Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 100 000xg befinden sich die wildtypischen Isoformen und die überexprimierte größte Isoform des Proteins CSP1 weiterhin vollständig im Pellet P3 (Abb 4.7). Das trunkierte Protein C Δ 27 befindet sich ebenfalls im Membranpellet P3 und ist wie das wildtypische CSP um ca. 6-7 kDa in der Größe reduziert. Der Shift weist darauf hin, dass das C Δ 27-Protein ebenfalls in wildtypischem Umfang palmityliert vorliegt und nach der Depalmitylierung wie das wildtypische Protein an der Vesikelmembran verankert bleibt.

Eine Untersuchung der Depalmitylierung des CSLP-Proteins war unter den gegebenen Umständen nicht möglich, da die deacylierten wildtypischen Isoformen die CSLP-Bande verdecken. Um eine bessere Auftrennung der mutierten Proteinisoformen SCSP, L Δ 8 und C Δ 27 zu erreichen und um größere Proteinmengen auf das Gel laden zu können, wurden in den folgenden Experimenten zumeist große Biometra-SDS-Gele verwendet (Abb 4.8).

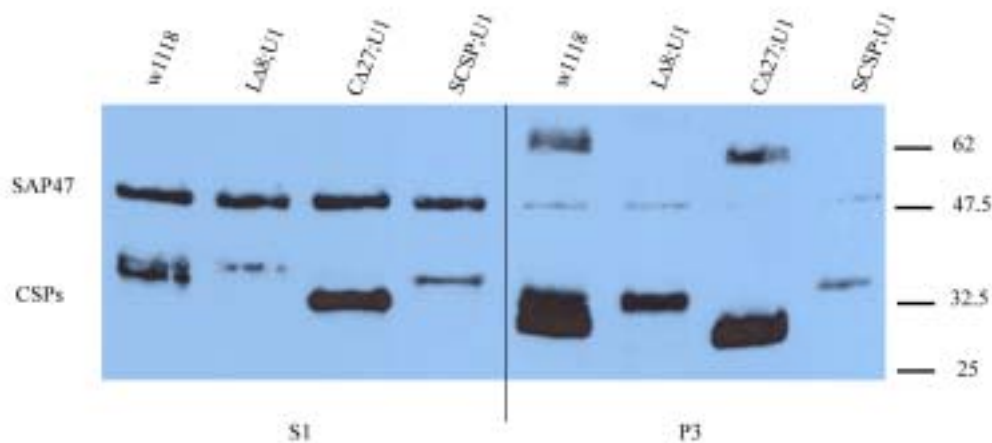


Abb 4.8 Western Blot: Membranfraktionen von Gehirnhomogenat der Fliegen w^{1118} , $L\Delta 8;U1$, $C\Delta 27;U1$ und $SCSP;U1$. Großes Biometra-Gel; P3: Pellet nach Inkubation von P2 20h RT in 1M Hydroxylamin pH7 und Zentrifugation; ca. 25 Kopfäquivalente pro Spur. Gezeigt ist die entstehende Gewichtsreduktion nach dem Verlust der Palmitylreste in P3, SAP47 dient als Beladungskontrolle, in diesem Fall war das weiterverarbeitete Pellet 2 mit geringen Mengen an S2 versetzt. Genauere Erläuterungen im Text. Inkubation KZ6D6 1:100, nc46 1:500

In allen transgenen Mutanten konnte beobachtet werden, dass die untersuchten Proteine sich auch nach einer Deacylierung weiterhin an die Membran gebunden nachweisen lassen und in der löslichen Fraktion S3, wie bereits in Abb 4.7 gezeigt, nicht zu detektieren sind. Die Deacylierung führt zu einem Gewichtsverlust der Proteine, der sich in einem veränderten Laufverhalten und einem Shift von 6-7 kDa auf dem Western Blot zeigt. Eine Ausnahme bildet hier die SCSP Isoform. In diesem Experiment scheint die Gewichtsreduktion durch Deacylierung kaum beobachtbar zu sein. Vergleicht man die Banden von w^{1118} , $L\Delta 8$ und SCSP in dem Ausgangshomogenat S1, zeigt sich, dass das Protein SCSP bereits ca. 3-4 kDa kleiner ist als die größte wildtypische Isoform, was durch die geringere Palmytylierung der verbliebenen Cysteine zu erklären ist. Eine Aussage über den genauen Grad der Palmytylierung des SCSP-Proteins ist allerdings aufgrund dieser Experimente nicht möglich. In einer Wiederholung der Depalmytylierungsexperimente von SCSP konnte eindeutig gezeigt werden, dass es zu einer Gewichtsreduktion des Proteins kommt (Abb 4.9). Da bereits weniger Cysteine mit Palmytylresten verestert sind, fällt der Größenshift geringer aus. Dennoch ist die Hälfte des Cysteinstrangs ausreichend, um das Protein an die Membran zu leiten und um es dort fest zu verankern.

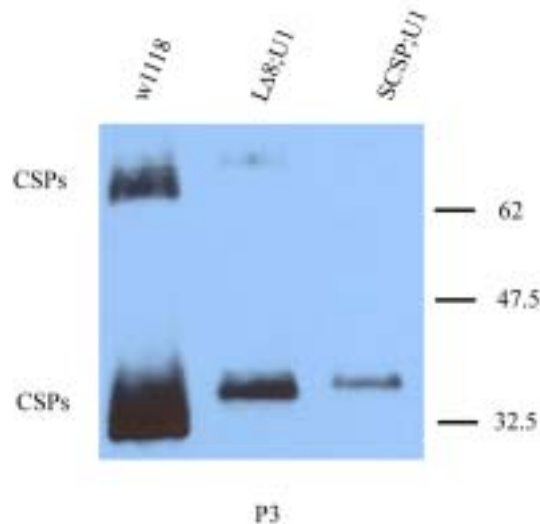


Abb 4.9 Western Blot: Membranfraktionen von Gehirnhomogenat der Fliegen w^{1118} ; $L\Delta 8;U1$ und $SCSP;U1$. Großes Biometra-Gel, Inkubation von P2 20h RT in 1M Hydroxylamin pH7; ca. 22 Kopfüquivalente pro Spur. Gezeigt ist die entstehende Gewichtsreduktion nach dem Verlust der Palmitylreste in P3 vgl. auch Abb 4.7 und Abb 4.8. Erläuterungen sind im Text zu finden. Inkubation mit ab49 1:200

Wie der Temperatur-sensitiv paralytische Phänotyp zeigt (Prüfert, 2001, siehe 4.1.7), ist die Funktion des Proteins ebenso wie die des $L\Delta 8$ -Proteins trotz Lokalisation an der Membran gestört. Die zu beobachtenden Banden bei ca. 70 kDa in den Abbildungen 4.8 und 4.9 stellen CSP Dimere dar, welche durch die eingesetzten großen Proteinmengen in diesen Experimenten erkennbar werden.

4.1.4. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Glycerindichtegradienten

Die bisher dargestellten Versuche zeigen, dass die untersuchten Proteinisofornen an Membranen gebunden sind und auch durch Deacylierung nicht von oder aus ihr herausgelöst werden können. Eine Aussage über die Natur der Membran kann aufgrund dieser Experimente nicht gemacht werden. Die wildtypischen Isoformen des CSP sind an die synaptische Vesikelmembran gebunden (Van de Goor, 1996). Mithilfe der Glycerindichtegradientenzentrifugation können Membranen ihrer Größe nach aufgetrennt werden (3.3). Auf diese Weise lassen sich Membran-gebundene Proteine einzelnen Membranfraktionen zuordnen.

Im folgenden kamen zwei verschiedene Versuchsansätze zum Einsatz, welche sich im

wesentlichen durch Volumen, Alter der Proben und der Dicke der Gradientenschichten unterscheiden. Die Dichtegradientenzentrifugationen lieferten trotz verschiedener Ansätze reproduzierbare Ergebnisse. Die in diesem experimentellen Ansatz aufgefangenen Aliquots lassen sich nicht eindeutig einer Glycerinschicht zuordnen, da diese Schichten nicht exakt voneinander zu trennen sind und die Proben durch Einstechen der Pollyallomerröhrchen am Boden und das Auffangen der austretenden Tropfen gewonnen werden. Diese Tropfen variieren aufgrund der Viskosität der Flüssigkeiten in ihrem Volumen. Daher ist die Zuordnung der einzelnen Glycerinschichten eher grob.

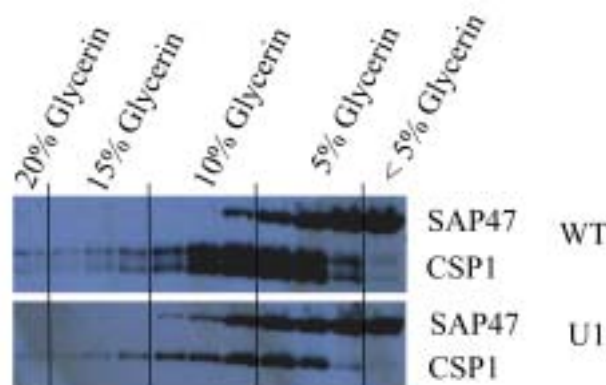


Abb 4.10 Western Blot: Glycerindichtegradient mit großen Volumina für CSP1 aus der Rescue-Transformante cDNA1 im Csp⁺ und Csp⁻-Hintergrund. Das SAP47 Protein dient als Vergleichsprotein, welches sich wie ein zytosolisches Protein verhält. Weitere Einzelheiten im Text; Inkubation mit ab49 1:100 und nc46 1:500

Die Analyse der Rescue-Transformante im Wildtyp und Nullmutantenhintergrund lässt eine deutliche Ansammlung von CSP-Isoformen in den 10 und 5%igen Schichten erkennen (Abb 4.10). Diese Fraktionen entsprechen der Ansammlung von synaptischen Vesikelmembranen. Die wildtypischen CSP-Isoformen befinden sich zum großen Teil an den synaptischen Vesikeln. Auch die vierfach überexprimierte größte CSP-Isoform CSP1 ist an die Vesikelmembran lokalisiert. Das SAP47-Protein, ein zytosolisches Protein ist in den membranfreien Fraktionen der 5% und niedriger konzentrierten Glycerinschicht zu finden. Die zusätzliche Expression der wildtypischen CSP-Isoformen scheint keinen Einfluss auf die Verteilung der transgenen Proteine zu haben.

Durch die Inkubation eines Blots der Rescue-Transformante cDNA1;U1 mit einem Antikörper gegen ein an die Plasmamembran gebundenes Protein, zum Beispiel Syntaxin, wird die Verteilung der Proteine an die verschiedenen Membrankompartimente deutlicher (Abb 4.11).

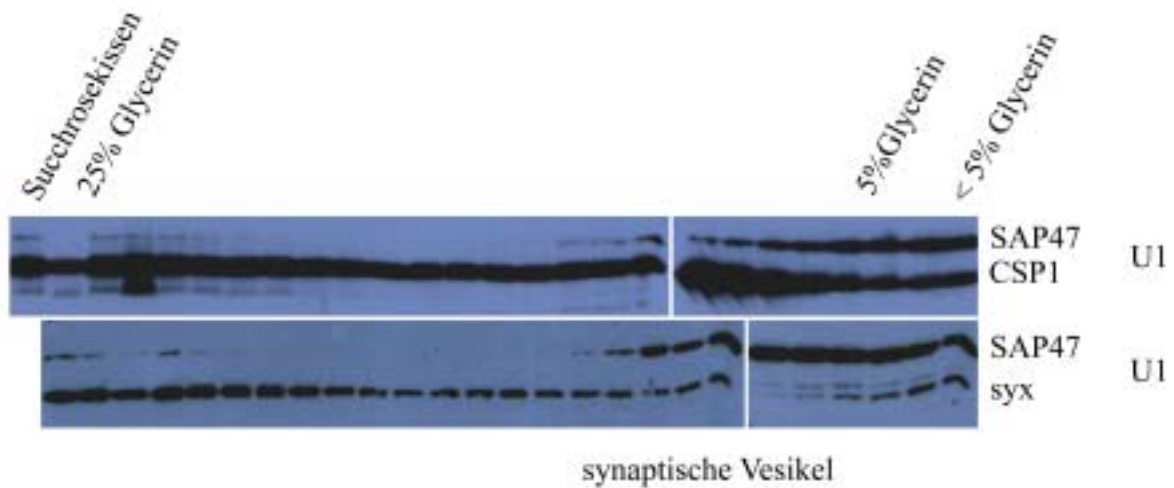


Abb 4.11 Western Blot: Glycerindichtegradient mit kleinen Volumina. Gehirnhomogenat aus der Rescue-Transformante cDNA1 im Nullmutantenhintergrund wurde verwendet. Das SAP47 Protein dient als Vergleichsprotein, welches sich wie ein zytosolisches Protein verhält. Die Beschriftung des Gradienten im Folgenden beschreibt den absteigenden Glyceringehalt, der der Schichtung des Gradienten entspricht. Proben eines Gradienten wurden auf 4 Gele aufgetragen und anschließend mit ab49 1:100 und nc46 1:500 oder mit 8C3 1:75 und nc46 1:500 inkubiert; syx= Syntaxin

Es ist zu erkennen, dass der Anteil an Cysteine String Protein in den die synaptischen Vesikel darstellenden Fraktionen deutlich größer ist, während das Protein Syntaxin bevorzugt in den schwereren, den Plasmamembranen und großen Membrankompartimenten entsprechenden Fraktionen zu finden ist (Walch-Solimena et al 1995).

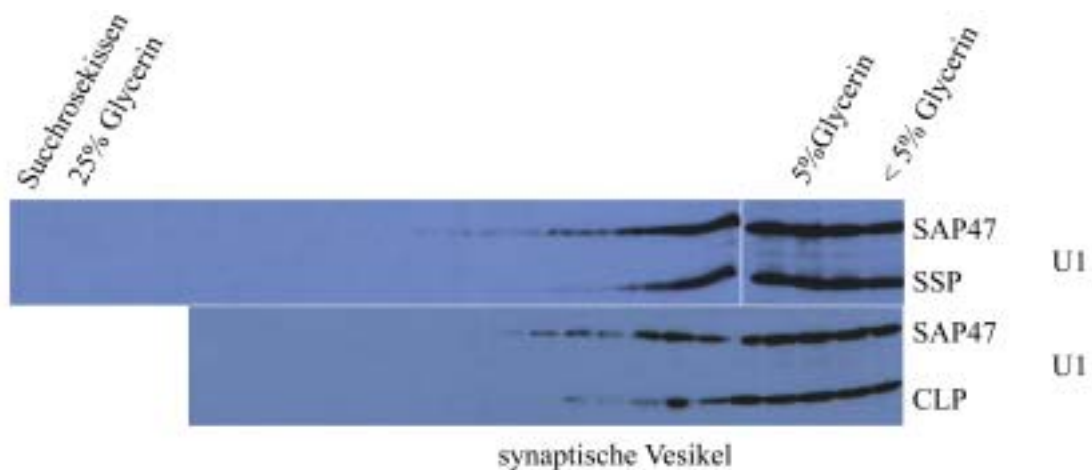


Abb 4.12 Western Blot: Glycerindichtegradient mit kleinen Volumina für SSP und CLP im Nullmutantenhintergrund. Das SAP47 Protein dient als Vergleichsprotein, welches sich wie ein zytosolisches Protein verhält. Weitere Einzelheiten im Text. Inkubation mit ab49 1:200 und nc46 1:500

Die Proteine ohne Cysteinstrang verhalten sich in diesem Experiment wie aufgrund der Membranfraktionierungsexperimente erwartet und sind wie das nicht an eine Membran gebundene Protein SAP47 verteilt (Abb 4.12).

Die Verteilung anderer an der Exozytose beteiligter Proteine wie Syntaxin, scheint nicht beeinflusst zu sein (Abb 4.13). Eine Veränderung der Expressionstärke von Syntaxin in Kopfhomogenaten der untersuchten transgenen Fliegenlinien konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

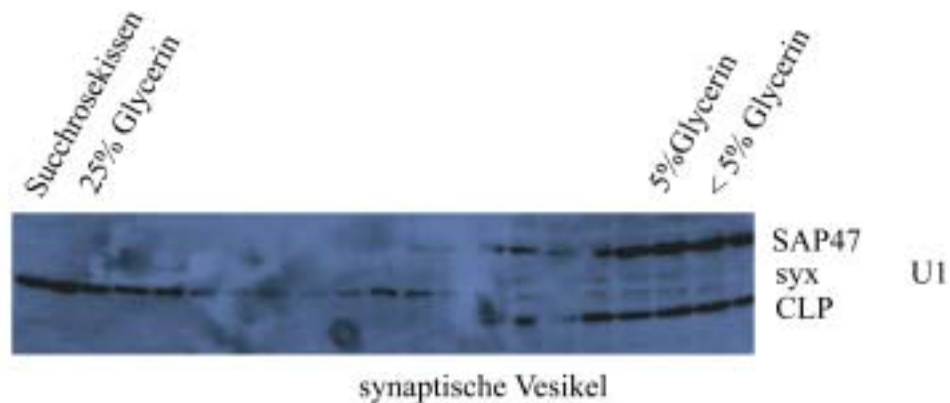


Abb 4.13 Western Blot: Glycerindichtegradient mit kleinen Volumina: obiger Westernblot (Abb 4.12) des CLP-Gradienten wurde anschließend mit einem Antikörper gegen Syntaxin inkubiert. Auch hier ist das SAP47 Protein als Vergleichsprotein, welches sich wie ein zytosolisches Protein verhält, gezeigt. Die Verteilung von Syntaxin ist durch die CSP-Mutation nicht beeinflusst. Es ist in den schwereren Glycerinfraktionen angereichert. Inkubation mit 8C3 1:75; syx= Syntaxin

Der Versuch, auch die Mutante CSLP mit diesem Experiment genauer zu charakterisieren, gelang nur mit Fliegen, welche das Konstrukt im Wildtyphintergrund trugen.

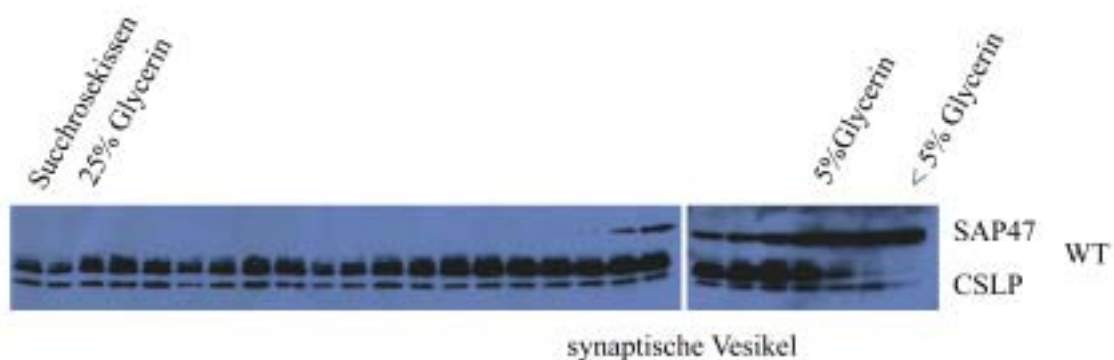


Abb 4.14 Western Blot: Glycerindichtegradient mit kleinen Volumina. Gehirnhomogenat aus CSLP;^w¹¹⁸ Fliegen wurde verwendet. Das SAP47 Protein dient als Vergleichsprotein, welches sich wie ein zytosolisches Protein verhält. Weitere Einzelheiten im Text. Inkubation mit ab49 1:200 und nc46 1:500

Dennoch lässt sich die zuvor getroffene Aussage über die Membranbindungseigenschaft von CSLP bestätigen (Abb 4.14). Es ist eine Anreicherung der wildtypischen Isoformen in der synaptischen Vesikelfraktion zu erkennen, das CSLP-Protein hingegen scheint gleichmäßiger verteilt zu sein und tritt im Gegensatz zu den wildtypischen Isoformen auch in den durch SAP47 markierten membranfreien Fraktionen auf.

Im Glycerindichtegradienten von L Δ 8;U1 ist eine Anhäufung von Protein in der synaptischen Vesikelfraktion zu beobachten (Abb 4.15).

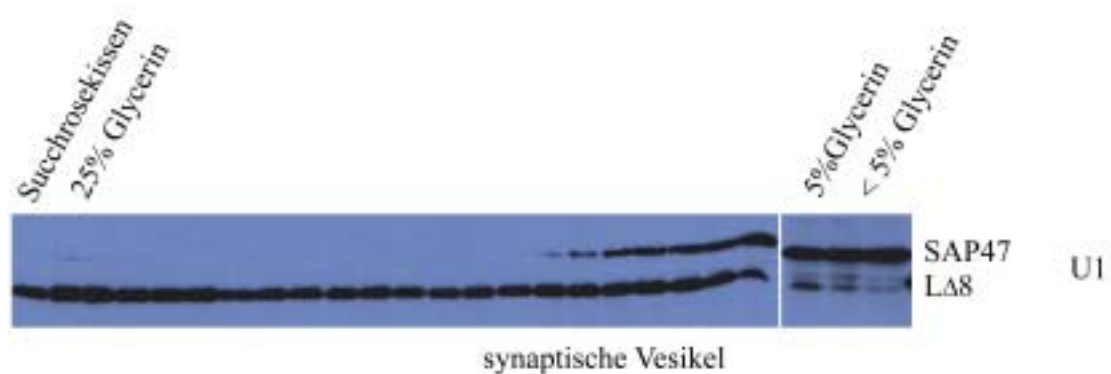


Abb 4.15 Western Blot: Glycerindichtegradient mit kleinen Volumina für die Proteinisoform L Δ 8. Abweichend vom Protokoll wurden hier nur 100 Fliegenköpfe der Linie L Δ 8;U1 homogenisiert. Das SAP47 Protein dient als Vergleichsprotein, welches sich wie ein zytosolisches Protein verhält. Weitere Einzelheiten im Text. Inkubation mit ab49 1:100 und nc46 1:500

Aufgrund der vorliegenden Daten ist keine genaue Aussage darüber möglich, ob zusätzlich in den schwereren Fraktionen eine Anreicherung des L Δ 8-Proteins zu beobachten ist. Ein ähnliches Ergebnis ist auch bei der mutierten Isoform C Δ 27 zu erkennen (Abb 4.16). Durch die geringere Menge an eingesetztem Hirnhomogenat (vgl. Abb 4.15) und des geringeren Antikörpertiters von DCSP2 (KZ6D6) sind hier die Fraktionen, welche die synaptischen Vesikel darstellen, gut zu erkennen. Eine Konzentration des Proteins lässt sich sowohl in diesen als auch in schwereren Fraktionen beobachten.

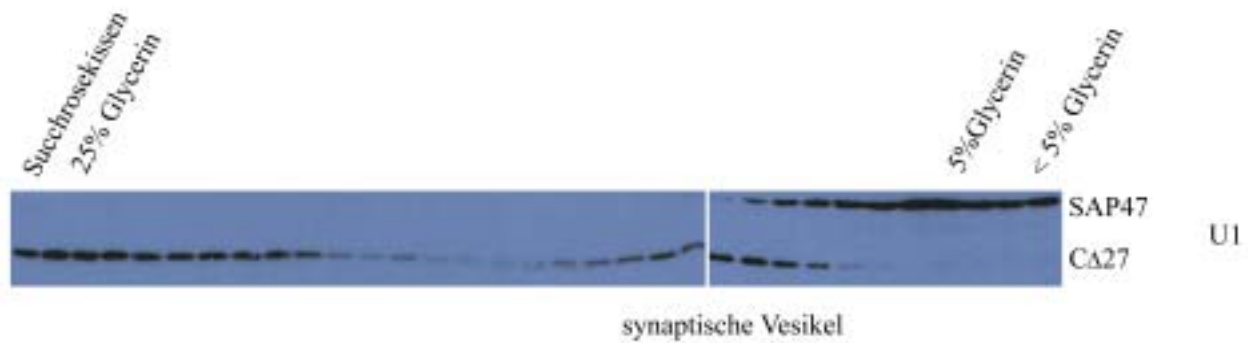


Abb 4.16 Western Blot: Glycerindichtegradient mit kleinen Volumina für die Isoform C Δ 27. Abweichend vom Protokoll wurden hier nur 100 Fliegenköpfe der Linie C Δ 27;U1 homogenisiert. Das SAP47 Protein dient als Vergleichsprotein, welches sich wie ein zytosolisches Protein verhält. Weitere Einzelheiten im Text. Inkubation mit KZ6D6 1:50 und nc46 1:500

4.1.5. Biochemische Analyse der transgenen Mutanten: Immunpräzipitation

Die verschiedenen Ansätze der Charakterisierung der Cysteine String Protein Mutanten beschränkten sich in den vorherigen Versuchen allein auf die Verteilung der betreffenden Proteine im Gehirnhomogenat. Um der potentiellen Funktion der Proteine in der Exozytose während der Transmitterfreisetzung näher zu kommen, ist vor allem auch ihre Interaktion mit anderen synaptischen Proteinen von Interesse. Die Exozytose ist ein komplizierter Prozess, in den eine Vielzahl von Proteinen involviert ist. Synaptotagmin und Syntaxin zum Beispiel sind Bestandteile des SNARE-Komplexes und wurden in *in vitro* und *in vivo* Versuchen mit CSP in Verbindung gebracht. Auch andere Interaktionspartner wie G β , Hsc70/Hsp70 (Hsc4 in *Drosophila*), SGT und PKA wurden mithilfe verschiedener Experimente, zum Beispiel Yeast-Two Hybrid Screens, Immunpräzipitationen und Phosphorylierungen nachgewiesen (siehe Einleitung 1.3.).

Um die mehrheitlich in Vertebratensystemen gefundenen Interaktionspartner auch in *Drosophila* zu überprüfen, wurden ebenfalls Immunpräzipitationen durchgeführt.

Der Antikörper ab49, dessen Epitop sich im variablen C-terminalen Bereich des Proteins befindet (siehe Abb 4.2), wurde im Folgenden in den Immunpräzipitationen eingesetzt, um die Bindungsfähigkeiten des Antikörpers an das Rescue-Protein und die mutierten Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen zu untersuchen.

Dazu wurden in den Vorversuchen Fliegenköpfe der Rescue-Transformante cDNA1 im Nullmutantenhintergrund in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben und anschließend

ca. 80µl des Pulvers mit 100µl IP-Puffer gelöst und über Nacht mit 100µl ab49 bei 4°C unter stetiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurden ca. 30µl Agarose-Beads der Firma Boehringer dazu gegeben und ebenfalls unter Bewegung für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die nichtgebundenen Proteine und überflüssiges Material wurde in 4 Waschschrritten mit jeweils 500µl Volumen an IP-Waschpuffer gereinigt. Das Beadpellet wurde in 25 µl 2xLaemmli gelöst und für 5 min bei 95°C erhitzt. Je 10µl jedes Schritts wurden auf das Gel aufgetragen (Abb 4.17).

Die folgenden Versuche wurden nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt.

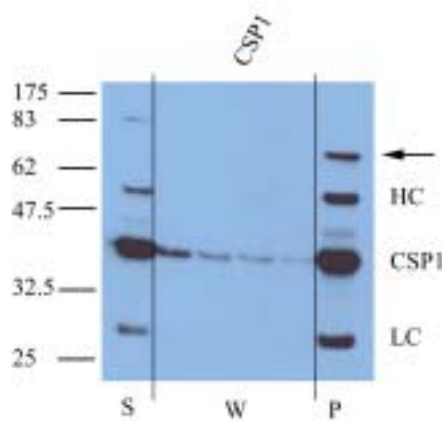


Abb 4.17 Western Blot: ab49-Immunpräzipitation für CSP1 aus cDNA1;U1. Es ist eine deutliche Anreicherung des CSP1-Proteins im Präzipitat zu erkennen. Der Pfeil markiert Dimere von CSP1. S= Überstand aus Homogenat, Antikörper und Beads; W= Waschschrritte; P= Pellet der Beads in 2xLaemmli gelöst; HC= Schwere Kette des Antikörpers; LC= Leichte Kette des Antikörpers. Inkubation mit ab49 1:100

Der Antikörper ab49 bindet auch unter diesen Bedingungen spezifisch an die größte CSP-Isoform CSP1, die auf diese Weise im Pellet angereichert wird. Zudem werden im Präzipitat auch die beiden Antikörperketten nachgewiesen. Die schwache Bande über der CSP1-Bande scheint spezifisch zu sein, da sie im Präzipitat auftritt und sogar geringfügig angereichert wurde. Über ihre Identität ist nichts bekannt.

Die durch den Pfeil gekennzeichnete Bande kann zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht eindeutig zugewiesen werden. Es handelt sich um ein Protein mit der Masse ca. 70-75 kDa, das aber vermutlich ein CSP-Dimer darstellt.

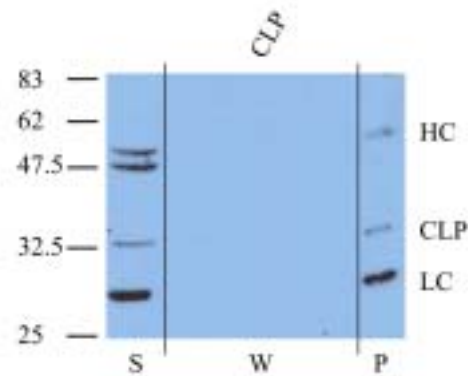


Abb. 4.18 Western Blot: ab49-Immunpräzipitation für CLP aus CLP;U1. Das CLP-Protein wird mithilfe des Antikörpers ab49 präzipitiert. S= Überstand aus Homogenat, Antikörper und Beads; W= Waschschrirte; P= Pellet der Beads in 2xLaemmli gelöst; HC= Schwere Kette des Antikörpers; LC= Leichte Kette des Antikörpers; weitere Details im Text. Inkubation mit ab49 1:100

Auch das CLP-Protein wird mithilfe des Antikörpers ab49 präzipitiert (Abb 4.18). Mit den Mutanten SSP und LΔ8 wurde ebenso verfahren, der Western Blot wurde jedoch zuerst mit dem Antikörper 8C3 gegen Syntaxin inkubiert und anschließend mit ab49, um das präzipitierte mutierte CSP nachzuweisen (Abb 4.19).

In beiden Fällen ist im Präzipitat kein Syntaxin nachweisbar, obwohl im Überstand große Mengen Syntaxin vorhanden sind. Die Immunpräzipitation des LΔ8-Proteins weist nur eine geringe Menge an gebundenem Protein auf (Pfeil, Abb 4.19).

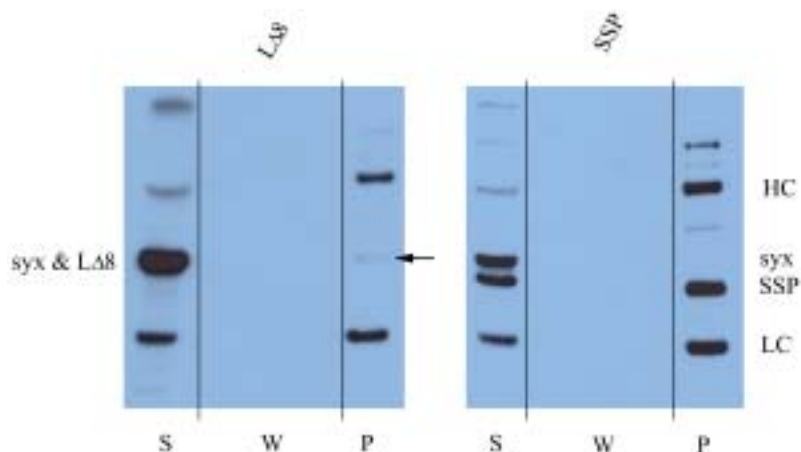


Abb 4.19 Western Blot: ab49-Immunpräzipitation für SSP aus SSP;U1 und LΔ8 aus LΔ8;U1, S= Überstand aus Homogenat, Antikörper und Beads; W= Waschschrirte; P= Pellet der Beads in 2xLaemmli gelöst; HC= Schwere Kette des Antikörpers; LC= Leichte Kette des Antikörpers; der Pfeil markiert die schwache LΔ8-Bande. Weitere Einzelheiten im Text. Inkubation mit 8C3 1:50 und ab49 1:250

Wie bereits bei den Fraktionierungsexperimenten beobachtet, scheint das LΔ8-Protein vergleichsweise instabil zu sein. Im Überstand (S) überlagern sich die Syntaxin- und die LΔ8-Banden. Im Western Blot der SSP-Immunpräzipitation sind im Überstand deutlich die Banden von Syntaxin und SSP zu erkennen, im Präzipitat fehlt die Syntaxin-Bande. In beiden Fällen ist kein überschüssiges, nicht an die Beads gebundenes Protein in den Waschschrritten zu erkennen. Daher scheint die gesamte eingesetzte Menge an Protein an die Beads gebunden zu sein. Die neben leichter und schwerer Antikörperkette zusätzlich nachgewiesenen Banden im Präzipitat des SSP-Proteins lassen sich keinen bestimmten bekannten Proteinen zuweisen. Die Frage, ob Syntaxin direkt oder indirekt mit den mutierten CSP-Isoformen interagiert, kann nicht eindeutig beantwortet werden, da in mehreren Experimenten (siehe 3.1.4) Syntaxin auch in ab49-Präzipitaten von homogenisierten wildtypischen oder Rescue-Konstrukt tragenden Fliegen nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl große Mengen an CSP präzipitiert wurden (Abb 4.20). Syntaxin wird offenbar in sehr geringen Mengen an das CSP gebunden. Auf die zum Teil widersprüchlichen Befunde zur Interaktion von Syntaxin und CSP in der Literatur wurde in der Einleitung (1.4.2.) bereits hingewiesen.

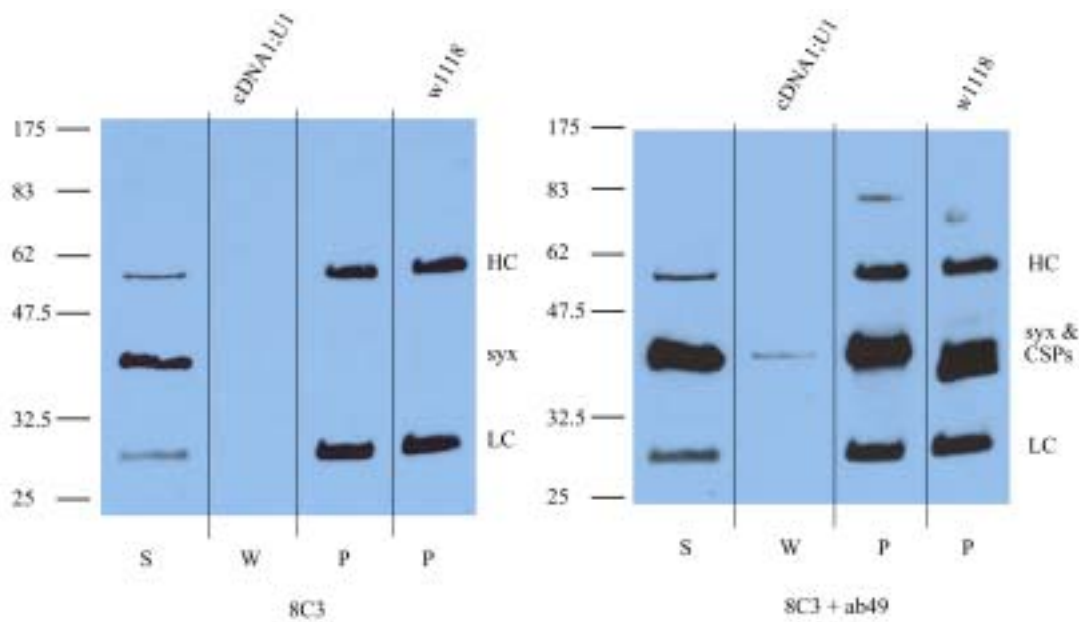


Abb 4.20 Western Blot: ab49-Immunpräzipitation für CSP-Isoformen aus w^{1118} und $lcDNA1;U1$; großes Biometra-Gel; S= Überstand aus Homogenat, Antikörper und Beads; W= letzter Waschschriff; P= Pellet der Beads in 2xLaemmli gelöst; HC= Schwere Kette des Antikörpers; LC= Leichte Kette des Antikörpers; weitere Informationen im Text; Inkubation mit 8C3 1:75 und anschließend ab49 1:250

Nach zahlreichen Wiederholungen und optimierten Arbeitsabläufen konnte eindeutig gezeigt werden, dass CSP Syntaxin co-präzipitieren kann. In diesem Versuch wurden abweichend

vom Protokoll (3.4.1) über einige Tage tiefgefrorene Fliegen benutzt (Abb 4.21).

Die Inkubation des Blots mit dem Antikörper 8C3 gegen Syntaxin zeigt im Überstand eine große Menge an Protein. Sowohl im Überstand als auch im Präzipitat kann man erkennen, dass es sich hierbei tatsächlich um die Syntaxin-Doppelbande handelt. Eine anschließende Inkubation mit ab49 weist zudem noch größere Mengen der größten Isoform von CSP nach. Deutlich sind auch hier wie in den vorigen Versuchen die schwere und leichte Kette des Antikörpers zu erkennen. Die schwache Bande bei ca. 80 kDa entspricht möglicherweise der bereits in Abb. 4.17 nachgewiesenen, welche auch bei den Präzipitationen von LD8 und SSP zu erkennen ist. Magga et al (2000) beschreiben bei Co-Immunpräzipitationen von G-Proteinen eine Bande der Größe 75 kDa und vermuten, dass es sich hierbei um ein Dimer aus CSP und G β handelt. Daher wurde versucht, in der erfolgreichen Präzipitation von Syntaxin ebenfalls G β nachzuweisen. In weiteren Präzipitationen konnte weder das Co-Präzipitat von Syntaxin reproduziert werden, noch eine G-Protein Untereinheit nachgewiesen werden (siehe jedoch Schwenkert 2002).

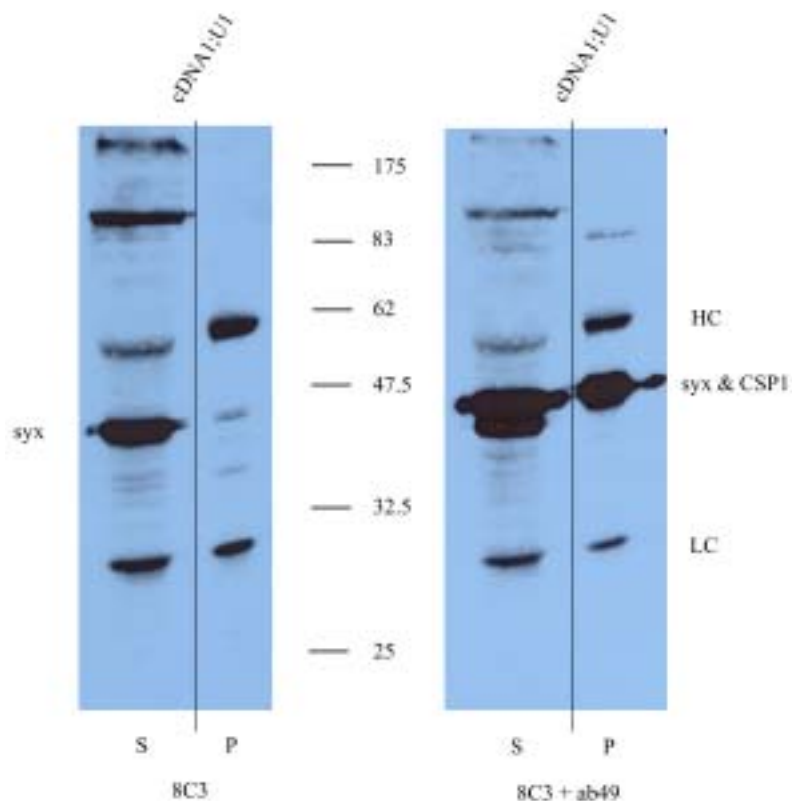


Abb 4.21 Western Blot: ab49-Immunpräzipitation für CSP1 aus lcDNA1;U1 großes Biometra-Gel; S= Überstand aus Homogenat, Antikörper und Beads; P= Pellet der Beads in 2xLaemmli gelöst; HC= Schwere Kette des Antikörpers; LC= Leichte Kette des Antikörpers; weitere Informationen im Text; Inkubation mit 8C3 1:50 und anschließend mit ab49 1:250

4.1.6. Immunhistochemische Analyse der transgenen Mutanten

In DAB-Färbungen von Kryostat-Gehirnschnitten der untersuchten Mutanten ist die Verteilung der Proteine gut zu beobachten (Abb 4.22). Cysteine String Mutanten zeigen dabei eine besonders auffällige Färbung. Die Rescue-Transformante *cDNA1;U1* lässt eine mit dem Wildtyp identische Färbung des gesamten Neuropils erkennen. Die Färbung der Mutanten *SSP;U1* und *CLP;U1* offenbart dagegen eine nahezu gleichmäßige Verteilung der nachgewiesenen Proteine. Das *CSLP*-Protein scheint im Vergleich zu *SSP* und *CLP* weniger homogen verteilt zu sein und sich in den synapsenreichen Regionen in gewissem Umfang anzureichern.

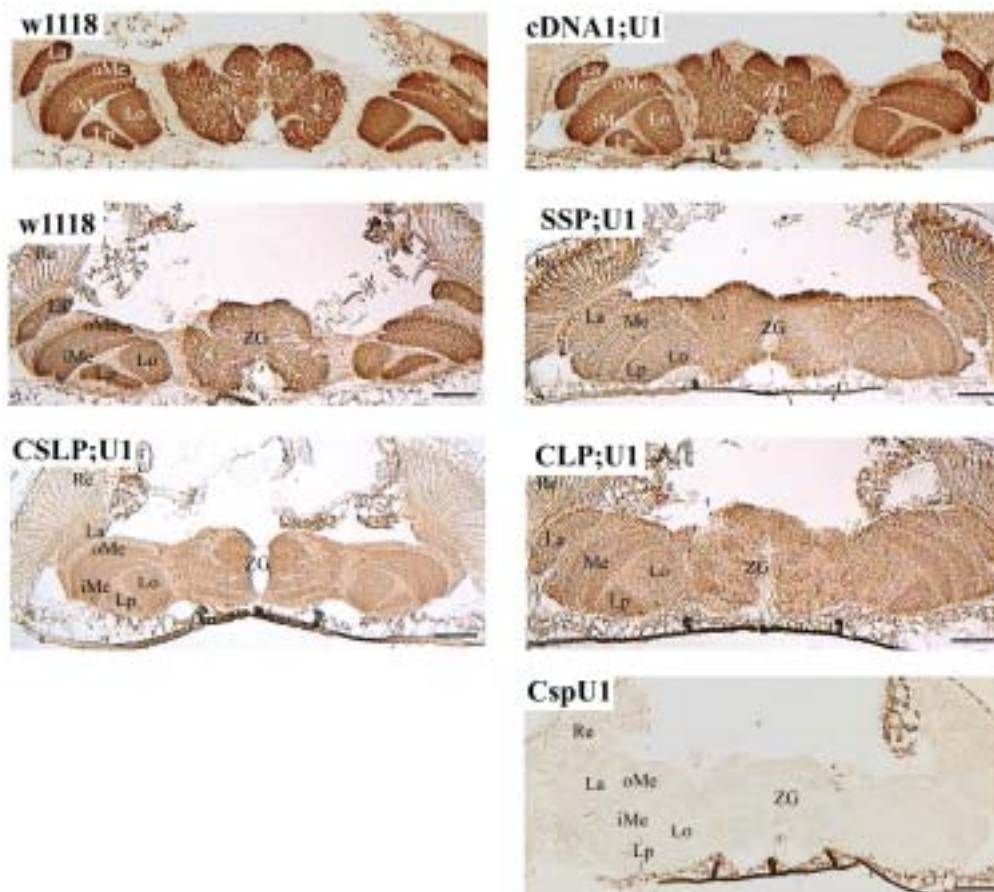


Abb 4.22 Kryostat-Gehirnschnitte: von Christine Arnold generierte Mutanten im Überblick, *w¹¹¹⁸* Fliegen und *cDna1*-Rescue-Fliegen dienen als Vergleich. Die Färbung des Rescues ist mit dem Wildtyp identisch. Diffuse Färbungen der Mutanten *SSP*, *CLP* und *CSLP* im Nullmutantenhintergrund. *CspU1*, die *CSP*-Nullmutante zeigt keine Färbung; Re = Retina; La = Lamina; oMe = äußere Medulla; iMe = innere Medulla; Lp = Lobulaplatte; Lo = Lobula; ZG = Zentralgehirn; Antikörper ab49 1:10 (mod nach Arnold et al). Skalierung: 50µm

Die Färbung der Mutanten LΔ8;U1 und CΔ27;U1 weisen keinerlei Besonderheiten auf (Daten nicht gezeigt). Auch hier sind die Neuropilregionen des Gehirns und das Thorakalganglion wildtypisch gefärbt. Die Mutante LΔ8;U1 zeigt eine geringfügig schwächere Färbung als der Wildtyp. Gehirnhomogenate dieser Linie zeigen im Western Blot eine stark verringerte Menge des Proteins (Abb 4.4 A und B), was in einer geringeren Stabilität des mutierten Proteins begründet sein könnte.

Die Mutante CΔ27, welche keine phänotypischen Auffälligkeiten, wie temperatursensitive Paralyse oder drastisch verkürzte Lebensdauer, zeigt, erweist sich auch in der Immunhistochemie als wildtypisch. Der Antikörper DCSP1 ab49 erkennt das Protein auch unter diesen Bedingungen nicht (Abb 4.23). Die Vergleichsfärbungen der Rescue-Transformante lcDNA1;U1 und der Mutante CΔ27;U1 mit dem Antikörper DCSP2 (KZ6D6) zeigen insgesamt eine schwächere aber untereinander nahezu identische Färbung. Die in diesem Beispiel schwächer gefärbte Lamina konnte in weiteren Kontrollfärbungen nicht bestätigt werden.

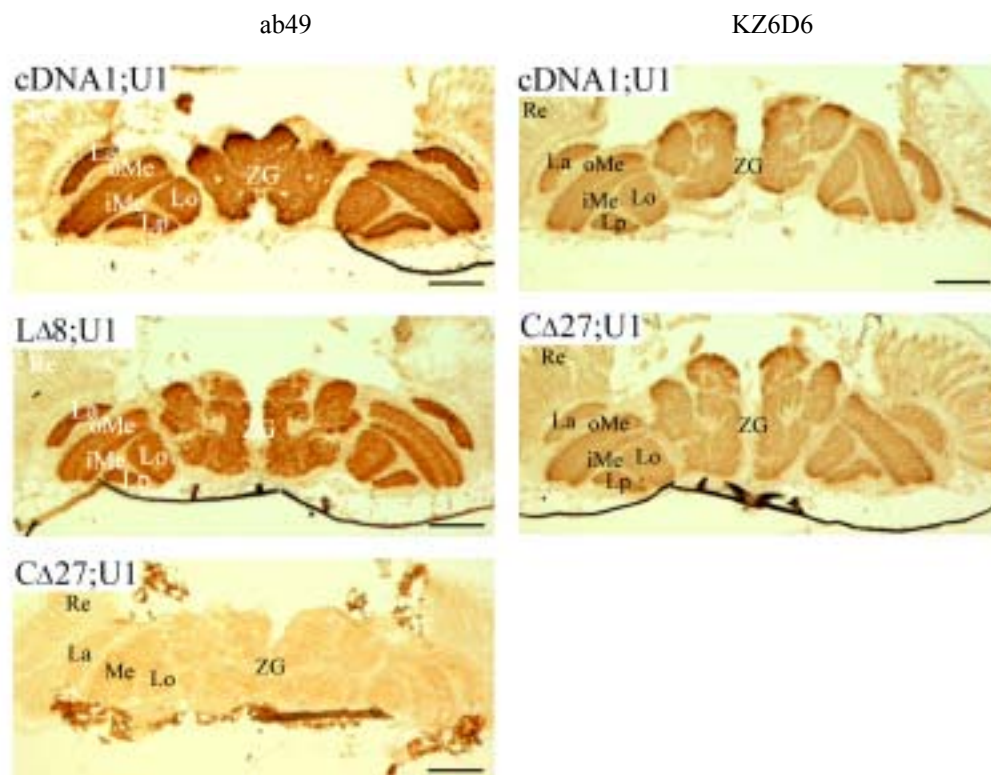


Abb 4.23 Kryostat-Gehirnschnitte, Mutanten im Überblick lcDNA1;U1, LΔ8;U1, CΔ27;U1 inkubiert mit ab49 1:100 und lcDNA;U1, CΔ27;U1 inkubiert mit KZ6D6 1:50. Die Positivkontrolle und die Mutante wurden auf einem Objektträger gefärbt, Re = Retina; La = Lamina; oMe = äußere Medulla; iMe = innere Medulla; Lp = Lobulaplatte; Lo = Lobula; ZG = Zentralgehirn; weitere Erläuterungen im Text. Skalierung: 50µm

4.1.7. Phänotypische Charakterisierung der transgenen Mutanten

Da adulte CSP-Nullmutanten temperatursensitive Paralyse zeigen, wurde die Temperaturresistenz der transgenen Tiere quantitativ ausgewertet.

Dazu wurden die transgenen Fliegen neu in die Nullmutante eingekreuzt, um den genetischen Hintergrund möglichst weitgehend auszugleichen. Anschließend wurden Geschwister aus diesen Kreuzungen analysiert. Die analysierten Insertionen („P“) befanden sich alle auf dem X-Chromosom (Abb 4.24).

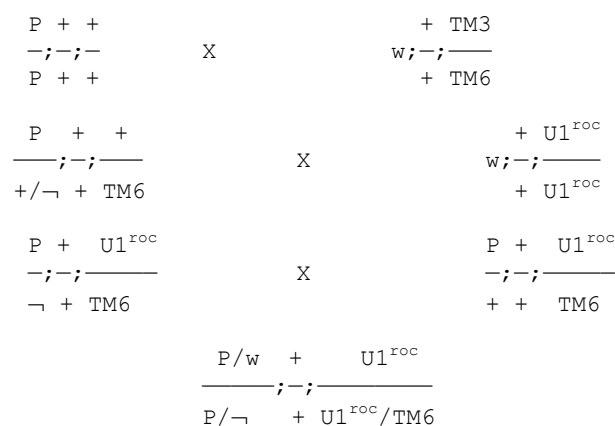


Abb 4.24 Kreuzungsschema für TS-Paralyse Test, 18°C. Alle Insertionen des P-Elements befinden sich auf dem X-Chromosom, es wurden reziproke Kreuzungen angesetzt. Es wurden sowohl Fliegen die nur eine Kopie des P-Elements und beide Allele der Nullmutation tragen, als auch heterozygote Geschwister für die Mutationen getestet.

Für das Einkreuzen wurde eine mehrfach gegen den weißäugigen Wildtyp ($w^{1118}; ; csp^+$) rückgekreuzte CSP-Nullmutante $CspU1^{roc}$ (red eyed, ot-uncrossed) verwendet. Die phänotypischen Ausprägungen des CSP-Verlusts waren im ursprünglichen $CspU1^f$ -Stamm durch lange Haltung aufgrund der Anreicherung von Modifikatoren durch die natürliche Selektion erheblich abgeschwächt.

Für den im Folgenden beschriebenen Temperatursensitivitäts-Test wurden die Fliegen bei 18°C gekreuzt und nach dem Schlüpfen 1-3 Tage gesammelt, auf Eis betäubt und nach den TM6-Markern Tubby und Humeral sortiert. Die balancierten Fliegen dienten als Wildtypkontrolle, da eine Kopie des endogenen Csp^+ -Gens für eine vollständige Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps ausreichend ist. Zur Regeneration wurden die Fliegen ca. 1 h bei 18°C belassen, bevor ca. 20 Fliegen mithilfe eines Aspirators in große auf 18°C temperierte

Fliegengläser überführt wurden. Diese Gläser wurden für 5 min bei unterschiedlichen Temperaturen im Wasserbad inkubiert und anschließend die Zahl der nicht paralytierten Fliegen ermittelt, sowie anhand der Augenfarbe ihre Genotypen bestimmt ($U1^{roc}/+$ gelb; $U1^{roc}/U1^{roc}$ orange; P/+ und P/P rot). Für jede Temperaturmessreihe wurden naive Fliegen verwendet.

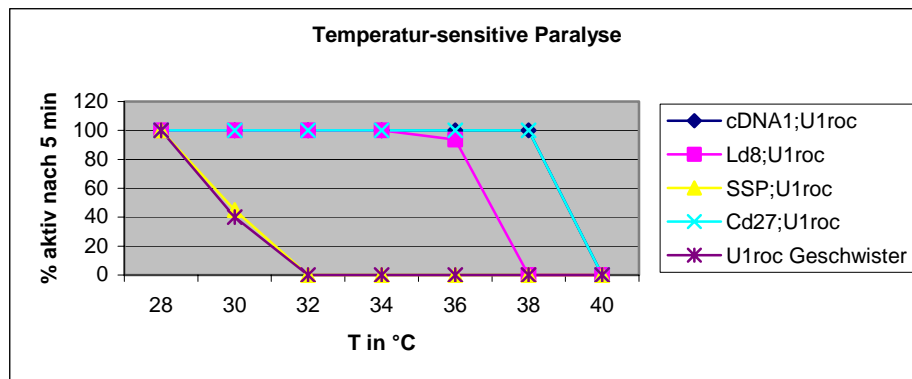


Abb 4.25 Graf der Temperatur-sensitiven Paralyse, alle Transformanten befinden sich im Nullmutantenhintergrund $U1^{roc}$ und tragen eine oder zwei Kopien des Transgens. Für jede Temperatur wurden ca. 100 naive Fliegen getestet. Weiterer Erläuterungen im Text.

Es wird deutlich, dass sich die transgene C-terminale Deletionsmutante $C\Delta 27;U1^{roc}$ wie die Wildtyp-Transformante $cDNA1;U1^{roc}$ und der Wildtyp verhält und eine Paralyse bei $40^{\circ}C$ eintritt (Abb 4.25). Die transgene Mutante $L\Delta 8;U1^{roc}$ hingegen paralyisiert bei $38^{\circ}C$ vollständig. Die Nullmutante $U1^{roc}$ und die transgene Cysteine String-Mutante $SSP;U1^{roc}$ paralisieren in einem Temperaturbereich zwischen 30 und $32^{\circ}C$. Der Temperatur-sensitive paralytische Phänotyp wird also sowohl durch die Expression einer wildtypischen Isoform (CSP1), als auch durch die mutierte Isoform $C\Delta 27$ „gerettet“.

Wildtypische Fliegen und Tiere der beiden rettenden Linien $cDNA1;U1^{roc}$ und $C\Delta 27;U1^{roc}$, erwachen innerhalb kürzester Zeit (<1 min) aus dieser Lähmung nach einer Paralyse bei $40^{\circ}C$. Im Vergleich dazu brauchen die $SSP;U1^{roc}$ - und $L\Delta 8;U1^{roc}$ -Mutanten ca. 2 bis 6 min, um sich wieder zu regenerieren. Die analysierten Nullmutanten $U1^{roc}$ entstammen ebenfalls den Kreuzungen nach dem in Abb. 4.24 gezeigten Schema.

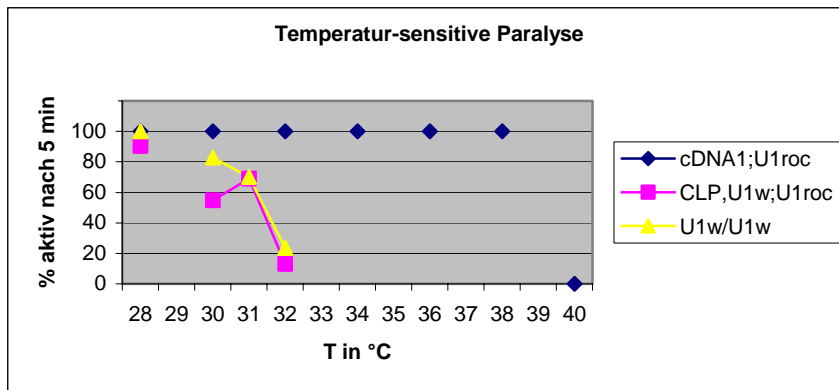


Abb 4.26 Graf der Temperatur-sensitiven Paralyse. Für jede Temperatur wurden ca. 40 naive Fliegen getestet. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Insertion des CLP-Konstruktes befindet sich auf dem dritten Chromosom. Es wurden die homozygoten CLP-Mutanten im nicht rückgekreuzten CspU1^w-Hintergrund mit der rückgekreuzten Nullmutante verpaart und die heterozygoten Nachkommen (CLP,U1^w/U1^{roc}) analysiert. Die getesteten Nullmutanten CspU1^w/CspU1^w entstammen der Stammsammlung und sind nicht mehrfach in den Wildtyp rückgekreuzt. Auch hier zeigt sich deutlich, dass die Mehrzahl der Fliegen zwischen 30 und 32°C vollständig paralyisiert (Abb 4.26). Der nicht monotone Kurvenverlauf bei den Temperaturen 30 und 31°C dürfte auf zufällige Schwankungen aufgrund der geringen Anzahl der analysierten Tiere und ihrem uneinheitlichen Alter beruhen.

Bereits Mitte der 80er Jahre stellte sich bei *in vitro* Studien heraus, welche der Nukleotide ausreichend für effiziente Rekombinationsereignisse waren. (Senecoff et al, 1985). Zur Bestimmung der minimalen FRT-site wurde ein 166 bp Fragment benutzt, welches die für die Rekombination notwendigen 65 bp und die jeweils flankierende 40 bp enthielt. Durch Ligationen und anschließende Verdauung, Deletionen und Ligationen mit synthetisierten Sequenzen, wurde die Sequenz auf ein Minimum verkürzt. Mit den so generierten Plasmiden wurden Rekombinationsversuche durchgeführt. Die FRT-site konnte auf 28 bp eingegrenzt werden (Senecoff et al 1985).

Es wurde gezeigt, dass die Flippase an alle drei Repeats bindet und am Rand des asymmetrischen Spacers, der für die Orientierung der FRT-site verantwortlich ist, schneidet (Abb 4.27). Eines der Repeats erwies sich als überflüssig.

4.2.2. Klonierung der FRT-Vektoren pS49-9 2xFRT und pCaCSP2xFRT

Die in dieser Arbeit benutzte Minimal FRT-site Sequenz entstammt der Flybase (ID FBms0003483; 17.05.99; neue FBms0003539):

GTTCTATTCTCTAGAAA GTATAGGAAC

Für die Klonierung des 2xFRT gCSP-Vektors wurden zwei synthetisierte FRT-Kassetten, die mit Linkern ausgestattet sind (Abb 4.28), in den Transformationsvektor pW8 inkloniert (Klemenz et al 1987).

```

5'-gAATTGgttcctattctctagaaa gtataggaacGaattc-3'
3'-cttaaCcaaggataagagatctttca.tatccttgCTTAAg-5'
      EcoRI mod           XbaI           EcoRI

5'-gGATCCgttcctattctctagaaa gtataggaacCTGCAg-3'
3'-cctagGcaaggataagagatctttcatatccttgGacgtc-5'
      BamHI           XbaI           PstI

```

Abb 4.28 Sequenzen der Oligonukleotide einschließlich der Linker sind dargestellt. Eingefügte Schnittstellen und die FRT-sites sind markiert.

Die Kassetten wurden durch langsame Hybridisierung von Oligonukleotiden hergestellt. Dazu wurden je 1pmol (pmol x 0,325ng/pmol x bp=ng) an Oligonukleotiden für 10 min bei 94°C

erhitzt. Die Temperatur wurde alle 10 min schrittweise um 10°C verringert. Bei 37°C wurde das Hybridgemisch für 30 min inkubiert und anschließend beide Kassetten nacheinander in die multiple Klonierungsstelle des Transformationsvektors pW8 eingesetzt.

Zwischen diesen FRT-sites bleibt ein Teil der Multiple Cloning Site des Vektors erhalten (siehe Anhang A1). Der gesamte *Csp*-Lokus mit kurzem Promotorfragment aus dem pCaCsp-Vektor von K. Zinsmaier wurde über KpnI einkloniert (siehe auch 4.3). Die cDNA1 und das kurze genomische Fragment (*scDna1*) wurden über NotI/Asp718I ebenfalls einkloniert, wobei die ersten 2 1/2 Exons im genomischen Teil enthalten sind und über die Bsp 1407/I-Schnittstelle mit der restlichen cDNA fusioniert sind (Abb 4.29).

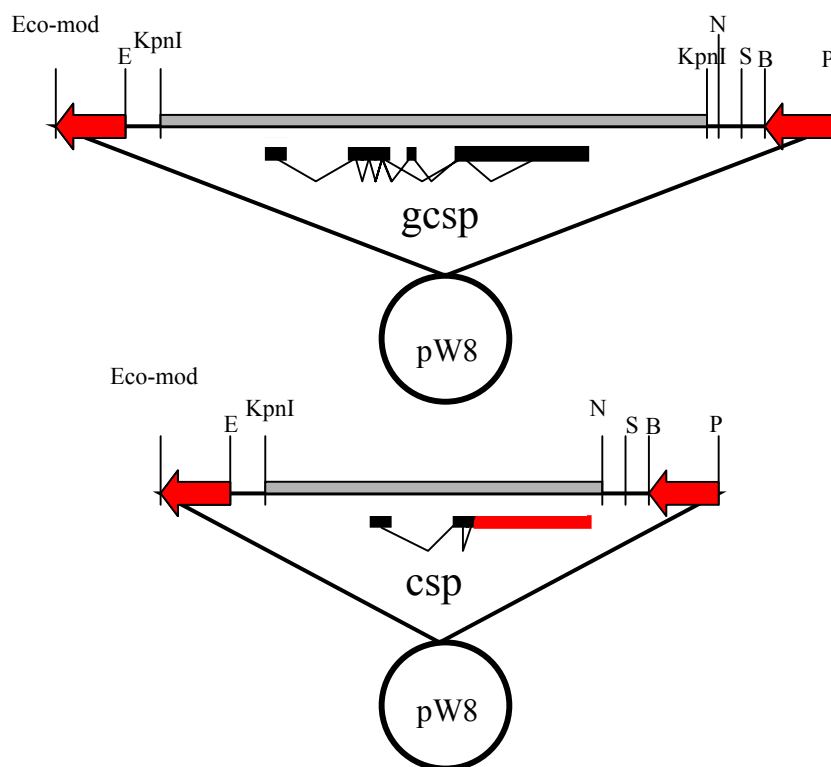
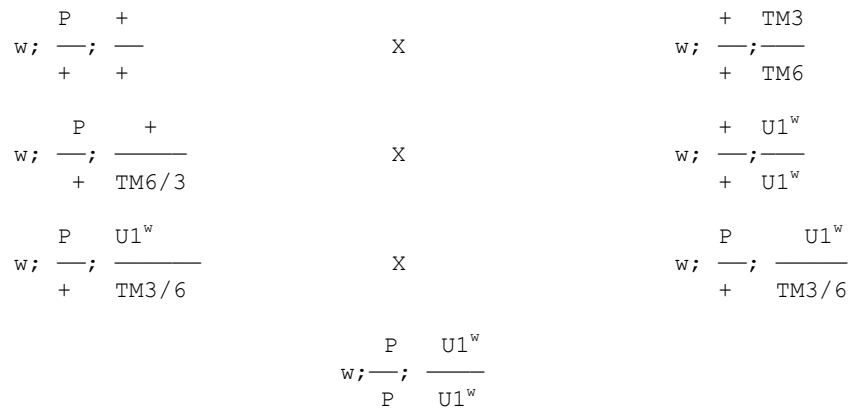


Abb 4.29 Schematische Darstellung der FRT Konstrukte im P-Elementvektor pW8; *Csp*-Lokus (gcsp) mit kurzem genomischen Fragment und das Rescue-Konstrukt *scDna1* in pW8; B: BamHI; E: EcoRI; K: KpnI; N: NotI; P: PstI; S: Sall

Durch Keimbahntransformation wurden mehrere transformante Linien generiert und in die Nullmutante eingekreuzt (Abb 4.30; Anhang A2).

II. Chromosom



X-Chromosom

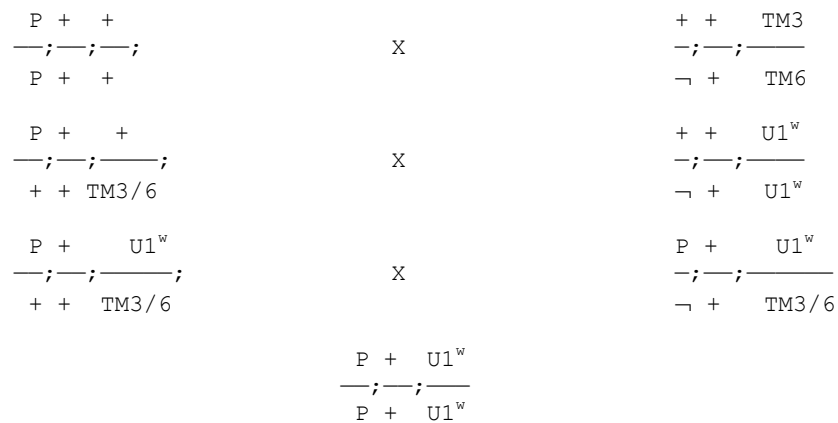


Abb 4.30 Kreuzungsschemata zur Einkreuzung des P-Elementes in die Nullmutante, gezeigt für das II.-Chromosom und das X-Chromosom.

Für das III. Chromosom wäre eine Rekombination des P-Elementes auf das Nullchromosom nötig gewesen. Da nach den entsprechenden Kreuzungen mit einem schwierigen PCR-Nachweis keine Rekombinanten erzeugt werden konnten, wurde nur mit den Insertionen des X und des II. Chromosoms gearbeitet (siehe Anhang A3).

Das Ziel der folgenden Kreuzungen ist die selektive Deletion des *Csp*-Gens in definierten Zellen des gesamten Organismus. Durch die Verwendung von sogenannten „Gal₄“-Linien, die den Transkriptionsfaktor Gal₄ aus der Hefe in definierten Zellen exprimieren, kann in diesen Zellen selektiv Flippaseaktivität induziert werden, wenn das Flippase-Gen unter die Kontrolle der transkriptionsaktivierenden Sequenz (UAS, upstream activating sequence) gebracht wird (Brand und Perrimon 1993; Phelbs und Brand 1998). Dafür müssen insgesamt drei P-Element-Konstrukte und die CSP-Nullmutation in einer Fliege vereint werden (Gal₄, UASflp,

pCaCsp, CspUI).

Als Gal₄ Konstrukt wurde eine Linie verwendet, in der das Gal₄-Gen unter der Kontrolle des „glass multiple response element“ (GMR) Enhancers nahezu ausschließlich in Photorezeptoren exprimiert wird. Das Konstrukt für die UAS-getriebene Flippase liegt auf dem III. Chromosom (J. Duffy, persönliche Mitteilung) und wurde mit der cspU1^w Nullmutation nach folgendem Kreuzungsschema rekombiniert (Abb 4.31).

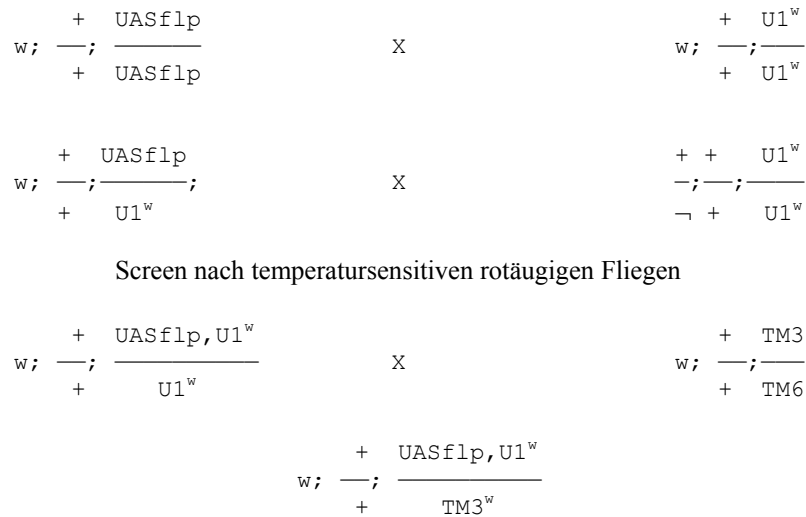
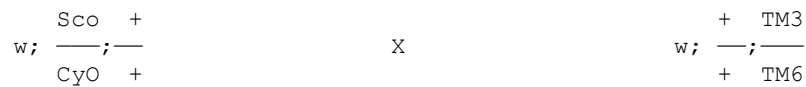
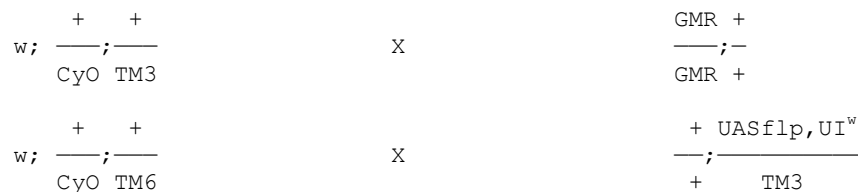


Abb 4.31 Kreuzungsschema zur Rekombination des III. Chromosoms

Für die weiteren Kreuzungen sind Marker für das zweite und dritte Chromosom notwendig, da die Anzahl der P(w⁺)-Elemente in einer Fliege an der Augenfarbe nicht zuverlässig festgestellt werden kann.



Die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen „Doppelbalancer“ wurden zum einen mit der GMR-Gal₄-Linie (II.) und zum anderen mit der UAS-Flippase (III. csp-Nullchromosom) gekreuzt.



Die Ausbeute an doppelt-markierten Fliegen war sehr gering. Diese wurden untereinander gekreuzt.

$$\frac{\text{GMR} \quad +}{\text{CyO} \quad \text{TM3}} \quad \times \quad \frac{+ \quad \text{UASflp, UI}^{\text{w}}}{\text{CyO} \quad \text{TM6}}$$

Die Nachkommen dieser Kreuzung wurden als nachzuselektionierender Stamm gehalten. Sie konnten für alle folgenden Einkreuzungen verwendet werden. Die Anwesenheit des GMR-Gal₄-Konstrukts ist auch an der dunkleren Augenfarbe erkennbar

$$\frac{+ \quad \text{GMR} \quad \text{UASflp, UI}^{\text{w}}}{+/\neg \quad \text{CyO} \quad \text{TM3}}$$

4.2.3. Funktionalität der Konstrukte

Es wurden 3 GUF-Stämme (GMR-UAS-Flippase;UI) etabliert (GUF/STM) und deren Funktionalität durch Kreuzungen mit einer Reporterlinie (UAS-tnt⁺) und einer anderen FRT-Kassette (>STOP>tnt⁻) untersucht. Beide Ergebnisse waren in der Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen Tetanustoxin nachvollziehbar und beweisen die Funktionalität der einzelnen eingesetzten P-Elemente.

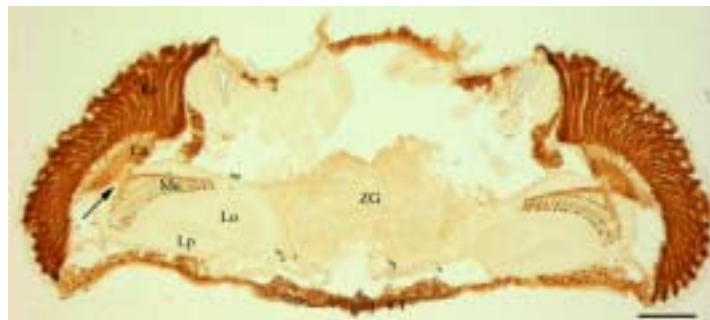


Abb 4.32 Kryostat-Gehirnschnitt: Funktionalität des GMR-Gal₄-Treibers, Nachkommen aus der Kreuzung von GUF und der UAS-tnt⁺-Reporterlinie, Re = Retina; La = Lamina; Me = Medulla; Lp = Lobulaplatte; Lo = Lobula; ZG = Zentralgehirn. Der Pfeil markiert das erste optische Chiasma. Antikörper gegen Tetanustoxin 1:100; Skalierung: 50µm

Die in diesem Experiment eingesetzte Gal₄-Linie GMR wird in den Photorezeptoren mit ihren Projektoren in der Lamina und Medulla zellspezifisch exprimiert. Kreuzt man diese Linie mit einer Reporterlinie, welche in diesem Fall ein inaktives Tetanustoxin exprimiert (UAS-tnt⁻), so ist in diesen Bereichen ein Nachweis des Tetanustoxins mithilfe eines Antikörpers möglich (Abb 4.32). In dieser Konstellation ist die GMR-Gal₄-Linie aktiv und sollte in ähnlicher Stärke auch die Expression der UAS-Flippase antreiben.

Um die Funktionalität der UAS getriebenen Flippase zu untersuchen, wurden die GUF-Fliegen mit einer Stopp-Tetanustoxin-Linie (UAS-flp-tnt⁻¹⁰/Cyo) gekreuzt. Die Expression des Tetanustoxin ist abhängig vom Verlust einer upstream gelegenen Stoppkassette, welche von zwei gleichgerichteten FRT-sites umgeben ist. Ist die Rekombination erfolgreich, zeigt sich in der Färbung ein DAB-Niederschlag im betroffenen Gewebe, wie in Abb 4.33 gezeigt.

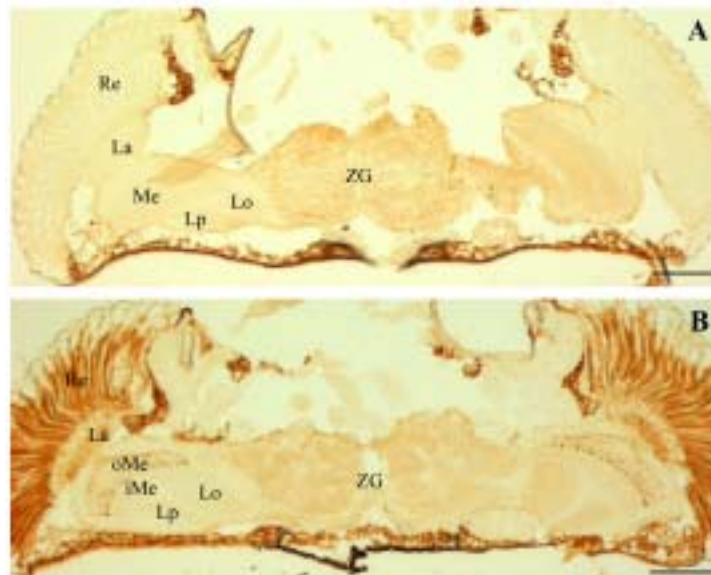


Abb 4.33 Kryostat-Gehirnschnitte: Funktionalität der UAS-Flippase **A:** >STOP>TNT -Linie; **B:** Nachkommen aus der Kreuzung von GUF und der >STOP>TNT -Linie, Re = Retina; La = Lamina; oMe = äußere Medulla; iMe = innere Medulla; Lp = Lobulaplatte; Lo = Lobula; ZG = Zentralgehirn. Antikörper gegen Tetanustoxin 1:100; Skalierung: 50µm

4.2.4. Spezifische Deletion des *Csp*-Gens

Die Insertionen des P-Elements pCaCsp auf dem X- und auf dem II.-Chromosom im Nullmutantenhintergrund wurden im Folgenden verwendet, um die CSP-Expression im Bereich der GMR-getriebenen Flippasetranskription zu unterbinden. Die Expression des Transkriptionsfaktors Gal₄ in den Photorezeptorzellen, wie oben beschrieben, führt in diesen Zellen zum Zeitpunkt der GMR-getriebenen Expression zu einer Transkription der UAS-Flippase. Folgendes Resultat wurde erwartet: Die Flippase erkennt die zwei gleichgerichteten FRT-sites, die den transgenen *Csp*-Lokus umgeben und es kommt zu einer Rekombination zwischen diesen beiden Erkennungssequenzen. Dieses Rekombinationsereignis führt zu dem Verlust der CSP-Expression und lähmt die Funktion der betroffenen Synapsen bei erhöhter Temperatur. Die Synapsenfunktion ist bei permissiver Temperatur von 18°C mit dem Wildtyp vergleichbar.

Das Einkreuzen der P-Elemente erfolgte nach folgendem Schema:

$$\begin{array}{c}
 \frac{\text{pCaCsp3x2}}{\text{pCaCsp3x2}}; \frac{+}{-}; \frac{\text{UI}^{\text{w}}}{\text{UI}^{\text{w}}} \\
 \times \\
 \frac{+}{-}; \frac{\text{GMR}}{\text{CyO}}; \frac{\text{UASflp, UI}^{\text{w}}}{\text{TM3}} \\
 \\
 \frac{\text{pCaCsp3x2}}{+}; \frac{\text{GMR}}{+}; \frac{\text{UASflp, UI}^{\text{w}}}{\text{UI}^{\text{w}}} \\
 \\
 \frac{+}{-}; \frac{\text{pCaCspC}}{\text{pCaCspC}}; \frac{\text{UI}^{\text{w}}}{\text{UI}^{\text{w}}} \\
 \times \\
 \frac{+}{+/-}; \frac{\text{GMR}}{\text{CyO}}; \frac{\text{UASflp, UI}^{\text{w}}}{\text{TM3}} \\
 \\
 \frac{+}{+/-}; \frac{\text{GMR}}{\text{pCaCspC}}; \frac{\text{UASflp, UI}^{\text{w}}}{\text{UI}^{\text{w}}}
 \end{array}$$

Die Fliegen wurden immunhistochemisch analysiert und bei 37°C auf Blindheit, die bei einem Verlust der CSP-Funktion in den Photorezeptorzellen zu erwarten ist, untersucht. Einfache Phototaxis-Experimente bei nicht-permissiver Temperatur von 37°C zeigten keinen Hinweis auf Blindheit dieser Fliegen. Die Lauffixation der Fliegen wurde bei einer Temperatur von 18°C und 37°C untersucht. Die Fliegen befanden sich dabei in einer Arena, in der sie sich aufgrund gestutzter Flügel nur laufend bewegen konnten. In der Begrenzung der Arena befanden sich in definierten Sektoren ein oder zwei schwarze Balken. Eine

Lauffixation ist dann zu beobachten, wenn die Fliegen auf die dunkel abgesetzten Flächen zulaufen. Dies setzt die Sehfähigkeit der Fliegen voraus. Die erwartete Blindheit konnte durch die selektive Wahl der Laufrichtung, daher nicht bestätigt werden (siehe Anhang A4). Anhand dieses Experiments konnten keine offensichtlichen Unterschiede zu den untersuchten wildtypischen Fliegen beobachtet werden.

Andere Verhaltensanalysen zur Untersuchung des Sehens wurden aufgrund der im Folgenden beschriebenen immunhistochemischen und molekularbiologischen Ergebnisse nicht weiter verfolgt.

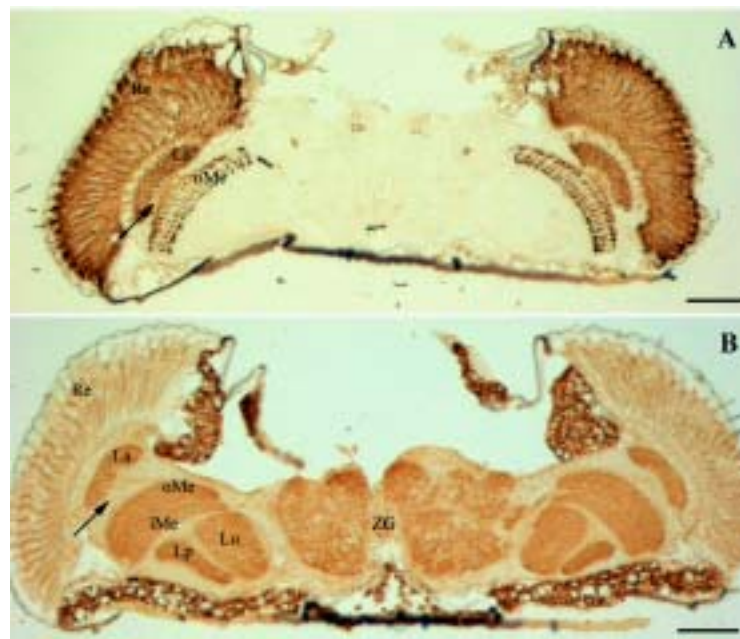


Abb 4.34 Kryostat-Gehirnschnitte; **A:** T2;U1, **B:** pCaCSP2/GUF, weitere Einzelheiten im Text; Re = Retina; La = Lamina; oMe = äußere Medulla; iMe = innere Medulla; Lp = Lobulaplatte; Lo = Lobula; ZG = Zentralgehirn. Der Pfeil markiert das erste optische Chiasma. Antikörper ab49 1:100; Skalierung: 50µm

In der Immunhistochemie konnten keine Abweichungen zu einer wildtypischen Färbung des Neuropils in den analysierten Fliegen beobachtet werden (Abb 4.34). Der Bereich der Flippaseexpression ist in Abb 4.34 A dargestellt. Hier zeigt die Färbung die Expression von CSP, wobei die cDNA unter der Kontrolle des GMR(glass)-Promotors steht und dieses Konstrukt in den Nullmutantenhintergrund eingebracht wurde. In diesem Bereich sollte nun die vom genomischen *Csp*-Promotor getriebene Expression durch die Rekombination zwischen den gleichgerichteten FRT-sites unterbunden werden, was jedoch in den Präparaten nicht zu erkennen war.

Findet die Rekombination zwischen den 2 FRT-sites in Zellen statt, welche keine Mitose mehr unterlaufen, so besteht die Möglichkeit, dass das herausgeschnittene Gen als extrachromosomales Plasmid in der Zelle bestehen bleibt (Abb 4.35). Da der gesamte *Csp*-Lokus, einschließlich regulatorischer und kodierender Sequenzen intakt bleibt, ist eine Transkription von diesem Plasmid denkbar.

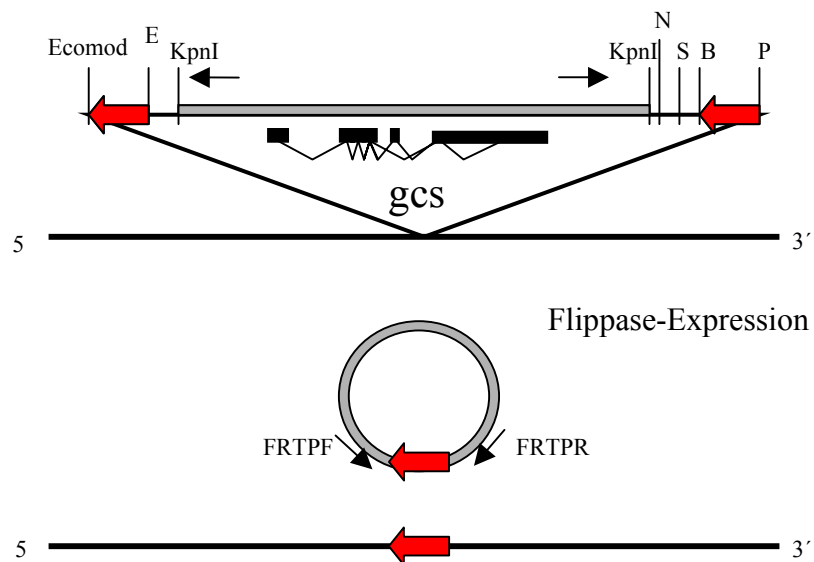
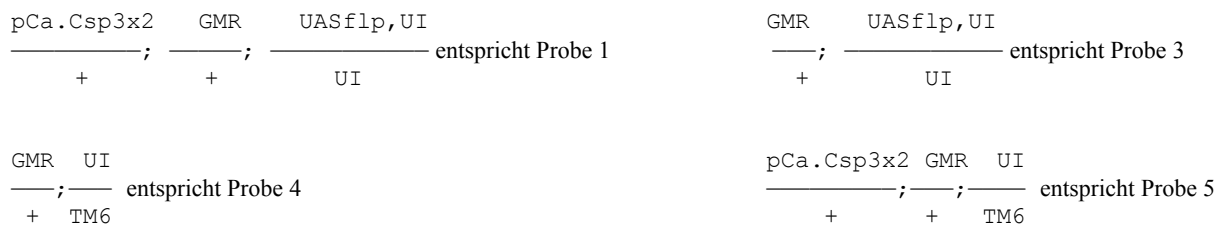


Abb 4.35 Schematische Darstellung der Rekombination durch „Herausflippen“ des genomischen *Csp*-Fragments mithilfe der Flippase. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Primer FRTPF und FRTPR. B: BamHI; E: EcoRI; K: KpnI; N: NotI; P: PstI; S: Sall

Mithilfe einer PCR müßte sich dann das extrachromosomale Plasmid nachweisen und so die Rekombination bestätigen lassen (Abb 4.36). Die in die PCR eingesetzte DNA entstammt Fliegen aus folgender Kreuzung:

$$\begin{array}{c}
 \text{pCaCsp3x2} + \text{UI}^w \\
 \hline
 \text{pCaCsp3x2} + \text{UI}^w
 \end{array}
 ; \text{---}; \text{---}
 \quad \times \quad
 \begin{array}{c}
 + \text{GMR} \quad \text{UASflp, UI}^w \\
 \text{---}; \text{---}; \text{---} \\
 \neg \text{CYO} \quad \text{TM6}
 \end{array}$$

Die genotypisch verschiedenen Nachkommen wurden tiefgefroren und anschließend die DNA mithilfe der Single Fly PCR überprüft (Abb 4.36 und 4.37).



Die PCR wurde mit den in Abb 4.35 schematisch dargestellten Primern FRTPR und FRTPF durchgeführt, diese liegen innerhalb der genomischen Sequenz, die im Rescuevektor von K. Zinsmeier enthalten, aber in der Nullmutante CspUI deletiert ist (siehe Anhang, A3). Als Positivkontrolle wurden Primer zur Amplifikation des auf dem dritten Chromosom gelegenen Synapsingens benutzt (S. Diegelmann; Abb 4.36).

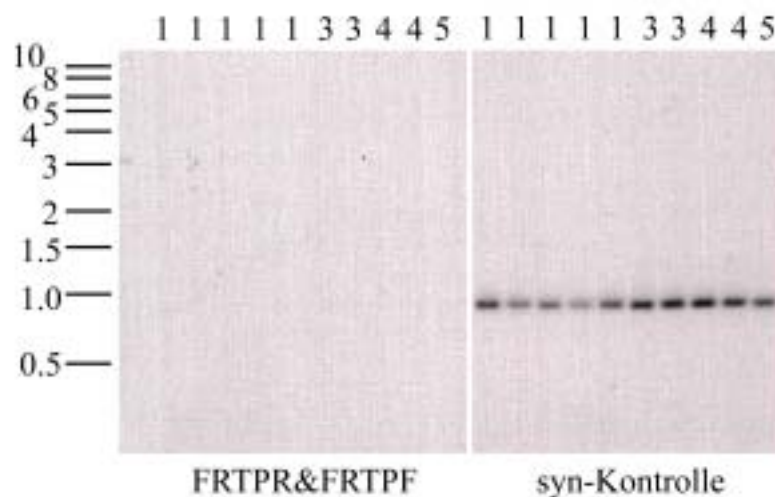


Abb 4.36 Agarosegel 0,8%, PCR zur Überprüfung des Rekombinationsereignisse durch Flippase-Expression. Die Zuordnung der einzelnen Proben ist im Text beschrieben. Marker: 1 kb Leiter, NEB

In keiner der Proben konnte mithilfe der FRT-Primer ein Amplifikat erzeugt werden. In den ersten 5 Spuren sollte bei erfolgreicher Rekombination und Entstehen eines DNA-Rings ein Produkt der Größe ca. 2,5 kb zu beobachten sein, dies ist jedoch nicht der Fall. Auch die anderen Spuren weisen kein Produkt auf. Die Primer binden nicht unspezifisch an die genomische DNA. Die Synapsin-Kontrolle zeigt, dass die Menge der eingesetzten DNA ausreichend war. Dennoch wurden je 5µl der Proben 1 reamplifiziert. Hier zeigt sich nun ein

Amplifikat der Größe ca. 400 bp (Abb 4.37 A). Dies stimmt nicht mit der erwarteten Größe von mindestens 2,5 kb überein.

Zusätzlich wurde eine PCR mit den Primern FRTPF und dem gegenläufigen Primer WTR durchgeführt. Der Primer WTR liegt stromabwärts des in CspU1 nicht deletierten Sequenzbereichs, ist im genomischen Rescue-Vektor jedoch nicht enthalten (siehe Abb 4.35 und 4.38; Anhang A3). Dieser Ansatz liefert nur dann ein Amplifikat, wenn ein wildtypischer *Csp*-Lokus vorhanden ist, was in den Spuren der Proben 4 und 5 der Fall ist (Abb 4.37). Diese Fliegen tragen ein Balancerchromosom für das dritte Chromosom und enthalten somit eine wildtypische Kopie des Gens.

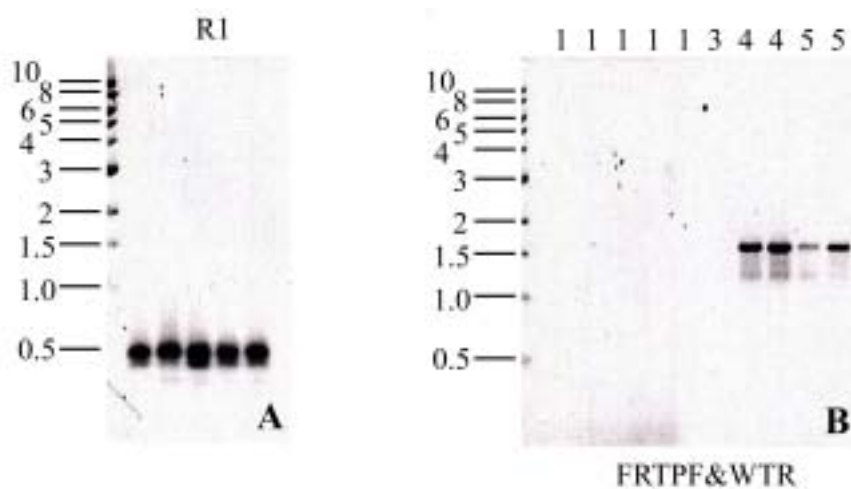


Abb 4.37 Agarosegel 0,8%; **A**: Reamplifikations-PCR, R1: Reamplifikation der Probe 1; **B**: Überprüfung auf das Vorhandensein von endogenem *Csp*, Marker: 1 kb Leiter, NEB. Weitere Hinweise im Text

Obwohl also die getesteten Fliegen kein endogenes *Csp*-Gen mehr enthalten und die Expression von CSP ausschließlich von dem transformierten FRT-Konstrukt erfolgt, hat die Expression der Flippase keinen Einfluß. Es scheint keine Rekombination zwischen den gleichgerichteten FRT-Sites stattzufinden.

4.3. Der *Csp*-Genlokus 79 D3-4

Die Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms im Rahmen des *Berkley Drosophila Genome Projekts* und das parallele Werk von *CELERA Genomics* (Applera Corporation Business) legten die gesamte nicht repetitive *Drosophila melanogaster* Sequenz offen. Verschiedene bioinformatische Algorithmen erstellten hypothetische Karten des *Drosophila*-Genoms, die nach und nach mit den experimentellen Befunden verglichen und bewiesen wurden.

Zuordnungen von hypothetischen Genen und klonierten EST-Klonen führten zu einer Auflistung der Gene und deren zytologischer Lokalisation.

Der *Csp*-Lokus von *Drosophila* auf dem linken Arm des dritten Chromsoms im Abschnitt 79 D3-4 wurde in mehreren vorangegangenen Arbeiten eingehend untersucht. Die Sequenz des genomischen Abschnitts war über mehr als 10 kb bekannt und sequenziert. Diesem genomischen Sequenzabschnitt wurde neben der *Csp*-Sequenz die Sequenz eines anderen Gens, dem *Drosophila DEAD-Box*-Gen (*Ddx1*) stromaufwärts von *Csp* zugewiesen. Der genomische Rescue-Vektor von K. Zinsmaier enthält einen Teil dieses Gens, welches keine Auswirkungen auf die Wiederherstellung des CSP-Wildtyp-Phänotyps hatte und zu diesem Zeitpunkt nicht weiter beachtet wurde.

Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms stellt sich der *Csp*-Lokus um einiges komplexer dar, als zuvor angenommen. In der zum dritten Mal überarbeiteten Version des *GadFly* Projektes vom August 2002 (Genome Annotation Database; <http://www.fruitfly.org>) stellt sich der Bereich in der Umgebung des *Csp*-Gens folgendermaßen dar (Abb 4.38). Der Gegenstrang kodiert für ein Gen CG11523 (in blau dargestellt), welches aus einem Exon der Länge 868 bp besteht. Das vorhergesagte entstehende Protein hat eine Länge von 158 Aminosäuren. Die Sequenz dieses Gens überlappt mit dem letzten Exon des *DEAD-Box*-Gens (in grün dargestellt), welches stromaufwärts von *Csp* liegt. Die potentiellen

Transkriptionsstarts der Gene GC11523 und *Csp* liegen ca. 800 bp voneinander entfernt.

Das *Drosophila* *DEAD-Box*-Protein wird von einem 2471 bp Transkript kodiert und besteht aus 727 Aminosäuren. Es gibt nur wenig Informationen über das *Drosophila* *DEAD-Box* – Protein, welches in seiner Funktion vermutlich als Helicase wirkt.

Ca. 200 bp stromabwärts vom 3'-Ende des *Csp*-Gens schließt sich unmittelbar ein weiteres Gen, CG11489 (in gelb dargestellt); an. Die Länge dieses Gens beträgt laut der Vorhersage mehr als 10 kb. Es entstehen vermutlich zwei Transkripte der Länge 6756 und 3210 Nukleotiden mit alternativen Transkriptionsstarts. (Die alte Vorhersage befasste sich mit

einem Transkript der Länge 1,4 kb und einem hypothetischen Protein von 249 Aminosäuren.) Die zwei vorhergesagten Gene CG11523 und CG11489 werden durch einige EST-Klone belegt.

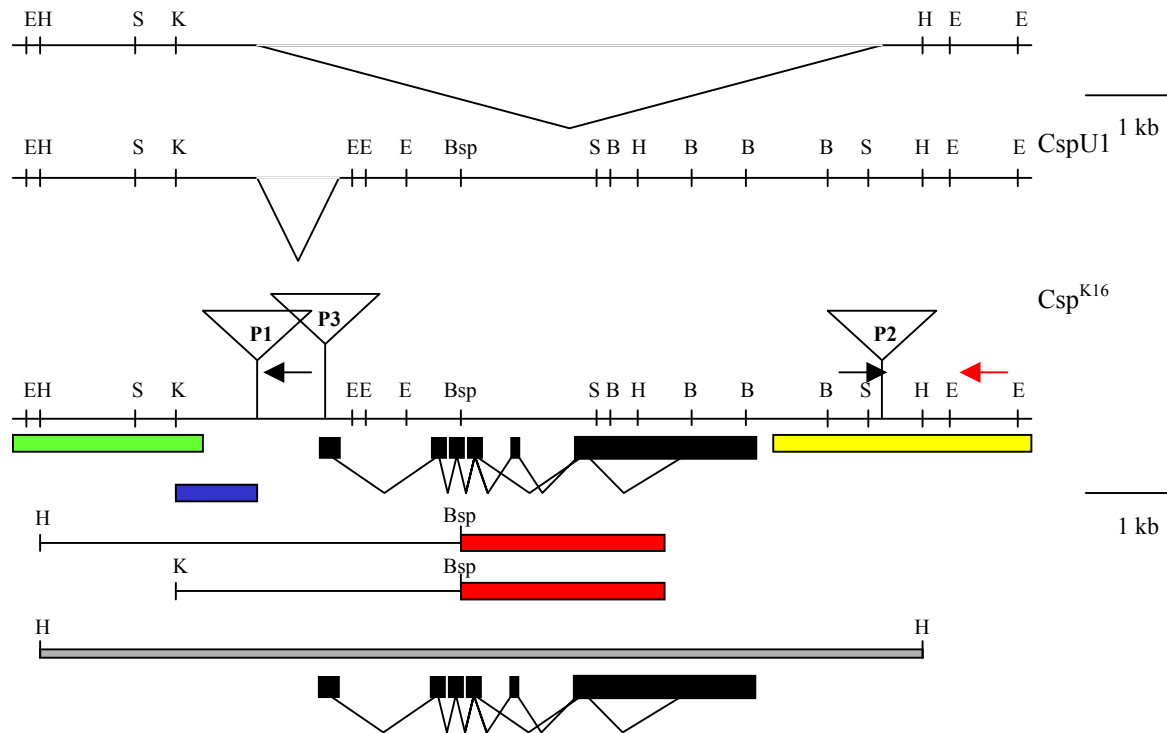


Abb 4.38 Schematische Darstellung des *Csp*-Lokus 79 D. Gezeigt sind die Deletionen *CspU1*, *Csp^{K16}*, sowie die 3 bekannten Insertionsorte der P-Elemente. Die kodierenden Bereiche der DNA sind farbig unterlegt, die Intron-Exonstruktur von *Csp* ist detaillierter angegeben. Zusätzlich ist die Zusammenstellung und die Länge der jeweiligen Rescue-Konstrukte *lcDnal*, *scDnal* und der Bereich des genomischen Rescue-Vektors von K. Zinsmaier angegeben. Der genomische Rescue, der im Northern Blot verwendet wurde, beginnt erst an der KpnI Schnittstelle. B: BamHI; Bsp: Bsp1407I; E: EcoRI; H: HindIII; K: KpnI; S: SalI. Weitere Informationen im Text. *DEAD-Box*-Gen (grün) und CG11489 Gen (gelb) sind nicht in vollständiger Länge des Gens dargestellt. CG11523 Gen (blau). Die schwarzen Pfeile zeigen die Lage der Primer FRT_{TPR} und FRT_{PF}, der rote Pfeil zeigt die Lage des Primers WTR. Sequenz im Anhang A5.

Die Deletionsmutante *CspU1* verliert nach der hitzeinduzierten Rekombination zwischen den P-Elementen P1 und P2 (Eberle 1995) nicht nur den gesamten *Csp*-Lokus, sondern auch Teile des Gens CG11489 und möglicherweise regulatorische Sequenzen des auf dem Gegenstrang gelegenen Gens CG11523. Das genomische Rescue-Konstrukt und die zwei unterschiedlich langen Promotorfragmente in den cDNA-Rescue-Konstrukten *lcDnal* und *scDnal* schließen beide das vollständige Gen CG11523 ein. Die Möglichkeit einer Überexpression dieses Gens

in den Rescue-Fliegen und die mögliche Missexpression durch eine Deletion lassen den bisherigen CSP-Phänotyp in einem anderen Licht erscheinen. Auch die veränderte Expression des Gens CG11489 durch die Deletion in der CSP-Nullmutante könnte additive Effekte zum CSP-Phänotyp beisteuern. In den Rescuefliegen kommt es zu keiner Wiederherstellung des Gens 3' von *Csp*.

Aufgrund dieser neuen Situation und der langandauernden Inzucht des Stammes *cspU1* (siehe auch 4.1.7) wurde von Christian Leibold eine P-Elementmutagenese unter Verwendung des P-Elements P3 (l(3)03988) durchgeführt, um eine neue Nullmutante für das *Csp*-Gen zu erzeugen.

4.3.1. Die Gene CG11523 und CG11489

Das kleine Gen 5' von *Csp* CG11523 (Arbeitsname α -nihil) scheint einer Genfamilie anzugehören, die durch die Evolution von *C. elegans* bis zum Menschen konserviert wurde. In *Drosophila melanogaster*, gibt es ein zweites Gen dieser Familie auf dem zweiten Chromosom (55C).

H.sapiens	-----METDC	5
M.musculus	RHIAGLERQEKKSPGRSISGGEWAGQLRGRGWCRRRDPGPSSLRTRKDKNMGARRMETDY	60
α '-nihil (55C)	-----	
α -nihil (79E)	-----	
C.elegans	--MTSLPPRNRASLFEFGSPFAPSSTTSPPTSSLAKMLKSEPIPCLRCGNVGS---PTGS	
H.sapiens	NPMESSMSGFEEGSELNGFEGTDMKDMRLEAEAVVNDVLSAVNNMFVSKSLRCADDVAY	65
M.musculus	NPVELSSMSGFEEGSELNGFEGADMKDMQLEAEAVVNDVLFVNHMFVSKSMPCADDVAY	120
α '-nihil (55C)	-----MALVQSDENDFHALR-EAQRMDSCQDFADHLIVAFLPHCRGVAY	45
α -nihil (79E)	-----MGEPKATADPGEEQAFNCEDEANAIINDVKAHVAEICISSKLASDATQIY	50
C.elegans	VPSMLHKVSSINRSAGTNPASRGGESSLELEAIAAVHELSEFAVQSISSVSEMLPRTPDLI	115
H.sapiens	INVEVKERNRYCLELTEAGLKVVGAFDQVD-----DHLQTP-----YHETVYS	109
M.muscul	INVEVKERNRYCLELTEAGLRVTHFYF-----	147
α '-nihil (55C)	INIRTLQVIYCVQLSRAQYRIVSYEFDDVAD---EVANCDT-----VYESAHQ	91
α -nihil (79E)	LNIRTIESATCCVQVSSRQFKIVSSQYDTIDEDSRISALLRNGQEQGDDEEEEIFETPYA	110
C.elegans	VNVTTLEAQPYCLELTLKWRITSLRSDCMVGDFTRLELFTK-----YYDSLIL	164
H.sapiens	LLDTLSPAYREAFGNALLQRLEALKRDGQS-----	139
M.musculus	-----	
α '-nihil (55C)	LLAGISPLYGEKYG---FGREPLGKRKEKQS-----	119
α -nihil (79E)	LLDKISPRYVESFGNQLCQQLRALQQMRTEFNEDDEEEEEEAEK-----	158
C.elegans	LMDDISPGYRERFSEKLVQRKLIEAGEEDQVAPCASLQSPSLSTSSSKESQYSSTESL	224

Abb 4.39 CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment für α -nihil 5' von CSP mit homologen Sequenzen aus Mensch (AK000796), Maus (AK017049) und *C.elegans* (nicht vollständig dargestellt; CA.A21510.1; gi:3947625) und des zweiten Familienmitglieds in *Drosophila melanogaster* (CG14505)

Die Funktion dieses Proteins ist nicht bekannt und seine Sequenz befindet sich nicht in der SwissProt real Datenbank.

Das Gen CG11489 besteht aus mehreren Exons, die alternativ gespleißt werden und zwei verschiedene Transkriptionsstarts haben. Das Transkript, welches kurz nach dem Ende von *Csp* beginnt, besteht aus 5 Exons, das zweite Transkript, welches ca. 4 kb stromabwärts beginnt enthält laut Flybaseangaben 9 Exons. Das Gen ist in der Flybase aufgrund von mehreren Homolgien und Konsensussequenzen als BEST:CK01209 zu finden. Es kodiert laut diesen Angaben für eine Proteinkinase, welche an der Phosphorylierung von Proteinamino­säuren beteiligt ist.

H.sapiens	35	EILGSDDEEQ	EDPADYCKGG	YHPVKIGDLF	-NGRYHVI	IRK	LGWGHFSTVW			
M.Musculus	89	EILGSDDEEQ	EDPADYCKGG	YHPVKIGDLF	-NGRYHVI	IRK	LGWGHFSTVW			
D.melanogaster	314	SSLYVSDEEQ	EDASQCRGG	YHPVVI	GDIF	-DNREFVVRK	LGWGHFSTVW			
C.elegans	33	--LGSDDDEEQ	EDPRDYKRG	YHPVNI	GDVF	-NARYHVI	IRK	LGWGHFSTVW		
S.cerevisiae	124	SISSCDERNE	ESLKDYRPG	YHPAFK	GEPY	KDARYILVRK	LGWGHFSTVW			
S.pombe	56	-----E	ENAEDM	HYGG	YHPVYI	GEEF	HHRRYVVERK	LGWGHFSTVW		
H.sapiens	84	LCWDMQGRF	VAMKVVKS	SAQ	HYTETAL	DEI	KLKCVRES	D	P---SDPNKD	
M.Musculus	138	LCWDMQGRF	VAMKVVKS	SAQ	HYTETAL	DEI	KLKCVRES	D	P---SDPNKD	
D.melanogaster	363	LCRDLKDEKY	VALKVVKS	SAP	HYIETA	ADEI	RLLEAIRD	DAD	P---MDvkre	
C.elegans	80	LAWDTQDKRF	VAMKIVKS	SAE	HYTEAAL	DEI	KLKLSVRS	SAD	P---NDIGCH	
S.cerevisiae	174	LAKDMVNTH	VAMKIVRG	GDK	VYTEAA	EDEI	KLQRVND	DAD	ntkeDSMGAN	
S.pombe	97	LAYDRAAKRR	VALKVVRS	SAE	HYRETS	IDEI	RILQKIRE	GD	E---KHLGKK	
H.sapiens	131	MVVQLIDDFK	ISGMNGI	HVC	MVFEVL	GHHL	LKWLIK	SNYQ	GLPVR	CVKSI
M.Musculus	185	MVVQLIDDFK	ISGMNGI	HVC	MVFEVL	GHHL	LKWLIK	SNYQ	GLPVR	CVKSI
D.melanogaster	410	RIVRLMNHFT	VRGVN	MHTC	LVFEAL	GCSL	YKLVK	NNYQ	GLAIA	QVRNI
C.elegans	127	KVVQLLDEFT	VTGING	QHVA	MVFEVL	GCNL	LKLIR	SNYR	GLHLE	QVRKI
S.cerevisiae	224	HILKLLDHFN	HKGPN	GVHV	MVFEVL	GENL	LALIK	KYHR	GIPLI	YVKQI
S.pombe	144	HIISLLDYFV	HRGPN	GAHVC	MVFEVL	GENL	LSLQ	SYGHR	GVPVG	IVKQI
H.sapiens	181	IROVLEGLDY	LHSGKGI	IHT	DIKPENI	ILMC	VDDAY	VRRMA	AEATE	WQKAG
M.Musculus	235	IROVLEGLDY	LHSGKGI	IHT	DIKPENI	ILMC	VDDAY	VRRMA	AEATE	WQKAG
D.melanogaster	460	IROVLEGLDY	LHSGKGI	IHT	DIKPENI	LLV	IDNAA	-----	-----	-----
C.elegans	177	CROVLEALGY	MHEKGI	IHT	DIKPEN	VLI	msreei	kima	qhav	varkmn
S.cerevisiae	274	SKQLLLGLDY	MHRRCGI	IHT	DIKPEN	VIME	IGD	-----	-----	-----
S.pombe	194	AYQLLIALDY	LHRECGI	IHT	DLKPEN	VLIC	IDQDA	lqh--	-----	-----

Abb 4.40 Ausschnitt der signifikanten Homologie zwischen dem *Drosophila* Protein codiert durch BEST:CK1209 und *Homo sapiens* serine kinase SRPK2 EMBL:AC005070 gi:3406050; *Mus musculus* Srpk2 MGI:1201408; *Caenorhabditis elegans* similar to Eukaryotic protein kinase domain EMBL:Z19152 protein_id:CA.A79542 gi:3873798; *Saccharomyces cerevisiae* PROBABLE SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE YMR216CSWP:Q03656 gi:2499619; *Schizosaccharomyces pombe* PROTEIN KINASE DSK1 (DIS1-SUPPRESSING PROTEIN KINASE)SWP:P36616 gi:544191. Identische Aminosäuren sind rot unterlegt, handelt es sich um 2 verschiedene Aminosäuren sind diese gelb unterlegt.

Ähnliche Sequenzen in *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* wurden identifiziert (Abb 4.40).

Das Gen wurde sequenziert und die Aminosäuresequenz enthält eine Domäne, die dem aktiven Zentrum der Familie eukaryotischer Proteinkinasen und Serine/Threonin-Kinasen angehört (<http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbidq.html?FBgn0025702>; TrEMBL: <http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q8SWX7>). Es sind keine mutierten Allele dieses Gens bekannt.

4.3.2. Analyse der genomischen Situation

Bereits die P-Elemente P1 (P318/17) und P2 (P478/16) sind in den Regionen der zwei neu vorgestellten Gene inseriert und könnten schon zu diesem Zeitpunkt den Phänotyp der Fliegen in irgendeiner Weise beeinflussen. Diese zwei P-Elementinsertionen entstammen der Zürcher Mutagenese und zeigen keine Auffälligkeiten im Bezug auf CSP-spezifische Phänotypen. Sie zeigen keine temperatursensitive Paralyse oder verkürzte Lebensdauer, ebenso scheint ihre Aktivität nicht von der des Wildtyps verschieden zu sein. Die Aktivität, als einfachstes phänotypisches Kriterium, der betroffenen Fliegenstämme und die entsprechenden Nullmutanten wurden in einem einfachen Aktivitätstest untersucht. Dazu wurden gleichaltrige Fliegen, die bei 18°C gezüchtet wurden, einzeln in eine in vier Quadranten unterteilte Petrischale transferiert und 5 min lang die Anzahl der Quadrantenwechsel erfasst. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den P-Element-Linien und den Rescue-Fliegen oder dem Wildtyp festgestellt werden. Die Nullmutanten CspU1 und Csp^{K16} zeigten wie zu erwarten eine geringfügig verminderte Aktivität (Daten nicht gezeigt). Subtile Unterschiede zwischen diesen Fliegen konnten in diesem Experiment nicht untersucht werden und wurden auch in keinem ausgefeilteren Ansatz überprüft, da eine Zuordnung der phänotypischen Unterschiede zu den drei betreffenden Genen nicht möglich ist.

Die Frage einer Veränderung der Expression der Gene CG11523 (Arbeitsname: α -nihil) und CG11489 (Arbeitsname: nihil) wurde in einem Northern Blot der polyA⁺-RNA adulter Fliegen untersucht. Als Sonde wurden jeweils ein EST-Klon der Gene (GM01793= α -nihil und GH08190=nihil) gewählt (Abb 4.41). Die Größe von ca. 900 bp (Abb 4.38) der inserierten cDNA, entspricht bei GM01793 nahezu der gesamten Länge des transkribierten Gens, welches sich durch Sequenzierung und Datenbankvergleich bestätigen ließ. Das Insert des Klons GH08190 mit einer Länge von ca. 1,7 kb stellt nur einen Teil der Sequenz des Gens CG11489 dar, es handelt sich größtenteils um den 5'-Bereich, der sich nahezu direkt an den nicht translatierten Trailer von Csp anschließt. Teile dieser Sequenz im 5'-Bereich des Gens

sind in der CSP-Nullmutante CspU1 deletiert.

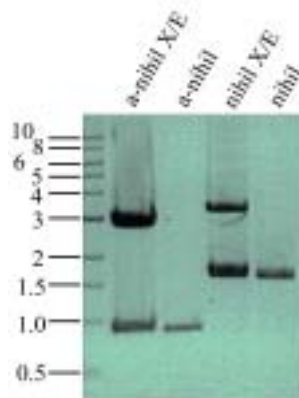


Abb 4.41 Agarose-Gel 0,8%, gezeigt ist ein XhoI/EcoRI Doppelverdau der EST-Klone GM01793= α -nihil und GH08190=*nihil* und die aufgereinigten Inserts, welche als Sonde für den Northern Blot verwendet wurden. Marker: 1 kb Leiter, NEB

Als Beispiele für den genomischen Rescue und die cDNA-Rescues wurde RNA aus den Fliegenlinien pCaCsp;U1, scDNA;1 und lcDNA;U1 untersucht. Die Expression in den Nullmutanten CspU1 und Csp^{K16} wie auch in den Ausgangslinien der Deletion den P-Elementlinien P318/17 und P487/16 wurde untersucht.

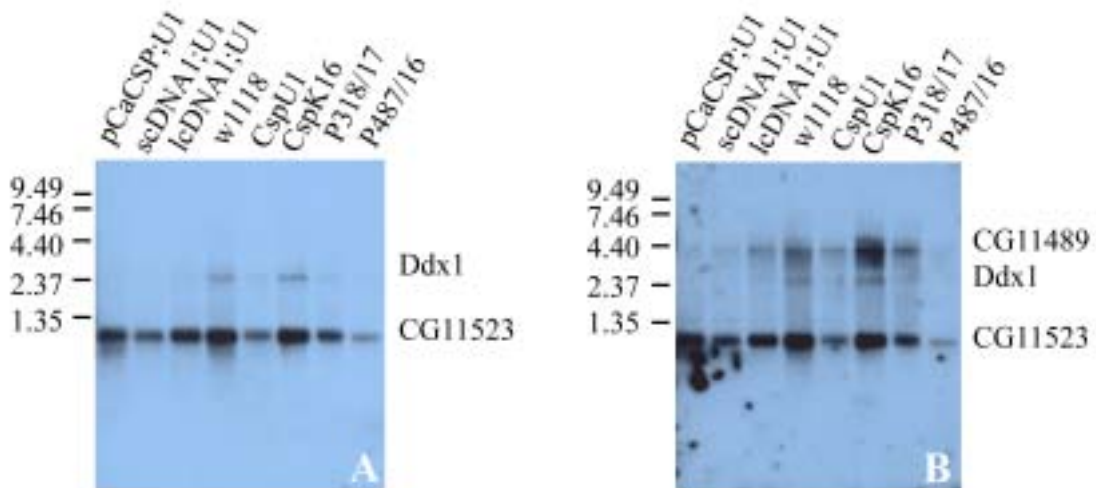


Abb 4.42 Autoradiogramme des Northern Blots **A**: als Sonde wurde der EST-Klon GM01793 verwendet; **B**: als Sonde wurde der EST-Klon GH08190 verwendet; Marker: RNA-Leiter, GOBCO BRL; weitere Informationen im Text

Die Hybridisierung des Northern Blots mit der Sonde des Klons GM01793 (Abb 4.42 A) zeigt in allen Linien eine Bande, welche die Expression des Gens CG11523 widerspiegelt. Die Mutanten CspU1 und Csp^{K16}, die den gleichen Bruchpunkt im 5'-Bereich haben, zeigen deutlich die mRNA dieses Gens. Dies weist darauf hin, dass die Expression in der Deletionsmutante nicht betroffen zu sein scheint. In allen anderen Linien findet ebenfalls eine Expression statt. Durch die unterschiedliche Beladung der einzelnen Spuren ist eine Diskussion der Expressionsstärke nicht sinnvoll. Die etwas größere detektierte mRNA von ca. 2,7 kb lässt sich der Expression des *Ddx1*-Gens zuweisen (siehe Diskussion 5.3.).

Die Hybridisierung mit der Sonde des 3'-gelegenen Gens CG11489 zeigt nach längerer Exposition des nicht gestripten Blots eine Bande bei ca. 4,3 kb. Überraschenderweise sind qualitative Effekte der Nullmutation nicht zu erkennen. Die unterschiedliche Beladung der einzelnen Spuren schließt eine quantitative Interpretation der Daten aus. Die Expression der beiden Gene um *Csp* bleibt in den Nullmutanten erhalten, eventuelle additive Effekte zum CSP-Nullphänotyp sind allerdings nicht auszuschließen.

5. DISKUSSION

5.1. Verschiedene CSP-Mutanten

Einige neue molekularbiologische Methoden wie zum Beispiel das Yeast-Two-Hybrid System haben in den letzten Jahren das Aufspüren von interagierenden Proteinen sehr erleichtert. Überexpressionen interessanter Proteine in geeigneten Zelllinien und die anschließende biochemische Analyse wurden optimiert und bestätigen lange vermutete Interaktionen von Proteinen. Diese etablierten Systeme ersetzen allerdings nicht das Gesamtbild der Vorgänge innerhalb eines kompletten Organismus. *Drosophila melanogaster* dient seit Jahrzehnten als Modellorganismus der Genetik und auch der Molekularbiologie und wird durch die Anwendung neuerer Methoden als solcher ergänzt. Die Möglichkeit, Auswirkungen mutierter Proteine in einem Organismus zu untersuchen, ist hier gegeben.

5.1.1. Welche Bedeutung hat die Palmitylierung für das Protein CSP?

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Zuordnung einzelner Domänen des CSP-Proteins im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* untersucht. Als markanteste Region innerhalb des Proteins ist der hervorstechende Cysteinstrang zu betrachten, welcher von C. Arnold im Vorfeld mehrfach mutiert wurde (Arnold 1999). Cysteinreste können mit Fettsäureresten, zum Beispiel Palmitylresten, durch eine Thioesterbrücke verbunden werden, was beim vorliegenden Protein der Fall ist. Diese Fettsäuren ermöglichen dann eine Bindung an Membranen. Eine andere Art der Membranbindung von Proteinen kann durch spezifische Eigenschaften seiner Bausteine gegeben sein. Lipophile Aminosäuren innerhalb des Proteins können sich in die Membran einlagern oder eine Transmembranregion bilden und so ein Protein in oder an der Membran verankern. Innerhalb der Zelle gibt es vorgezeichnete Wege, die die Proteine während ihrer Entstehung einschlagen, um an ihren Ziel- und Wirkungsort zu gelangen. Das „Lesen“ dieser „Wander-Karte“ wird durch spezielle Erkennungsmerkmale in den mRNA- und Aminosäuresequenzen unterstützt.

Die Voraussetzung einer Palmitylierung eines Proteins und das eindeutige Signal sowie die zuständigen Enzyme für einen solchen Vorgang sind noch weitestgehend unbekannt. Es gibt

keine Konsensussequenz im klassischen Sinne, allerdings sind für einige Proteinfamilien, wie zum Beispiel GPCRs (G-Protein coupled Receptors), Synaptotagmin, Synaptobrevin, einige zytosolische Cysteinreste nahe der späteren Membranbindungsstelle als Signal charakterisiert worden (El-Husseini und Brecht 2002; Dunphy und Linder 1998). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde nun eine Palmityltransferase identifiziert, die durch ein DHHC Motif und eine cysteinreiche Domäne gekennzeichnet ist (Roth et al 2002). Versuche mit neu synthetisierten Proteinfragmenten zeigten, dass diese *in vitro* durchaus spezifisch mit Palmitylresten thioacyliert wurden, was die Autoren zu der Spekulation verleitet, dass Palmitylierung auch *in vivo* in Säugerzellen möglicherweise nicht ausschließlich enzymatisch stattfindet (Navarro-Lerida et al 2002). Obwohl die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins ein gutes Nukleophil darstellt, lassen sich spontane Palmitylierungsereignisse *in vivo* jedoch nicht nachweisen, was zumindest den Schwerpunkt dieses Prozesses spezifischen Enzymen zuweist (Resh 1999). Die Palmityltransferase für CSP in *Drosophila melanogaster* ist nicht bekannt. Eine Behandlung der Membranfraktionen von *Drosophila*-Kopfhomogenat mit Na_2CO_3 durch das periphere Membranproteine freigesetzt werden (van de Goor und Kelly 1996; Mastrogiacomo et al 1998a und Arnold 1999), bringt auch Teile von CSP in die lösliche Fraktion (Arnold 1999, Abb. 3.3.11). Allerdings führt generell die Behandlung von *Drosophila*-Membranen mit alkalinen Lösungen zu einer geringen Freisetzung von Fettsäuren und integralen Membranproteinen (Mastrogiacomo et al 1998a), so dass dies möglicherweise der Grund dafür ist, dass CSP auch in der Na_2CO_3 solubilisierten Fraktion nachzuweisen war. Das CSP-Protein und seine mutierten Isoformen werden durch Hydroxylamin scheinbar vollständig depalmityliert, aber nicht von oder aus der Membran gelöst. Die Thioesterbindung stellt eine eher schwache kovalente Verbindung dar. Ihre Modulation dient so als wertvoller Mechanismus in der Regulation von Zellentwicklung und Signalwegen. Bei bestimmten physiologischen Stimuli kann der Grad der Palmitylierung dynamisch verändert werden (El-Husseini und Brecht 2002). In *Drosophila* sind keine Isoformen von CSP zu finden, die nicht in gleichem Grad palmityliert wären (Gundersen et al 1996). Die posttranslationale sekundäre Modifikation durch die Veresterung muss vermutlich noch am naszierenden Protein stattfinden. Eine längere Inkubation des Membranpellets P2 mit Hydroxylamin bringt keinen weiteren beobachtbaren Größenverlust, auch zeigt der Größenvergleich zwischen den Isoformen SSP und der depalmitylierten größten Isoform CSP1 keine Unterschiede (Arnold 1999, Abb. 3.3.10). Die Mutante CSLP zeigt, dass die flankierenden zwei Cysteinpaare, durch den Verlust des gesamten Cysteinstrangs nahe aneinandergebracht, wohl immer noch ausreichen, um das Protein teilweise an die Membran zu befördern. Leider konnte über den

Palmylierungsgrad in dem experimentellen Ansatz der Depalmylierungen keine Aussage gemacht werden. Vergleicht man allerdings die Größenverhältnisse der verschiedenen Proteine im Western Blot Abb. 4.3, so erkennt man, dass CLP das kleinste Protein darstellt. Diese mutierte Isoform enthält keine Cysteinreste und kann daher nicht palmyliert werden. Im Gel unwesentlich langsamer läuft das CSLP Protein, welches sich nur in den noch vorhandenen flankierenden Cysteinen unterscheidet und rechnerisch nur um 64 Da schwerer ist. Der Größenunterschied zwischen CLP und SSP beträgt rechnerisch 1,219 kDa, im Gel laut Marker ca. 1,1 kDa. Diese beiden Proteine unterscheiden sich in ihrer Länge um 11 Aminosäuren (Abb. 4.2). Das theoretische Molekulargewicht eines Palmylrestes beträgt 229 Da. Die Palmylierung nur eines Cysteinrestes ist sicherlich auf einem Western Blot mit der Auflösung eines 12,5%igen Geles nicht definitiv zu erkennen. Betrachtet man allerdings diese 3 mutierten CSP-Isoformen im Gel nebeneinander, so wird der Unterschied deutlich. Daher sind möglicherweise ein oder zwei der vier Cysteine im CSLP-Protein über Thioesterbrücken mit der Fettsäure verbunden. Dieser niedrige Palmylierungsgrad scheint zumindest einen beachtlichen Prozentsatz des mutierten CSLP-Proteins an die Membran zu leiten, wie aus der Verteilung in Abbildung 4.6 und im Glyceringradienten Abb. 4.14 deutlich zu beobachten ist. Da in der regulatorischen Mutante Csp^{U2} (Arnold 1999) bereits geringe Mengen an wildtypischen CSP den Phänotyp der Nullmutante deutlich abschwächen, deuten diese Befunde darauf hin, dass der Cysteinstrang neben seiner Rolle beim Protein-Targeting auch für die Funktion des Proteins essentiell ist.

Die Schwierigkeiten, die sich in der Zucht mit mehreren unabhängigen Transgen-Insertionen des CSLP-Konstruktes ergaben, drängten die Vermutung auf, dass möglicherweise ein sekundärer oder dominant negativer Effekt zu beobachten ist und daher eine homozygote Haltung der Mutante im Csp^- -Hintergrund nicht möglich war.

Ein nur um einige Cysteine reduzierter Cysteinstrang erfüllt seine Aufgabe im Bezug auf die Lokalisation an die Membran offenbar nahezu vollständig. Wie die Membranfraktionierungen und die anschließenden Depalmylierungen zeigen (Abb. 4.8 und 4.9) ist das SCSP Protein fest an oder in der Membran verankert. Dennoch weisen die betroffenen Fliegenlinien eine temperaturabhängige Paralyse auf (Prüfert 2001). Möglicherweise bedeutet der Verlust des halben Cysteinstrangs eine Veränderung der tertiären Struktur des Proteins, welches die Bindung an die Membran erlaubt aber die weiteren Funktionen des Proteins stört. Um solche Konformationseffekte bei der CLP-Mutante zu minimieren, entstand im Zuge der Mutagenisierung des Cysteinstrangs die Mutante SSP. Da diese beiden Proteine jedoch aufgrund des nicht vorhandenen Cysteinstrangs ihren Weg an die Membran nicht finden, was

vermutlich eine Bedingung für die Funktion des Proteins darstellt, kann hier keine Aussage über die konformationsbedingte Störung des Proteins getroffen werden. Eine weitere Mutante, welche die in SCSP deletierten Aminosäuren durch Serine ersetzt, könnte dieses Problem möglicherweise lösen. Die Substitution von 7 zentralen Cysteinen durch Serine in bovinem Csp1 eliminieren allerdings die Palmylierung des mutanten Proteins nahezu vollständig. Das so modifizierte Protein wurde nicht an die Membran transportiert und lag rein zytosolisch vor (Chamberlain und Burgoyne 1998b). Ob die Funktion des Cysteinstrangs auf die Membranlokalisierung beschränkt ist, ließe sich klären, wenn es gelänge das Targeting-Signal eines anderen synaptischen Vesikelproteins in das CSP zu integrieren.

Das Palmylierungssignal innerhalb des CSP-Proteins ist in *Drosophila* nicht bekannt. Die Mutante LΔ8 hat keinen Einfluss auf den Palmylierungsgrad des Proteins und beeinflusst weder die Membranbindung noch die Lokalisation des mutierten CSPs in der Synapse. Die postulierte membranbindende oder membrandurchspannende Region im Protein wird durch die Deletion der acht hochkonservierten Aminosäuren nicht beeinflusst. In anderen untersuchten palmylierten synaptischen Membranproteinen, zum Beispiel SNAP25, sind die verantwortlichen Aminosäuren bekannt und liegen ganz in der Nähe der cysteinreichen Region (El Husseini und Bredt 2002; Gonzalo et al 1999). Auch für dieses synaptische Protein existiert eine mutante Fliegenlinie mit temperatursensitiv paralytischen Phänotyp (Rao et al 2001). Vergleichbar mit dem CSP-Protein lässt sich auch das an die Plasmamembran gebundenen SNAP25, nicht durch Depalmylierung von der Membran lösen. Dieses Protein wird 20 min nach seiner Entstehung, nach einem durch Brefeldin A zu störenden Transport an die Plasmamembran, parallel zur Membranassoziation an anderer Stelle palmyliert (Gonzalo und Linder 1998). SNAP25 ist als Bestandteil des SNARE-Komplexes (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) ebenfalls ein wichtiges Protein im Prozess der Exozytose.

Trotz korrekter Lokalisation des LΔ8-Proteins kommt es dennoch zu CSP typischen Phänotypen wie der temperatursensitiven Paralyse. Auch wenn diese schwächer ausgeprägt ist als in der Nullmutante, so ist doch eine starke der Paralyse ähnliche Benommenheit der mutanten Linien zu beobachten. Ähnlich wie bereits bei der mutanten Linie SCSP ist diese Beobachtung möglicherweise auf die Konformationsänderung des Proteins aufgrund des Verlustes von 8 Aminosäuren zurückzuführen. Die DnaJ-Domäne rückt durch die Deletion näher an den Cysteinstrang, was eine sterische Hinderung durchaus möglich erscheinen lässt. Möglicherweise ist aber auch eine geringere Expression oder verminderte Stabilität dieses Proteins für diesen Phänotyp verantwortlich. Das Protein lässt sich im Western Blot (Abb 4.4)

nur in sehr geringen Mengen nachweisen, der gefärbte Kryostatschnitt zeigt aber keine deutlich verminderte Färbung des Gehirns (Abb 4.23). Die Prozedur des Western Blots schließt ein Erhitzen der Proben für 5 min bei 65°C ein, bevor diese auf das Polyacrylamid geladen werden. Es ist daher möglich, dass dieses Protein LΔ8 hitzeinstabil ist und teilweise zerfällt.

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre, durch eine Mutation den Membrananker zu deletieren. Laut bioinformatischer Programme zur Errechnung von potentiellen Transmembrandomänen befindet sich diese wohl um Aminosäureposition 92 bis 118, was in der Isoform CSP1 sowohl einen Teil der Linker Region, als auch des Cysteinstrangs mit einschließt (Persson und Argos 1994/1996). In diesem Bereich sind wohl die Aminosäuren zu suchen, die als Kandidaten für den Membrananker in Frage kommen. Dieser Bereich der CSP-Sequenz enthält auch ein paar hochkonservierte Aminosäuren, die möglicherweise diese Aufgabe erfüllen können (...NAYFVVVTSPAVKAVVI...).

Die Deletion der C-terminalen 27 Aminosäuren des CSP-Proteins zeigen in den transformanten Fliegenlinien bislang keine Auffälligkeiten. Das Protein CΔ27 erscheint in seiner Größe auf dem Western Blot um ca. 7 kDa, deutlich mehr als rechnerisch erwartet (3,868 kDa) reduziert. Die Hypothese, dass möglicherweise der C-terminale Teil des Proteins als Signal für die Palmytylierung dient, wurde durch das in Abb. 4.7 gezeigte Depalmytylierungsexperiment entkräftigt. Die Depalmytylierung führt zu einem dem Wildtyp entsprechenden Gewichtsverlust von 6-7 kDa.

Die Ergebnisse der Deacylierung in Verbindung mit den Funktionsexperimenten stützen die Hypothese, dass das CSP-Protein durch die Palmytylierung ein Signal erhält, welche eine Navigation zu dem korrekten Membrankompartiment, dem synaptischen Vesikel, zulässt. Ist kein Cysteinstrang innerhalb des Proteins vorhanden (CLP und SSP) oder der Strang in seiner Länge reduziert (CSLP und SCSP), dann erfolgt kein oder nur ein verminderter Transport des Proteins an die Membran. Es ist leider nicht möglich festzustellen, ob der Verlust von Cysteinen oder der Palmytylierung der Proteine für die beobachtbaren Folgen verantwortlich ist.

Das sich darstellende Gesamtbild der Depalmytylierung und der Verteilung der mutierten CSP-Proteine lässt folgenden Schluss zu. Die mutanten Isoformen des Cysteine String Proteins interferieren nicht mit den wildtypischen Isoformen. Dominant negative Effekte im Csp⁺-Hintergrund sind nicht zu beobachten. Die Auswirkungen der mutierten Proteine zeigen sich teilweise in den Färbungen der Kryostatschnitte, wo deutlich die Fehlleitung der Proteine CLP und SSP zu erkennen ist. Auch die Ergebnisse der Verteilung des CSLP Proteins spiegelt

sich in der Immunhistochemie wider. Alle den Cysteinstrang betreffenden transgenen Fliegenlinien zeigen das für CSP typische Temperatur-sensitiv paralytische Verhalten. Die Kryostatschnitte der Mutanten C Δ 27 und L Δ 8 zeigen eine wildtypische Verteilung der mutierten Proteine, aber nur die Mutante C Δ 27 zeigt in den vorgestellten Versuchen ein wildtypisches Verhalten.

Während der Untersuchung von bovinen CSP Isoformen konnte festgestellt werden, dass die um 31 Aminosäuren verkürzte Csp2-Isoform isoliert oder gebunden an Hsc70 eine geringfügig schwächere Chaperone-Aktivität zeigt (Chamberlain und Burgoyne 1997b). Die Aktivierung der intrinsischen ATPase Aktivität von Hsc70 war nicht gestört. So sind ähnliche molekulare Effekte durch den Verlust der C-terminalen 27 Aminosäuren im *Drosophila*-CSP vorstellbar. Auswirkungen dieser Effekte konnten aber in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Ebenso wurde für das verkürzte bovine Csp2 eine höhere Affinität für Syntaxin1A beschrieben, was sich unter Umständen ebenfalls auf die CSP-Mutante C Δ 27 übertragen lässt (Chamberlain et al 2000). Stellt der trimere Komplex aus CSP, SGT und Hsc70 wirklich die physiologisch funktionelle Form des CSPs dar, sind möglicherweise Veränderungen der Exozytose in den C Δ 27 Mutanten detektierbar (Tobaben et al 2001). Eine ähnliche Störung der Etablierung des trimeren Komplexes aufgrund von sterischen Behinderungen zwischen dem L Δ 8 Protein und den interagierenden Domänen von Hsc70 und SGT könnten möglicherweise zu dem beobachteten Phänotyp einer temperatursensitiven Paralyse führen.

Die entscheidenden Versuche zur Überprüfung der Funktionalität dieser Proteine anhand von elektrophysiologischen Messungen werden an anderer Stelle beschrieben und diskutiert werden (Leibold in Vorbereitung). Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Hypothese eines anderen Membranankers, der vermutlich in den stark konservierten Aminosäuren zwischen den deletierten Aminosäuren der Mutante L Δ 8 und den Cysteinresten N-terminal zum Cysteinstrang kodiert ist. Eine mögliche Störung der Interaktion zwischen den Hsc70 und SGT Homologen ist generell in Betracht zu ziehen.

5.1.2. Interaktionen zwischen CSP und anderen synaptischen Proteinen

Mithilfe der Immunpräzipitation wurden in der vorliegenden Arbeit die unterschiedlichen mutierten Proteinisoformen des Cysteine String Proteins aus *Drosophila* Gehirnhomogenaten isoliert. Durch die spezifische Bindung der CSP-Antikörper wurden nur die entsprechenden CSP-Isoformen angereichert. Eine Ko-Immunpräzipitation mit interagierenden Proteinen

gelang nur bedingt. Die postulierten CSP-Interaktionspartner sind einerseits synapsenspezifische Proteine wie Syntaxin, Synaptotagmin und vermittelt durch die Synprint-Site, die P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle, andererseits Hsc70/Hsp70 beziehungsweise das *Drosophila*-Homolog Hsc4, das mitverantwortlich für die stressbedingten Reaktionen in der Zelle ist, und die G β -Untereinheit, ein wichtiger Bestandteil des in der Signaltransduktion unverzichtbaren trimeren G-Proteins. Ein erst kürzlich entdecktes Protein SGT (small glutamine rich tetratricodepetid repeats Protein; Tobaben et al 2001), bildet mithilfe von Hsc70/Hsp70 und CSP vermutlich eine trimere Chaperonmaschinerie. Zudem wurde auch eine transiente Interaktion mit der Protein Kinase A (PKA) beschrieben, durch die CSP an einem N-terminalen Serin phosphoryliert wird, wodurch die Bindungsaffinität zu Syntaxin verändert wird (Evans et al 2001). Auch eine Interaktion mit CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), einem Cl- Kanal, wurde beschrieben (Zhang et al 2002). Eine Interaktion in einem anderen Chaperonkomplex aus Hsp90, Hsc70 und CSP wurde beobachtet (Sakisaka et al 2002).

Die Inkubation der Präzipitate mit dem Antikörper gegen CSP zeigten in einigen Fällen nicht nur die angereicherte CSP-Isoform und die zwei zu erwartenden Antikörperketten sondern auch ein Signal bei ca 70-75 kDa (Abb 4.17 Pfeil). Dieses Signal taucht in den Präzipitationen mit SSP (Abb 4.19) ebenso auf, wie im Fall aller wildtypischen Isoformen (Abb 4.20 und Abb 4.21, Inkubation mit beiden Antikörpern). Dieses Protein, das trotz des rigorosen Erhitzens in Gegenwart von SDS und β -Mercaptoethanol stabil mit dem CSP verbunden bleibt, müsste eine postulierte Größe von ca. 34-39 kDa haben. Aufgrund früherer Erfahrung mit bakteriell exprimiertem CSP ist jedoch zu vermuten, dass es sich hierbei um ein CSP-Dimer handelt. Ein Bereich der den Cysteinstrang mit einschließt zeigt sich für die Dimerisierung aber auch Oligomerisierung von Ratten-CSP verantwortlich (Swayne et al 2003). Rein rechnerisch, könnte es auch Syntaxin gebunden an CSP sein. Dem widerspricht, dass eine Inkubation mit dem Antikörper 8C3 gegen Syntaxin diese Bande nicht aufzeigt. Eine Maskierung des Epitops durch die Bindung an CSP wäre denkbar. Möglich wäre auch eine gebundene G β -Untereinheit. Ein Proteinkomplex dieser Größe wurde in Vertebraten in einer Silberfärbung nachgewiesen (Magga et al 2000; Fig 3 D). In Western Blots von chemisch quervernetztem Hippocampus Homogenat zeigt sich allerdings ein Komplex der Größe 110 kDa, in dem G β und CSP nachgewiesen werden können (Magga et al 2000; Fig 5 C). Da in den vorliegenden Versuchen mithilfe des G β -Antikörpers eine dem G β entsprechende Bande im Präzipitat nicht nachgewiesen werden konnte (siehe jedoch Schwenkert 2002), handelt es sich wohl tatsächlich um ein CSP-Dimer. Über die Identität der schwachen Bande bei ca. 40 kDa in Abb

4.17 liegt keine Information vor.

Die Bindung des CSP-Antikörpers am C-Terminus stört die Interaktion des Proteins CSP mit Syntaxin wahrscheinlich nicht. Aufgrund der verminderten Affinität von Vertebraten-CSP zu Syntaxin nach der Phosphorylierung des Serins an Position 10 im CSP, wird eine Interaktion des N-Terminus mit Syntaxin postuliert (Evans et al 2001). Die Bindung von G β wird der C-terminalen Hälfte des CSP-Proteins zugeschrieben. Eine Störung der Interaktion dieser Proteine durch die Antikörperbindung bei der Immunpräzipitation ist vorstellbar (Abb 4.2). Der Nachweis von Syntaxin als ein mit CSP interagierendes Protein gelang in zwei Fällen. Eindeutig wurde es in der Rescueline *lcDNA1;U1* nachgewiesen (Abb 4.21). Dies gelang nochmals in einem unabhängigen Experiment. Dieser Nachweis zeigt eine sehr schwache Syntaxin-Doppelbande, die erst nach längerer Inkubation sichtbar wird, aber eindeutig keinen Hintergrundartefakt darstellt. Die anderen untersuchten Linien zeigten keine nachweisbare Interaktion mit Syntaxin. Aufgrund der geringen Interaktionsstöchiometrie von 1:20 bis 1:100 (Evans et al 2001) ist eine Präzipitation auch mit dem wildtypischen Protein nicht 100%ig reproduzierbar. Obwohl die nachzuweisende Menge an Syntaxin und CSP im Überstand auszureichen scheint, kann eine Interaktion nicht zuverlässig nachgewiesen werden. Die tatsächlichen Proteinmengen sind mithilfe des Western Blots nicht eindeutig bestimmbar, schwächere Signale können auftauchen und vertuschen einen dennoch hohen Proteinanteil, wie von O'Callaghan et al (1999) beschrieben wurde. Mithilfe des gegenwärtigen Versuchsprotokolls ist keine abschließende Aussage über die eventuelle Interaktion von Syntaxin und den mutierten Isoformen möglich. Die bereits erwähnte Phosphorylierung des Serins an Position 10 im Vertebraten-CSP durch PKA vermindert die Bindungsaffinität an Syntaxin um ein 10-faches. Die Spekulation liegt nahe, dass CSP durch die Phosphorylierung am N-Terminus vorher gebundenes Syntaxin freigibt. Dies geschieht in einem der letzten Schritte der Exozytose (Evans et al 2001). Übereinstimmend mit diesen neueren Ergebnissen ist auch die Tatsache, dass sich Effekte der Überexpressionen der Proteine CSP und Syntaxin in einer Fliege aufheben und sozusagen wegtitrieren (Nie et al 1999). Die Frage ob die mutierten CSP-Isoformen diese Aufgabe immer noch erfüllen können bleibt hier ungelöst. Es bestehen mehrere Möglichkeiten diese Frage zu klären. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der Hefestamm HF7c die mutierten CSP-Isoformen exprimiert. Durch andere sekundäre Modifikationen im Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* und der zwingenden Voraussetzung, dass beide rekombinanten Proteine in den Kern transportiert werden, kann unter Umständen eine Interaktion bewiesen werden, die nicht durch den quantitativen Aspekt beeinflusst wird. Direkte Interaktionen sollten sich, durch die Blaufärbung der fusionierten

Zellen, die CSP und Syntaxin codierende und exprimierende Konstrukte tragen in Hefen nachweisen lassen. Zellkultursysteme mit Insektenzelllinien können ebenfalls mit eukaryotischen Expressionsvektoren transient oder stabil transfiziert werden und die Proteine durch Sequenztags wie GFP/YFP/RFP, myc oder GST markiert werden. So können Interaktionen innerhalb der Zelle oder nach Isolation der Proteine untersucht werden. Interaktionen zwischen CSP und den anderen oben aufgeführten Proteinen wurden nicht untersucht. Ein allgemeiner Yeast-two hybrid Screen mit den unterschiedlichen CSP-Isoformen könnte durchgeführt werden. So wurde bereits mit der DnaJ-Domäne des Vertebraten CSPs das Hsc70 Protein als Interaktionspartner bestätigt (Stahl et al 1999), ebenso konnte auf diesem Wege das SGT-Protein als interagierendes Protein für das CSP-Protein, ausschließlich der DnaJ-Domäne, beschrieben werden (Tobaben et al 2001). Die beschriebenen Interaktionen zwischen CSP und Syntaxin sind sehr kontrovers (siehe Einleitung 1.4.2). Die Interaktionen zwischen CSP und der Synprint Site sind ebenfalls kritisch zu betrachten. Denkbar ist aufgrund der bisherigen Erkenntnisse eine Interaktion von CSP und Syntaxin über die β -Untereinheit des G-Proteins. Im selben Licht ist möglicherweise auch die Interaktion mit den Ca^{2+} -Kanäle zu betrachten.

5.2. Räumlich und zeitlich kontrollierter Verlust der CSP-Funktion in *D. melanogaster*

Der Wunsch nach einer räumlich und zeitlich kontrollierbaren Funktion des Cysteine String Proteins konnte in dieser Arbeit nicht erfüllt werden. Die Idee, durch gewebsspezifische Deletion des transgenen CSPs in der CSP-Nullmutante einen Organismus zu erhalten, in dem wildtypische und mutante Zellen nebeneinander analysiert werden können, schlug fehl. Die fehlende Funktion des CSP-Proteins in der Synapse führt zur Veränderung der induzierten Exozytose, die bei erhöhter Temperatur vollständig ausbleibt und so zu einem Block der synaptischen Transmission führt. Spontane Fusionen von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran sind nicht gestört und äußern sich in messbaren Miniaturpotentialen. Die gezielte Lahmlegung von Gehirnstrukturen durch die fehlende Funktion von CSP bei erhöhter Temperatur hätte genauere Information über die betroffenen Neurone liefern können. Ein anderes System ebenfalls mithilfe eines temperatursensitiven synaptischen Proteins war in dieser Hinsicht erfolgreicher. Durch die Verwendung einer temperatursensitiven Variante des für Dynamin kodierenden *shibire*-Allels wird hier die

Endozytose reversibel unterbunden und somit ebenfalls die synaptische Aktivität verändert. (Kitamoto 2001). Dieser erfolgreiche Ansatz konnte am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie in Würzburg auf das olfaktorische Lernen übertragen werden (M. Schwärzel, persönliche Mitteilung). Ein anderer Weg, die Funktion von Neuronen zu unterbinden, ist die Expression von Toxinen, zum Beispiel des Tetanus Toxins. Dies führt zur enzymatischen Spaltung von Synaptobrevin und ist nicht reversibel (Sweeney et al 1995). Auch mithilfe dieser Methode konnte in Würzburg erfolgreich die Veränderung im Verhalten der Fliegen analysiert werden (Keller 2002; Martin et al 2002). Bei all diesen Methoden ist zu berücksichtigen, dass nur chemische Synapsen ausgeschaltet werden können.

Die Ursache einer fehlenden messbaren Veränderung des CSP Verlustes aufgrund von Flippase medierter Rekombination ist nach Betrachtung folgender Beobachtungen erkennbar. Die meisten gängigen FRT-Vektoren entstammen den von Golic und Lindquist (1989) entworfenen und benutzten Vektoren, die größere Fragmente direkt aus dem 2µm Plasmid enthalten (Urvektor pMMD2; McLeod et al 1984) und die Anfänge dieser Methode bildeten. Die in diesem Ansatz verwendeten Sequenzen der FRT-sites wurden in der Flybase als minimale FRT-sites beschrieben (Buenzow und Holmgren 1995). Die zitierten Autoren benutzen für die Klonierung ihres FRT-Vektors Sequenzen von L. Wood und zitieren Senecoff et al (1985). Die angegebene Sequenz taucht jedoch nicht in der Liste der von Senecoff überprüften FRT-sites auf. Allerdings bestehen große Ähnlichkeiten die 5'- und 3'-Enden betreffend in den Plasmiden pJFS33r und pJFS31b, welche beide sehr gute Rekombinationsfrequenzen aufwiesen.

In einem neueren Bericht von Bender und Hudson (2000) benutzten diese für die Klonierung eines eigenen 2x FRT-Vektors die reduzierte FRT-site aus dem pJFS 36 Plasmid von Senecoff et al (1985):

pJFS36

CCGAAGTTCCTATTCCTAGAAAATATAGGAACTTC

und erzielten mit diesem Fragment erfolgreiche Rekombinationen. Es herrscht dennoch in Kreisen von Hefeexperten eine lebhaft Diskussions über die Effizienz der Rekombinationen, die auch durch die flankierenden Sequenzen beeinflusst werden (Storici 1998). Es ist daher denkbar, dass die gewählte FRT-site aufgrund ihrer reduzierten Länge von der Flippase nicht effizient erkannt werden konnte. Die Sequenz und die Lage der FRT-sites wurde nach der Klonierung überprüft, daher kann ein Fehler in der Sequenz und der Orientierung ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit einer nicht ausreichenden Flippase-Expression wurde in einer Kontrollkreuzung überprüft, die eindeutig ausreichend Flippaseaktivität zeigt

(Abb 4.33). Die Rekombinationshäufigkeit hängt auch sehr von der Lokalisation des P-Elementes ab. Modifikationen der FRT-sites auf DNA-Ebene, zum Beispiel bei Insertion in nicht oder kaum transkribiertem Chromatin, können zu einer sterischen Behinderung zwischen Zielsequenz und Enzym führen und so Rekombinationsereignisse unterdrücken. Daher wurden mehrere unabhängige Transformanten für die Untersuchungen verwendet. Die Analyse der gekreuzten GUF-Linien mit den FRT-P-Element tragenden Linien erfolgte immunhistochemisch und verhaltensanalytisch. Nimmt man eine sehr geringe Rekombinationshäufigkeit an, ist diese möglicherweise in der Immunhistochemie nicht sichtbar, da die Färbung der CSP-exprimierenden Neuronen die defizienten Neurone überdecken können. Ist dies der Fall, kann auch die verhaltensanalytische Untersuchung keine Veränderungen im Verhalten beschreiben, da die Funktion der ausgefallenen Neurone von den intakten übernommen wird. Eine tiefergehende verhaltensanalytische Charakterisierung wurde nicht durchgeführt, da dieser Versuchsansatz nur dann von Bedeutung ist, wenn die phänotypischen Unterschiede nahezu auf den ersten Blick in einem einfachen Experiment zu erkennen sind. Durch das in den Abbildungen 4.35 und 4.36 beschriebene PCR-Experiment konnte der Verdacht bestätigt werden, dass es zu keiner Rekombination in den untersuchten Fliegen kommt und somit in der Immunhistochemie und in der Verhaltensanalyse keine vom Wildtyp abweichenden Ergebnisse zu erwarten sind. Wäre die Rekombination mit dem hier verwendeten Konstrukt in postmitotischen Zellen erfolgreich gewesen, dann hätte möglicherweise der entstandene DNA-Ring immer noch als Matrize der CSP-Expression dienen können, wie von Ahmad und Golic (1996) beobachtet wurde, und so die erwarteten Effekte maskiert.

Bei einer neuerlichen Klonierung eines 2xFRT-Vektors mit der FRT-site des pJFS36 sollte daher eine der beiden FTR-sites so in den kodierenden Bereich des *Csp*-Gens eingebracht werden, dass bei der Rekombination kein funktionelles Gen erhalten bleibt. Ein weiteres Problem der gegenwärtigen Ansätze zur zellspezifischen Gen-Ausschaltung durch ortsspezifische Rekombination ist die Tatsache, dass eine hohe Rekombinationsrate in der Regel nur während der Mitose erreicht wird und somit Zellverbände, die unterschiedliche ontogenetische Stammbäume besitzen, nicht selektiv manipuliert werden können (Keller 2002).

5.3. Der *Csp*-Genlokus 79 D3-4

„Genomics“ und „Proteomics“ sind richtungsweisende Begriffe der modernen Molekularbiologie. Nach der Sequenzierung kompletter Genome zum Beispiel von *Drosophila melanogaster* und des Menschen stellt sich nun die Frage nach der Funktion der einzelnen Gene. Durch die Analyse der differentiellen Gen-Expression auf mRNA-Ebene durch DNA-Chips und dem quantitativen Nachweis der Proteine auf 2-D-Gelen erhält man aus dem Vergleich von normalen und gezielt oder krankhaft veränderten Tieren einen weitgefächerten Überblick der Interaktionen innerhalb der untersuchten Zelle oder eines Gewebes. So ist es möglich Proteine und Gene zu finden, welche beispielsweise in Mutanten oder auch in Tumorzellen in ihrer Expression verändert sind. Mit einem solchen Ansatz wird gegenwärtig versucht, ein Zielprotein des Hsc70/CSP/SGT Chaperons zu identifizieren. Die genetischen Datenbanken erlauben jedoch auch die „*in silico*“ Analyse der Umgebung eines Gens.

Der *Csp*-Genlokus erschien bis vor kurzem nicht weiter kompliziert zu sein. Nur ein Gen in unmittelbarer Nähe zum *Drosophila-Csp* war bekannt und wurde bereits in früheren Veröffentlichung im Northern Blot nachgewiesen (Zinsmaier et al 1994; Fig 2). In einer Analyse des DEAD-Box-Proteins von *Drosophila* zeigt sich in einem Northern Blot ein Signal, welches der Expression des *Ddx1*-Gens zugeordnet wurde (Rafti et al 1996), tatsächlich aber aufgrund unserer Daten offenbar das Transkript des Gens CG11523 darstellt. Die Erkenntnis, dass durch die Deletion in der Nullmutante *CspU1* nicht nur das Gen von Interesse eliminiert wird, sondern möglicherweise auch noch mindestens ein weiteres Gen davon betroffen ist, erleichtert die Analyse der unterschiedlichen CSP-Mutanten nicht. Aus diesem Grund wurde von Christian Leibold der Versuch unternommen, durch eine „Jump-out“-Mutagenese eine neue nur das *Csp* betreffende Mutante zu erzeugen.

Wie der Northern Blot in Abb. 4.42 A zeigt, scheint das Gen CG11523 stromaufwärts in seiner Expression in den verfügbaren Mutanten *CspU1^r*, *CspU1^w*, *Csp^{K16}* und *Csp^{P1}* nicht beeinflusst zu sein. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hat der „jump-out“ des des P-Elementrestes, der durch die hitze-induzierte Rekombination zwischen den P-Elementen P318/17 und P478/16 zustande kam und in der Mutante *CspU1^r* die rote Augenfarbe verursacht, weitere angrenzende Sequenzen eliminiert (Daten nicht gezeigt), was jedoch in der weißäugigen Nullmutante *CspU1^w* zu keiner beobachtbaren Veränderung des Phänotyps führt (Gruhn 1995; 4.3; Eberle et al 1998). Regulatorische SQUENZEN des CG11523-Gens

liegen in diesem Fall möglicherweise stromabwärts des Gens auf dem Gegenstrang des *Ddx1*-Gens. Das zweite Mitglied dieser Genfamilie auf dem zweiten Chromosom in der Region 55C ersetzt oder komplettiert unter Umständen die Funktion des Gens CG11523, sollte dies in seiner Expression eingeschränkt sein. Diese Spekulation, die durch den Northern Blot nicht gestützt wird, wurde nicht nachgegangen, da in den neuen *Csp*-spezifischen Mutanten keine offensichtlichen phänotypischen Unterschiede zusätzlich zu den bekannten CSP-Nullphänotypen zu erkennen sind.

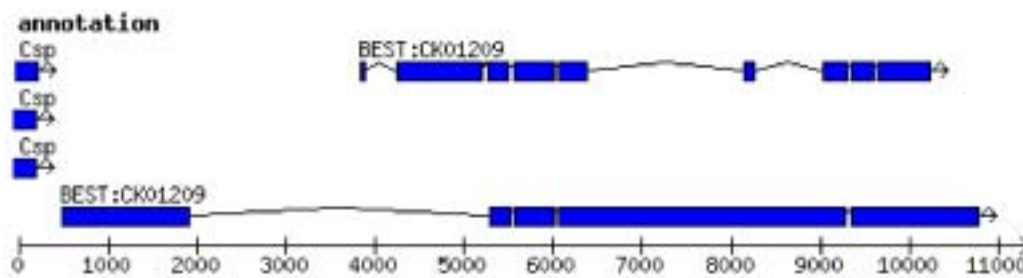


Abb. 5.1 Schematische Darstellung der unterschiedlich gespleißten Transkripte des Gens CG11489, entnommen der Internetseite: http://www.fruitfly.org/cgi-bin/annot/batch.pl?gene_view_display=collapse+data&submit=Redraw&datatype=annotation&format=detail&extend=&sessionid=29500&qtype=batch&qid=CG11489&qid=CG11489. Gezeigt sind die putativen Exons des Gens.

Die vom CG11489-Gen kodierte Serine/Threoninkinase stromabwärts von *Csp* müsste aufgrund der Deletion in der CSP-Nullmutante *CspU1* verändert sein (Transkriptionsstart und Teile des ersten Exons sind betroffen; Abb 5.1). Die zwei in der Datenbank beschriebenen Transkripte von 3,2 und 6,7 kb konnten im Northern Blot in keiner der untersuchten Linien nachgewiesen werden, nur ein Signal von ca. 4,2 kb erscheint in der Abb. 4.42 B schwach. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um das kürzere Transkript dessen alternativer Transkriptionsstart durch die Deletion nicht betroffen ist, ähnlich dem kürzeren Transkript der Datenbank (Abb 5.1).

Es ist kein Unterschied zwischen den beiden Mutanten *CspU1* und *Csp^{K16}* zu erkennen, in letzterer Mutante ist der Sequenzbereich des Gens CG11489 nicht betroffen. Auch die P-Insertion in diesem Bereich hat auf den ersten Blick keinen Einfluss auf die Expression dieses Gens. Nur eines der Transkripte konnte schwach nachgewiesen werden. Daher ist nicht geklärt, ob die in der Datenbank beschriebenen zwei erheblich unterschiedlich langen mRNAs in adulten Tieren exprimiert werden. Die Menge an isolierter mRNA könnte zu gering gewesen sein, als dass eventuell geringe Mengen des zweiten Transkripts nachgewiesen

werden konnten. Eine andere Möglichkeit, die der Degradation der beiden Transkripte von 3,2 und 6,7 kb ist ebenso zu erwägen. Die Angaben über die Sequenz des als Sonde verwendeten EST-Klons GH08190 konnten nur teilweise mit der vorliegenden *Csp*-Sequenz in Einklang gebracht werden. Das 5'-Ende des Klons stellt eindeutig das 5'-Ende des längeren Transkripts dar (Abb. 5.1 und Anhang A6), wohingegen des 3'-Ende anfangs nicht zugeordnet werden konnte. Erst nach längerem Suchen in einem Bereich der Sequenz 12 kb stromabwärts von *Csp* konnte die korrespondierende Sequenz gefunden werden, die in beiden Transkripten enthalten ist. Die fehlende Auswirkung des Verlustes mindestens eines Transkriptes könnte durch die Funktionalität der anderen Transkripte aufgehoben werden, so dass sich keine beobachtbaren Effekte dieses Teilverlustes im CSP-Nullphänotyp äußern.

Die nun bekannte genomische Situation in der Region des *Csp*-Lokus (Abb. 5.2) führte zu dem Versuch, eine neue nur das *Csp*-Gen betreffende Nullmutante zu erzeugen. Anhand der Ergebnisse dieser Experimente (Leibold in Vorbereitung) scheinen die umliegenden Gene CG11523 und die Serine/Threoninkinase CG11489 keine offensichtlichen additiven Effekte zum beschriebenen CSP-Nullphänotyp beizutragen. Daher sind die getroffenen Aussagen über die untersuchten Mutanten in dem Bewusstsein zu betrachten, dass eventuelle schwache sekundäre Effekte vorhanden sein können, die an den dem CSP-Protein zugeschriebenen deutlichen Phänotypen allerdings nichts ändern.

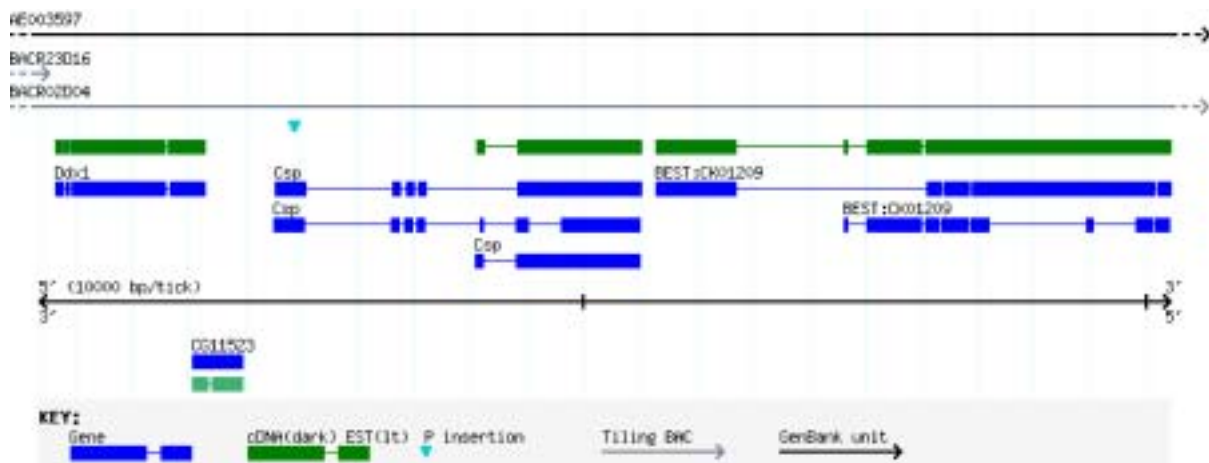


Abb 5.2 Schematische Darstellung des Abschnitts 79 D auf dem dritten Chromosom von *Drosophila melanogaster*, entnommen der Internetseite: <http://www.fruitfly.org/cgi-bin/annot/gbrowse>. Dargestellt sind die Gene in blau und die durch EST-Klone belegten cDNAs in grün.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Exozytose von Neurotransmittern und Peptiden während der Verarbeitung und Weiterleitung von Reizen im Nervensystem wird durch eine komplexe Maschinerie von Proteinen reguliert. Das konservierte Cysteine String Protein (CSP), das gebunden an synaptische und andere sekretorische Vesikel vorliegt, konnte in den vergangenen Jahren als Teil in diesen Prozess eingeordnet werden. Die Frage nach der genauen Funktion von CSP während der Exozytose ist allerdings weiterhin offen. CSP-Nullmutanten in *Drosophila melanogaster* zeigen temperatursensitive Paralyse und eine extrem verkürzte Lebenserwartung, gepaart mit verminderter Fertilität. In larvalen Nerv-Muskel Präparaten kommt es bei Temperaturen über 29°C zu einem reversiblen Block der elektrophysiologisch messbaren synaptischen Transmission. Die Primärstruktur des Cysteine String Proteins kann in folgende konservierte Sequenzabschnitte unterteilt werden: eine N-terminale Protein Kinase A Phosphorylierungsstelle, eine Region mit Homologie zu einer charakteristischen Domäne von DnaJ-Proteinen (DnaJ-Domäne), einen als Linkerregion bezeichneten Abschnitt, eine cysteinreiche Sequenz, die bei *Drosophila* aus dem namensgebenden Strang von 11 aufeinanderfolgenden Cysteinen flankiert von 2 Cysteinpaaren besteht, und einen schwächer konservierten C-Terminus, in dem sich auch einzelne Spleißvarianten unterscheiden. Versuche mit Vertebraten konnten zeigen, dass CSP in einem trimeren Komplex aus Hsc70/CSP/SGT vorkommt und bei der Exozytose wahrscheinlich als molekulares Co-Chaperon wirkt. Der Cysteinstrang liegt mehrfach palmyliert vor und ist für die Zielfindung des Proteins zur Vesikelmembran essentiell. In vorangegangenen Arbeiten wurde begonnen, bei *Drosophila* durch gezielte Mutagenese und Keimbahntransformation die Rolle des Cysteinstrangs, der Linkerregion und des C-Terminus für die Funktion des CSP zu analysieren.

In der vorliegenden Dissertation wurden in transgenen Fliegen die Eigenschaften von Isoformen mit vier unterschiedlich mutierten Varianten des Cysteinstrangs (CSLP, SCSP, CLP, SSP) und je Deletionen in der Linkerregion (L Δ 8) und im C-terminalen Bereich (C Δ 27) charakterisiert. Die subzelluläre Verteilung und veränderte Membranbindungseigenschaften dieser Proteine wurden mithilfe von Membranfraktionierung und Glycerindichtegradienten von Homogenaten der transgenen Mutanten aufgezeigt. Die Isoformen CLP und SSP sind aufgrund der fehlenden Palmylierung nicht an die Membran der synaptischen Vesikel

gebunden, während die Isoform CSLP sowohl in der Vesikelmembranfraktion als auch als lösliches Protein nachgewiesen werden kann. Die flankierenden Cysteinpaare und die verbliebenen Cysteine in den Isoformen CSLP und SCSP erfüllen offenbar noch teilweise die Aufgabe des Cysteinstrangs bei der Zielfindung der Proteine. Eine Depalmitoylierung mit Hydroxylamin löst das verkürzte SCSP Protein ebensowenig aus der Membran wie das intakte CSP. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen im Einklang mit immunhistochemischen Befunden. Die Deletion bzw. Substitution der zentralen 11 Cysteine in den Isoformen CSLP, CLP und SSP äußert sich in den transgenen Fliegen in einer gleichmäßigeren Verteilung der Proteine, die nicht mehr wie im Wildtyp auf das synaptische Neuropil beschränkt ist. Keine der Isoformen mit verändertem Cysteinstrang ist in der Lage die Funktion des wildtypischen CSP zu übernehmen, da die adulten transgenen Fliegen den temperatursensitiven Phänotyp und eine kurze Lebensdauer ähnlich den *Csp*-Nullmutanten zeigen. Die Proteinisoformen LΔ8 und CΔ27 dagegen lassen in den biochemischen Analysen keine Abweichung vom Wildtyp erkennen und weisen auch eine wildtypische Verteilung in Kryostat-Gehirnschnitten auf. Die Deletion in der Linkerregion in der Isoform LΔ8 scheint die Funktion des CSPs allerdings einzuschränken, da die entsprechenden transgenen Fliegen bereits bei 38°C, wildtypische Tiere dagegen erst bei 40°C paralisieren. Die in der Literatur beschriebene Interaktion zwischen *Drosophila* CSP und Syntaxin konnte für die transgen exprimierte größte CSP Isoform CSP1 in Immunpräzipitationsexperimenten mit *Drosophila*-Kopfhomogenat bestätigt werden. Die Frage nach einer Interaktion zwischen Syntaxin und den anderen untersuchten mutierten CSP-Isoformen bleibt dagegen offen.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Versuch, mithilfe des UAS/Gal₄- und des Flippase/FRT -Systems die CSP-Expression räumlich und zeitlich zu kontrollieren. Dazu wurde aufgrund von Datenbankangaben eine minimale FRT-Sequenz aus Oligonukleotiden mit entsprechenden Linkern konstruiert. Das gesamte *Csp*-Gen beziehungsweise die *Csp* cDNA1 einschließlich der regulatorischen Sequenzen wurde zwischen zwei gleichgerichteten FRT-Sequenzen pW8 eingebracht. Die Keimbahntransformation führte zu mehreren transgenen Fliegenlinien. Nach aufwendigen Kreuzungen mit Gal₄-, UAS-Flippase- und *Csp*-Null-Linien entstanden Fliegen im CSP-Nullhintergrund, welche eine durch die verwendete Gal₄-Linie definierte Expression von Flippase zeigten und das FRT-Konstrukt trugen. Diese Fliegen sollten in Flippase positiven Bereichen keine CSP-Expression mehr zeigen.

Verhaltensanalysen an solchen Tieren bei normaler und erhöhter Temperatur könnten dann Aufschluss über die Funktion der Zellen ohne CSP-Expression geben. Leider konnten die erwarteten Veränderungen in der CSP-Expression nicht beobachtet werden, obwohl alle

Konstrukte sich nach einer Überprüfung als intakt erwiesen haben. Die Ursache für die fehlende Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen ist möglicherweise in einer zu geringen Länge dieser Zielsequenz der Flippase zu suchen.

Im dritten Abschnitt der Arbeit wird der *Csp*-Genlocus und seine benachbarten Gene vorgestellt, und die möglichen Auswirkungen der Deletionen in den zur Verfügung stehenden Mutanten *Csp^{UI}*, *Csp^{UI^w}* und *Csp^{K16}* diskutiert. Aufgrund der Daten aus dem *Drosophila* Genomprojekt lag die Spekulation nahe, dass der Phänotyp der Deletionsmutanten auch durch eine veränderte Expression der benachbarten Gene stromab- und stromaufwärts des *Csp* Gens beeinflusst werden könnte. Die Auswertung eines Northern Blots von PolyA⁺-RNA adulter Fliegen, sowie einfache Verhaltenstests an vorliegenden und neu generierten CSP-Nullmutanten konnten diesen Verdacht allerdings nicht bestätigen.

SUMMARY

Exocytosis during synaptic transmission is regulated by a complex machinery of numerous proteins. CSPs (cysteine string proteins), conserved from *C.elegans* to mammals, are attached to synaptic vesicle membranes and other secretory granules. They were therefore implicated to play a distinct part in this regulated process. However the exact role of the CSP protein in exocytosis is not yet known. Studies of *Drosophila* in null mutants for the *Csp* gene revealed a temperature sensitive paralytic phenotype, severely shortened lifespan and fertility. Exposure of larval nerve-muscle preparations to elevated temperatures (>29°C) lead to a reversible block of neurotransmitter release in electrophysiological measurements. The primary structure of the cysteine string protein is characterized by distinct conserved domains: a N-terminal protein kinase A (PKA) phosphorylation site, a region showing high homology to a domain found in DnaJ proteins (DnaJ-domain), a region called linker domain, a cysteine rich region, which in *Drosophila* comprises the characteristic string of 11 cysteines flanked by two additional pairs of cysteines, and a less conserved C-terminal region, which is absent in various splice variants. Experiments using vertebrates showed that CSP is part of a trimeric complex of Hsc70/CSP/SGT and may possibly act as co-chaperone during exocytotic processes. The cysteine string is found to be modified with multiple palmitoyl residues and appears to be essential for targeting of the protein to the vesicle membrane. In earlier studies mutagenesis and germ-line transformation were used to initiate an analysis on the role of the

cysteine string, the linker domain and C-terminal region for CSP function.

The present thesis extends this work by characterizing in transgenic flies four different mutated cysteine string isoforms (CSLP, SCSP, CLP, SSP) and deletions affecting the linker domain (L Δ 8) and C-terminal region (C Δ 27) using transgenic flies. The subcellular distribution and altered membrane binding properties of the mutated isoforms were analyzed using glycerol gradients and membrane fractionation. Due to the lack of palmitoylation CLP and SSP are exclusively found as soluble proteins in the cytosol whereas CSLP can also be found attached to vesicle membranes in membrane fractions. The flanking and remaining cysteines in the isoforms CSLP and SCSP apparently are able to partially direct the proteins to the membrane. The shortened cysteine string in SCSP is sufficient to induce membrane binding and is as resistant to depalmitoylation with hydroxylamine as wildtype CSP. The biochemical results correspond to the immunohistochemical findings, which show an almost homogenous distribution of the proteins CSLP, CLP and SSP, unlike the wildtype staining which is confined to neuropil regions in the adult brain. The mutant isoforms with deleted or substituted cysteine string do neither rescue the temperature sensitive phenotype nor the short life span observed in CSP-null mutants. In contrast the proteins L Δ 8 and C Δ 27 exhibit wildtype properties in the biochemical assays and the staining pattern of the adult brain. The deletion L Δ 8 seems to interfere with regular CSP function in some way, as these transgenic flies paralyze at 38°C whereas wildtype flies paralyze at 40°C. The previously described interaction of CSP and syntaxin in *Drosophila* could be confirmed by precipitating syntaxin together with the largest CSP isoform CSP1 from *Drosophila* head homogenates using an antibody against CSP. A possible disruption of this interaction in the mutant transgenic flies could not be shown and remains to be investigated.

The second part of this work describes the attempt to temporally and spatially regulate CSP expression by employing the UAS/Gal₄- and flippase/FRT-system. Using database information a minimal FRT-sequence with appropriate linkers was generated from oligonucleotides. The entire *Csp* gene or *Csp* cDNA1 with necessary regulatory sequences was ligated between two FRT sites and inserted into the transformation vector pW8. After extensive crossing of transgenic flies carrying the FRT-construct with Gal₄-, UAS-flippase-, and *Csp*-null-lines flies were obtained which expressed the flippase in defined areas of Gal₄ expression and contained the FRT construct, all in *Csp*-null background. Areas positive for flippase expression should lose transgenic CSP expression. Behavioural analysis of these flies at normal and elevated temperatures should provide functional information on the cells lacking CSP. Unfortunately no differences in behaviour or staining pattern of adult brain

could be detected, although all constructs were proven to be functional. The lack of recombination events might be due to the reduced length of the flippase target sequence used. The third project presents the *Csp*-locus and its neighbouring genes in *Drosophila*. The possible influence of deletions in the CSP null mutants CspU1, CspU1^w and Csp^{K16} on the expression of neighbouring genes are discussed. Based on sequence data offered by the *Drosophila* genome project it was speculated that these genes might influence the mutant phenotype. Northern blotting of adult head polyA⁺-RNA, simple tests of behaviour of already known and newly generated *Csp* null mutants could not confirm this speculation.

7. LITERATUR

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. **2000.** *The genome sequence of Drosophila melanogaster.* Science 287(5461):2185-95.

Ahmad K, Golic KG. **1996.** *Somatic reversion of chromosomal position effects in Drosophila melanogaster.* Genetics 144(2):657-70.

Altshuler D, Pollara VJ, Cowles CR, Van Etten WJ, Baldwin J, Linton L, Lander ES. **2000.** *An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing.* Nature 407(6803):513-6

Arnold Ch; **1999.** *Das Cysteine string protein in Drosophila melanogaster: Mutagenese des X-Chromosoms zur Isolierung von Interaktionspartnern. Analyse der Regulationsmutante csp^{U2} und Funktionsanalyse des Cystein Strings des Cystein-Sting Proteins.* Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius Maximilians-Universität Würzburg

Bender W, Hudson A; **2000.** *P Element homing to the drosophila bithorax complex.* Development 127:3981-3992

Benzer S: The 8C3 anti-syntaxin antibody developed by S:Benzer's lab was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242.

Bezprozvanny I, Zhong P, Scheller RH, Tsien RW. **2000.** *Molecular determinants of the functional interaction between syntaxin and N-type Ca²⁺ channel gating.* PNAS 97(25):13943-8.

Blackmer T; Larsen EC, Takahashi M, Martin TFJ, Alford S, Hamm HE. **2001.** *G protein β subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytotic fusion downstream of Ca²⁺ entry.* Science 292: 293-297

Birnboim HC, Doly J; **1979.** *A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucl. Acids Res. 7:1513-1522

Brand AH and Perrimon N. **1993.** *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.* Development 118: 401-415

Braun JE, Wilbanks SM, Scheller RH. **1996.** *The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase.* JBC 271(42):25989-93

Bronk P, Wenniger JJ, Dawson-Scully K, Guo X, Hong S, Atwood HL Zinsmaier KE. **2001.** *Drosophila Hsc70-4 is critical for neurotransmitter exocytosis in vivo.* Neuron 30: 475-488

Brown H, Larsson O, Bränström R, Yang SN, Leibiger B, Leibiger I, Fried G, Moede T, Deeney JT, Brown GR, Jacobsson G, Rhodes CJ, Braun JEA, Scheller RH, Corkey BE, Berggren PO Meister B. **1998.** *Cysteine string protein (CSP) is an insulin secretory granule associated protein regulating β -cell exocytosis.* EMBO 17(17): 5048-5058

Buchner E, Buchner S, Crawford G, Mason WT, Salvaterra PM, Satelle DB; **1986.** *Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of Drosophila melanogaster.* Cell Tissue Research 246:57-62

Buchner E, Gundersen CB. **1997.** *The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release.* TINS 20(65): 223-227

Buenzow DE; Holmgren R; **1995.** *Expression of the drosophila gooseberry locus defines a subset of neuroblast lineages in the central nervous system.* Dev.Biol 170:338-349

Chamberlain LH, Burgoyne RD. **1996.** *Identification of a novel cysteine string protein variant and expression of cysteine string proteins in non-neuronal cells.* JBC 271(13): 7320-7323

Chamberlain LH, Burgoyne RD. **1997a.** *Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine string protein.* Biochemical Journal 322: 853-858

Chamberlain LH, Burgoyne RD. **1997b.** *The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins.* JBC 272(50): 31420-31426

- Chamberlain LH, Burgoyne RD. **1998a**. *Cysteine string gprotein functions directly in regulated exocytosis*. *Molecular Biology of the cell* 9: 2259-2267
- Chamberlain LH, Burgoyne RD. **1998b**. *The cysteine string domain of the secretory vesicle cysteine string protein is required for membrane targeting*. *Biochemical Journal* 335: 205-209
- Chamberlain LH, Burgoyne RD. **2000**. *Cysteine string protein: the chaperone at the synapse*. *Journal of Neurochemistry* 74: 1781-1789
- Chamberlain LH, Graham ME, Kane S, Jackson JL, Maier VH, Burgoyne RD, Gould GW. **2000**. *The synaptic vesicle protein, cysteine string protein, is associated with the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes and interacts with syntaxin 4*. *Journal of Cell Science* 114(2): 445-455
- Chen S, Zheng CX, Schulze KL, Morris T, Bellen H, Stanley EF. **2002**. *Enhancement of presynaptic calcium current by cysteine string protein*. *Journal of Physiology* 538.2: 383-389
- Cordeiro ML, Umbach JA, Gundersen CB. **2000**. *Lithium ions enhance cysteine string protein expression in vivo and in vitro*. *Journal of Neurochemistry* 74:2365-2372
- Dawson-Scully K, Bronk P, Atwood HL, Zinsmaier KE. **2000**. *Cysteine string protein increases the calcium sensitivity of neurotransmitter exocytosis in Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 20(16):6039-6047
- Degtiar VE, Scheller RH, Tsien RW. **2000**. *Syntaxin modulation of slow inactivation of N-type calcium channel*. *Journal of Neuroscience* 20(12): 4355-4367
- Dunphy JT; Linder ME. **1998**. Signalling functions of protein palmitoylation. *BBA* 1436: 245-261
- Eberle K; **1995**. *Mutagenese und Funktionsanalyse des csp-Gens von Drosophila melanogaster*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius Maximilians-Universität Würzburg
- Eberle KK, Zinsmaier KE, Buchner S, Gruhn M, Jenni M, Arnold C, Leibold C, Reisch D; Walter N, Hafen E, Hofbauer A, Pflugfelder GO, Buchner E. **1998**. *Wide distribution of the cysteine string proteins in Drosophila tissues revealed by targeted mutagenesis*. *Cell Tissue Research* 294: 203-217
- El-Husseini Ael-D; Bredt DS; **2002**. *Protein Palmitoylation: a regulator of neuronal development and function*. *Nature Reviews Neuroscience* 3 (10):791-802
- Evans GJO; Wilkinson MC; Graham ME; Turner KM; Chamberlain LH; Burgoyne RD; Morgan A. **2001**. *Phosphorylation of cysteine string protein by Protein Kinase A- Implications for the modulation of exocytosis*. *JBC* 276 (61): 47877-47885
- Evans GJO, Morgan A. **2002**. *Phosphorylation dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagminI*. *Biochemical Journal* BJ2000020123

- Fatt P, Katz B. **1952**. *Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings*. J. Physiol. 117: 109-28
- Fernandez-Chacon R, Königstorfer A, Gerber SH, Garcia J; Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC. **2001**. *Syntaxin1 functions as a calcium regulator of release probability*. Nature 410: 41-49
- Golic KG; Lindquist S; **1989**. *The Flp Recombinase of Yeast Catalyzes Site-Specific Recombination in the Drosophila Genome*. Cell 59:499-508
- Gonzalo S, Greentree WK, Linder ME. **1999**. SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. JBC 274(30):21313-8.
- Gonzalo S, Linder ME. **1998** *SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway*. Mol Biol Cell 9(3):585-97.
- Graham ME, Burgoyne RD **2000**. *Comparison of cysteine string protein (Csp) and mutant α -SNAP overexpression reveals a role for csp in late steps of membrane fusion in dense-core granule exocytosis in adrenal chromaffin cells*. Journal of Neuroscience 20(4): 1281-1289
- Gruhn M; **1995**. *Elektrophysiologische Charakterisierung der Fliegenstämme csp^{K16} und $csp^{\Delta 16}$ von Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Gundersen CB, Umbach JA. **1992**. *Suppression cloning of the cDNA for a candidate subunit of a presynaptic calcium channel*. Neuron 9(3): 527-37
- Gundersen CB, Mastrogiacomo A, Gaull K, Umbach JA. **1994**. *Extensive lipidation of Torpedo cysteine string protein*. JBC 269(30):19197-9
- Gundersen CB, Umbach JA, Mastrogiacomo A. **1996**. *Cysteine string proteins: a cycle of acylation and deacylation?* Life Sciences 58(22): 2037-40
- Gundersen CB, Aguada F, Sou S, Mastrogiacomo A, Coppola T, Kornblum HI, Umbach JA. **2001**. *Cysteine string proteins are associated with cortical granules of Xenopus laevis oocytes*. Cell Tissue Research 303:211-219
- Hering S, Berjukow S, Sokolov S; Marksteiner R; Weiß RG, Kraus W, Timin EN. **2000**. *Molecular determinants of inactivation in voltage-gated Ca^{2+} channels*. Journal of Physiology 528.2: 237-249
- Jahn R, Grubmüller H. **2002**. *Membrane fusion*. Current Opinion on Cell Biology 14(4): 488
- Jarvis SE, Barr W, Feng ZP, Hamid J, Zamponi GW. **2002**. *Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels*. JBC 277(46):44399-407
- Jayaram M; **1985**. *Two micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences*. PNAS:82(17): 5875-9

- Keller A, Sweeney ST, Zars T, O'Kane CJ, Heisenberg M. **2002**. *Targeted expression of tetanus neurotoxin interferes with behavioral responses to sensory input in Drosophila*. J Neurobiol. 50(3):221-33.
- Kitamoto T. **2001**. *Conditional modification of behavior in Drosophila by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons*. J Neurobiol 47(2):81-92
- Klemenz et al; **1987**. *The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in Drosophila*. Nucleic Acids Research 15(10): 3947-...
- Kohan SA, Pesdatori M, Brecha NC, Mastrogiacomo A, Umbach JA, Gundersen CB. **1995**. *Cysteine string protein immunoreactivity in the nervous system and adrenal gland of the rat*, Journal of Neuroscience 15(9):6230-8
- Leveque C, Pupier S, Marqueze B, Geslin L, Kataoka M, Takahashi M, De Waard M, Seagar M. **1998**. *Interaction of cysteine string proteins with the α_1A subunit of the P/Q-type calcium channel*. JBC 273(22): 13488-13492
- Lin RC und Scheller RH. **2000**. *Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis*. Annu. Rev. Dev. Biol. 16: 19-49
- Lindsley DL und Zimm GG. **1992**. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press. New York
- Littleton JT, Bai J, Vyas B, Desai R, Baltus AE, Garment MB, Carlson SD, Ganetzky B, Chapman ER. **2001**. *Synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca^{2+} -triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo*. Journal of Neuroscience 21(5):1421-1433
- Loewen CA, Mackler JM, Reist NE. **2001**. *Drosophila synaptotagminI null mutants survive to early adulthood*. Genesis 31: 30-36
- Mackler JM, Reist NE. **2001**. *Mutations in the second C2 domain of synaptotagmin disrupt synaptic transmission at Drosophila neuromuscular junctions*. Journal of Comparative Neurobiology 436:4-16
- Magga JM; Jarvis SE; Arnot MI; Zamponi GW; Braun JEA **2000**. *Cysteine String protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels*. Neuron: 28:195-204
- Martin JR, Keller A, Sweeney ST. **2002**. *Targeted expression of tetanus toxin: a new tool to study the neurobiology of behavior*. Adv Genet. 47:1-47
- Mastrogiacomo A, Parsons SM, Zampighi GA, Jenden DH, Umbach JA, Gundersen CB. **1994**. *Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca^{2+} channels*. Science 263(5149) :981-2
- Mastrogiacomo A, Kohan SA, Whitelegge JP, Gundersen CB. **1998a**. *Intrinsic membrane association of Drosophila cysteine string proteins*. FEBS Letters 436(1): 85-91

- Mastrogiacomo A, Kornblum HI, Umbach JA, Gundersen CB. **1998b**. *A Xenopus cysteine string protein with a cysteine residue in the J domain*. BBA1401: 239-241
- McLeod M, Volkert F, Broach J. **1984**. *Components of the site-specific recombination system encoded by the yeast plasmid 2-micron circle*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 49:779-87
- Morales M, Ferrus A, Martinez-Padron M. **1999**. *Presynaptic calcium-channel currents in normal and csp mutant Drosophila peptidergic terminals*. European Journal of Neuroscience 11(5):1818-26
- Navarro-Lerida I; Alvarez-Barrientos A; Gavilanes F; Rodriguez-Crespo I. **2002**. *Distance-dependant cellular palmitoylation of de-novo-designed sequences and their translocation to plasma membrane subdomains*. JCS 115(15): 3119-30
- Nie Z, Ranjan R, Wenninger JJ, Hong SN, Bronk P, Zinsmeier KE. **1999**. *Overexpression of Cysteine-String Proteins in Drosophila reveals interactions with Syntaxin*. J. Neuroscience 19 (23): 10270-10279
- O'Callaghan JP, Imai H, Miller DB, Minter A. **1999**. *Quantitative immunoblots of proteins resolved from brain homogenates: underestimation of specific protein concentration and of treatment effects*. Analytical Biochemistry 274: 18-26
- Persson B, Argos P. **1994**. *Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments*. J Mol Biol 237(2):182-92.
- Persson B, Argos P; **1996**. *Topology prediction of membrane proteins*. Protein Sciences 5(2):363-71
- Phelbs CB and Brand AH. **1998**. *Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 System*. Methods: A companion to methods in Enzymology 14: 367-379
- Poage RE, Meriney SD, Gundersen CB, Umbach JA. **1999**. *Antibodies against cysteine string proteins inhibit evoked neurotransmitter release at Xenopus neuromuscular junctions*. Journal of Neuroscience 82: 50-59
- Prüfert K; **2001**. *Gezielte Mutagenese des Cystein-String Proteins in Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Rafti F, Scarvelis D, Lasko PF. **1996**. *A Drosophila melanogaster homologue of the human DEAD-box gene DDX1*. Gene 171(2):225-9
- Ranjan R, Bronk P, Zinsmaier KE. **1998**. *Cysteine string protein is required for calcium secretion coupling of evoked neurotransmission in Drosophila but nor for vesicle recycling*. Journal of Neuroscience 18(3): 956-964
- Rao SS; Stewart BA; Rivlin PK; Vilinsky I; Watson BO; Lang C; Boulianne G; Salpeter MM; Deitcher DL. **2001**. *Two distinct effects on neurotransmission in a temperature-sensitive SNAP-25 mutant*. EMBO 20 (23): 6761-6771

- Reim K, Mansour M, Varoquaux F, McMahon HT, Südhof TC, Brose N, Rosenmund C. **2001.** *Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release.* Cell 104: 71-81
- Resh MD. **1999.** *Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.* BBA 1451: 1-16
- Roth AF; Feng Y; Chen L; Davis NG. **2002** *The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase.* JCB 159(1):23-8
- Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T. **1989.** *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sautter K; **2000.** *Analyse von temperatursensitiven csp-und icicle-Mutanten bei Drosophila melanogaster.* Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Schwenkert I; **2002.** *Csp and its interaction partners - Coimmunoprecipitations from tissue and cell culture.* Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Senecoff JF; Bruckner RC; Cox MM; **1985.** *The Flp recombinase of the yeast 2- μ m plasmid: Characterization of its recombination site.* PNAS 82: 7270-7274
- Stahl B; Tobaben S, Südhof TC. **1999.** *Two distinct domains in hsc70 are essential for the interaction with the synaptic vesicle cysteine string protein.* Europ.J Cell Biology 78: 375-381
- Sakisaka T, Meerlo T, Matteson J, Plutner H, Balch WE. **2002.** *Rab- α GDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex.* EMBO 21(22): 6125-6135
- Storici F; **1998.** *Evidence for different DNA substrate function of the entire IR region and its FRT site during Flp-mediated recombination.* Yeast Genetics and Molecular Biology 1998 College Park, Maryland
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. **1998.** *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution.* Nature 395(6700):347-53
- Swayne LA, Blattler C, Kay JG, Braun JE. **2003.** *Oligomerization characteristics of cysteine string protein.* BBRC 300(4):921-6
- Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O'Kane CJ. **1995.** *Targeted expression of tetanus toxin light chain in Drosophila specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects.* Neuron 14(2):341-51.
- Tobaben S; Thaku P; Fernandez-Chacon R; Südhof TC; Rettig J; Stahl B. **2001.** *A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machinery.* Neuron 31: 987-999
- Umbach JA, Zinsmaier KE, Eberle KK, Buchner E, Benzer S, Gundersen CB. **1994.** *Presynaptic dysfunction in Drosophila csp mutants.* Neuron 13(4): 899-907

- Umbach JA, Gundersen CB. **1997**. *Evidence that cysteine string proteins regulate an early step in the Ca²⁺ dependant secretion of neurotransmitter at Drosophila neuromuscular junctions*. Journal of Neuroscience 17(19): 7203-9
- Umbach JA, Saitoe M, Kidokoro Y, Gundersen CB. **1998**. *Attenuated influx of calcium ions at nerve endings of csp and shibire mutant Drosophila*. Journal of Neuroscience 18(9): 3233-3240
- Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, Martin B, Greene LE, Eisenberg E. **1995**. *Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles*. Nature. 378(6557):632-5.
- Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE. **1997**. *Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide- and substrate-binding modules of Hsc70*. JBC 272(31):19594-600.
- van de Goor J, Ramaswami M, Kelly R. **1995**. *Redistribution of synaptic vesicles and their proteins in temperature-sensitive shibire(ts1) mutant Drosophila*. PNAS 92(12):5739-43
- van de Goor J; Kelly RB; **1996**. *Association of Drosophila cysteine string protein with membranes*. FEBS Letters 380: 251-256
- Voets R, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Südhof TC, Neher E. **2001**. *Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagminI*. PNAS 98(20):11680-11685
- Walch-Solimena C, Blasi J, Edelmann L, Chapman ER, von Mollard GR, Jahn R. **1995**. *The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling*. JCB 128:637-45
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TFJ, Chapman ER, Jackson MB. **2001**. *Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles*. Science 294:1111-1115
- Warrick JM, Paulson HL, Gray-Board, Bui QT, Fischbeck KH, Pittman RN, Bonini NM. **1998**. *Expanded Polyglutamine Protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in Drosophila*. Cell 93: 939-949
- Warrick JM, Chan HYE, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL Bonini NM. **1999**. *Suppression of polyglutamine mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70*. Nature genetics 23:425-428
- Wu MN, Fergestad T, Lloyd TE, He Y, Broadie K, Bellen HJ. **1999**. *Syntaxin 1A interacts with multiple exocytotic proteins to regulate neurotransmitter release in vivo*. Neuron 23: 593-605
- Wu SJ, Liu FH, Hu, SM Wang C. **2001**. *Different combinations of the heat-shock cognate protein C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat containing proteins*. Biochemical Journal 359: 419-426

- Zamponi GW. **2001**. *Determinants of G protein inhibition of presynaptic calcium channels*. Cell Biochem Biophys. 34(1):79-94. Review.
- Zhang H, Kelley WL, Chamberlain LH, Burgoyne RD, Wollheim CB, Lang J. **1998**. *Cysteine string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes*. FEBS letters 437: 267-272.
- Zhang H, Kelley WL, Chamberlain LH, Burgoyne RD, Lang J. **1999**. *Mutational analysis of cysteine string protein function in insulin exocytosis*. Journal of Cell Science 112: 1345-1351
- Zhang H, Peters KW, Sun F, Marino CR, Lang J, Burgoyne RD, Frizzell RA. **2002a**. *Cysteine string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. JBC 277(32):28948-58
- Zhang F, Chen Y, Kweon DH, Kim CS, Shin YK. **2002b**. *The four-helix bundle of the neuronal target membrane SNARE complex is neither disordered in the middle nor uncoiled at the C-terminal region*. JBC 277(27): 24294-8.
- Zinsmaier KE, Hofbauer A, Heimbeck G, Pflugfelder GO, Buchner S, Buchner E. **1990**. *A cysteine string protein is expressed in retina and brain of Drosophila*. J.Neurogenetics 7: 15-27
- Zinsmaier KE; Eberle KK; Buchner E; Walter N; Benzer S. **1994**. *Paralysis and early death in Cysteine String Protein Mutants of Drosophila*. Science 263: 977-980
- Zinsmaier KE, Bronk P. **2001**. *Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis*. Biochemica Pharmacology 62:1-11

8. ANHANG

A1: Sequenz der pW8 Multiple Cloning site, nach Klonierung der beiden gleichgerichteten FRT-Sites

```

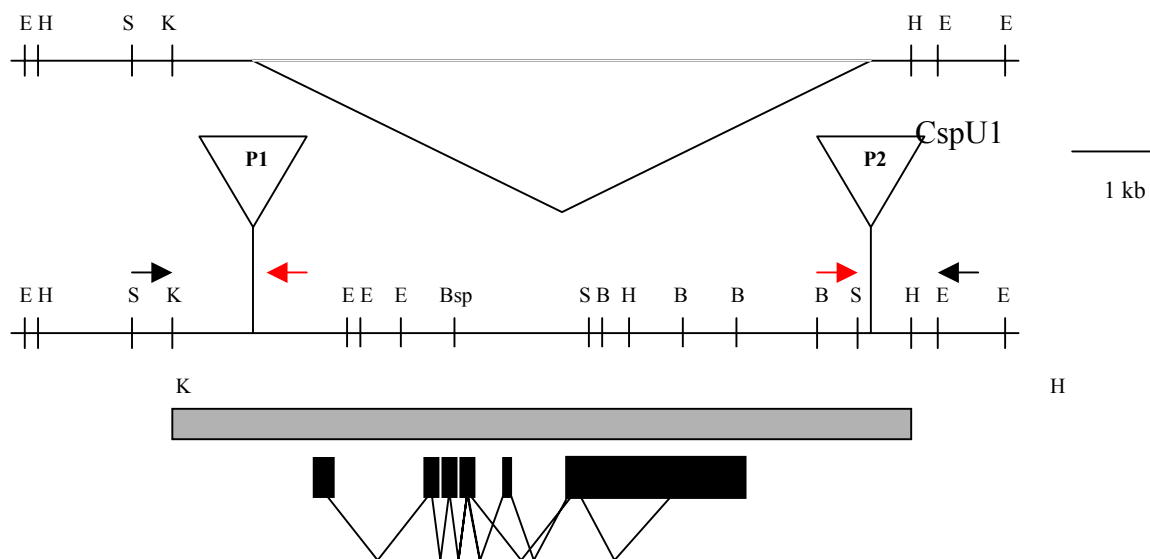
ccagtgggag tacacaaaca gagtaagttt gaatagtaaa aaaaatcatt
tatgtaaaca ataacgtgac tgtgcgtag gtctgttca ttgtttaatg
aaaataagag cttgagggaa aaaattcgta ctttggagta cgaaatgcgt
cgtttagagc agcagccgAA TTGgttccta ttctctagaa agtataggaa
                                Eco mod      XbaI
cGaattcggt acccgcccgg gatcagatcc gcggccgcat aggccactag
  Eco RI
tggatctgGA TCCgttccta ttctctagaa agtataggaa cCTGCAGcca
          BamHI          XbaI          PstI
agctagcttg catgccccgt tattctctat tcgttttgtg actctccctc
tctgtactat tgctctctca ctctgtcgca cagtaaacgg cactctattc
tcgttgcttc gagagagcgc g
  
```

Unterstrichen: FRT sites

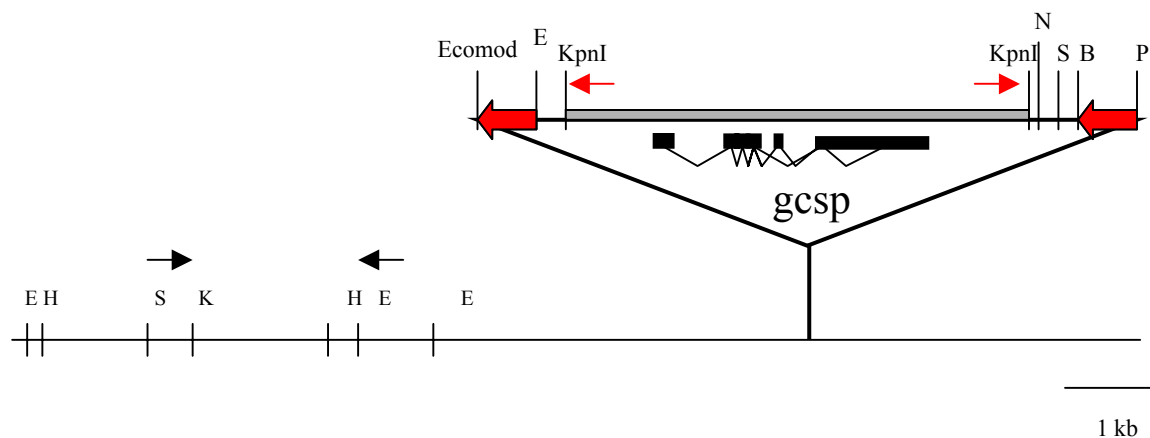
A2: Tabelle der FRT-Transformanten

Bezeichnung	Konstrukt	Insertion
BPE1	pW8 2xFRTcDNA	III
BPE2	pW8 2xFRTcDNA	II
pCaCSPI/1	pW8 2xFRTgosp	II
pCaCSPI/2	pW8 2xFRTgosp	II
pCaCSPI/v	pW8 2xFRTgosp	III
pCaCSP2	pW8 2xFRTgosp	II
pCaCSP3x2	pW8 2xFRTgosp	X
pCaCSPA	pW8 2xFRTgosp	III
pCaCSPB	pW8 2xFRTgosp	III
pCaCSPC	pW8 2xFRTgosp	II
pCaCSPD	pW8 2xFRTgosp	III
pCaCSPE	pW8 2xFRTgosp	tot
pCaCSPF	pW8 2xFRTgosp	II
pCaCSPG	pW8 2xFRTgosp	tot

A3: Primerkonstellation zur Überprüfung der Insertion des rekombinierten 2xFRTgCSP P-Elementes auf dem Nullchromosom CspU1



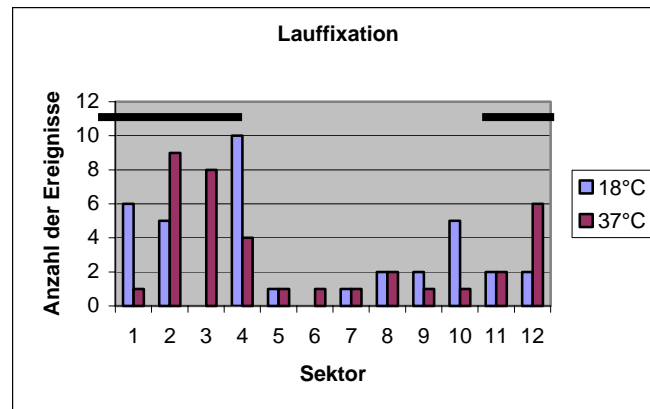
Bei der PCR mit den Primern WTF(schwarz) und FRTPR (rot; vorderes Primerpaar) ist nur dann ein Produkt zu erwarten, wenn noch ein wildtypisches Chromosom in der untersuchten Fliege vorhanden ist und die Rekombination nicht erfolgreich war.



Primersequenzen:

WTF: 5' AAT TTT GAA ACA ATA ACC GTC 3'
 FRTPR: 5' ACA AAG TTA AAT AAG GGA AGC 3'
 WTR: 5' GAT TGC AGT GAG TTT GTG TTA 3'
 FRTPF: 5' GAC AAG ATC ATC AAT ACG CC 3'

A4: Lauffixationsdaten der Fliegen mit räumlich und zeitlich kontrollierter Expression der UAS-Flippase. Ein Verlust der CSP-Expression und Funktion in den Photorezeptoren wurde erwartet.



Gezeigt sind, als Beispiel, die zusammengefassten Werte des Verhaltens von je 3 naiven Fliegen, bei 18°C und bei 37°C, nachdem die zu untersuchenden Fliegen jeweils mindestens 10 min der jeweiligen Temperatur ausgesetzt wurden. Der schwarze Balken erstreckte sich über die Sektoren 11-4. Eine Blindheit konnte nicht nachgewiesen werden.

A5: CELERA-Sequenz des *Csp*-Lokus mit markierten EST-Klonen der Gene 5' und 3' von *Csp*, zusätzlich die Markierung der codierenden Region von *Csp* und die Translation der cDNA1

```

CCCTGCTGCTTATCGGTTGGAGTGAGGTTGGAAGAGCAAAGGCGCAGCTGATGCAGGGCACTCACATAGT
GGTGGGCACGCCGGGCGGCTGGAGGAGATGATCAACAGTGGACTGGTCCCTGCTCACCCATTGCCGCTTT
TTTGTTCTGGATGAGGCTGACGCACTTCTGAAGCAGGGTTACACCGAGCTGATTGACCGTCTACACAAAC
AAATTCGAAGATCACATCGGATGGTCGCCGCTGTCAGATGGTCGTCTGCTCGGCCACGTTGCATGCATT
TGAGGTGAAGAAAATGGCTGAGCGCCTGATGCACTTCCCCACCTGGGTGGATCTGAAGGGGGAGGATGCT
GTCCCTGAGACGGTTACCACGTCGTCTGTCTA 10,4kb genomischer Csp-Lokus (K.Zinsmeier)
SaI GTCGACCCGCAGATGGACACCACCTGGCAGTCGCTGC
GCCAACCCATTGGCACCGACGGCGTCCACGACCGTGACAACGTTTCATCCAGGCAATCATTCCGAGGAGAC
GTTGTGCGCAGGCAGTCAAGCTGCTCAAGGGCGAATACTGTGTGCAGCTATAGATAAACACAATATGGAC
CGAGCCATTATCTTCTGCCGACCAAGCAAGACTGTGATAACTTAGAAAGATTTCTCCGCCAGCGAGGCG
GAAAACATTACTCGTGCGTCTGCCCTTCATGGTGACCGAAAGCCGAGGAGCGTAAAGAAAACCTGGAAAT
Xba GTTTAAGCGGCAACAAGTCAAGTTTCTGATTTGCACGGACGTGGCGGCTCGTGGTCTAGACATTACGGGG
CTGCCGTTTAGTAAGTTCTCAAAATTTGAAACAATAACCGTCTGTTAAACCATTTTCCAAATAATTTACTT
CCTTATCCTCAGTGATAAATGTGACGCTGCCGATGACAAGACCAATTACGTTTCATCGCATCGGACGTGT
Kpn GGGCAGGGCGGAACGCATGGGGTTGGCCATTAGTTTGGTGGCAACAGTGCCGGAGAAGGTTTGGTACCAC
GGCGAGTGGTGCAAGTCCGCGGGCCGTAGCTGCAACAACACAACTTAACCGAAGTCCGAGGATGCTGCA
TCTGGTACAACGAACCAACCTACTGGCCGAAGTTGAGGACCACTTGAACATCACCATCCAGCAGGTGGA
CAAGACCATGGATGTGCCAGTTAATGACTTCGACGGCAAGGTCGTGTACGGTCAAAGAATTTAAGAACT
GGCAGCGGTACGAAGACCAGTTCGAGCAGCTGGTGCCAACCTGTACGCAAACCTGACGGAGCTAGAGTTGC
GC

END AATCACAATCTTTATTCTTGAAACGCTCTTAAGGCTAACGCGGATCTGGAGCGACATTTGTTTGCTATGC
AATCACAATCTTTATTCTTGAAACGCTCTTAAGGCTAACGCGGATCTGGAGCGACATTTGTTTGCTATGC

OF AAGGAAAGGATGTGGTGAATTGAGAAGTGAAGACCAACTCACGCGGAAATACTTTTGCGGCACAAACAC
AAGGAAAGGATGTGGTGAATTGAGAAGTGAAGACCAACTCACGCGGAAATACTTTTGCGGCACAAACAC

Ddx ACAATTTTGTATATGTAGGAAGTCGGAGCTCAAGCTCTGCTATTAAAAATAAACATTTAATTAACCT AAC
ACAATTTTGTATATGTAGGAAGTCGGAGCTCAAGCTCTGCTATTAAAAATAAACATTTAATTAACCTAAC

3' ATTAAAAATCGTCTGTCTAAAGAGTAAACAGCCTCGTTTGAAGCTGGAGTCCG GTTACCCTCACTTCTTC
AAATAAATCGTCTATCTAAAGAGTAAACAGCCTCGTTTGAAGCTGGAGTCCG

```

*

TCCTCCTCCTCCGCTCCTCCTCCTCCTCCTCGTTCCTCCTCGTTGAACTCGGTTTCGCATCTGTTGCAGCG
CTTGAGCCAAGCGTAGACAACGTCGG

CTCTAAGCTGCTGGCACAGCTGGTTGCCGAAGACTCGACGTAGCGGGGGCTGATCTTGTCCAGCAGCGC
GAGATTCGACGACCGTGTGACCAACGGCTTGTGAGCTGCATCGCCCCGACTAGAACAGGTCGTCGGC

GTACGGCGTTTCAAATATCTCCTCCTCCTCGTTCGCTCGCCTTGTCTTGTCCGTTGCCAAGCAGTGCAGAG
CATGCCGCAAAGTTTATAGAGGAGGAGGAGCAGCAGCGGAACGAGAACAGGCAACGCTTTCGTCACGTCTC

ATCCGGCTGTCTCCTCGTCTATGGTGTCTGACTGGGAGGAGACGATCTTGAAGCCACGACTGCTCACCTGAA
TAGGCCGACAGGAGCAGATACCACAGCATGACCCTCCTCTGCTAGAACTTCGGTGTCTGACGAGTGGACTT

GM CGCAGCAAGTGGCGCTCTCGATAGTCCGGATGTTTTCAGGTAAATTTGCGTGGCATCGCTTGCAGTTTGG
CGTCTGTTACCGGAGAGCTATCAGGCCTACAAGTCCATTTAAACGCACCGTAGCGAACGGTCAAACCT

01793 TGAGATGCAAATCTCAGCGACGTGAGCCTTAACATCGTTAATTTATGGCGTTGGCTTCGTCCTCGCAGTTG
ACTCTACGTTTAGAGTTCGCTGCCTCGGAATTTAGCAATTAATACCGCAACCGAAGCAGGAGCGTCAAC

5' AAGGCCTGCTCCTCCCGAGGGTCTGCGGTGGCTTTTCGGTTCGCCCATCCTAACAGAATCGCTTCGGAGCT
TTCGGACGAGGAGGGTCCAGACGCCACCGAAAGCCAAGCGGTAAGGATTGCTTAGCGAAGCCTCGA
A K P E G M

CTGCGGCTCGCCTTTTAATTGAATCCAGTTCGATCTGATTCCCTTTTACAGGGCGCAACATGTCGTTCCAC
GACGCCGAGCGAAAATTAAGTTCAGCTAGACTAAGGAAAATGTCCGCGTGTACAGCAAGGTG

TCTACTCCATATGTGTACAGCAGCTGTGTGGCGTGTGCCACGCGTTAGTACATTTTGACCGATGAAGCG
AGATGAGGTATACACAGTGTCTGTCGA

P-Insertion 1 p1805

GAGCAGGGCGTTCGGC | CAACTGAATATAATCGTTATTAATGATTTTACATGCAATTTAGCTTAGTTTT
TGGTTTAATAGAAGTTCGTAAGACGTACCGATATAAAACGGTTGCTGTCGATCGAAAGTATAAACTACT
CCTAAATAATGAAATTTGGAATGGAGGGTGCATAGTATAGATTATGGATTAAGTCCAAAATTTGTATAT
AGCCTCTTTTTTACATTCCTTTTTACAAAACGTAAATAATTTAATTTAATAATTTAAAAA
CGAAATAGACAATTTTTTTTATTTTATTATAGTCTTAATAATATGCTTCCCTTATTTAAGTTGTAAT
GTATAATTTAAAAAATTAATTTAATTTTAAATAAAAAAATATAATAAAAAAATATTCTGCGAAATGGG
TTGCATCAAAAAAAAAAACAGTGCACGACCTTTTCCCTGGGTGTTCCCTTTCACCTTCATTTCTTA
GACAATCTCGCTCCGCCATACAAATTTTATGCATACAGAAAATGACCTGCGGCCGATCGTTGCTGTG
AGTTCGCTCACCAGAAAAGGTTATTGCGCTCGTAATAAAAAACGTTCGGATATTTTTTATTCCGCAAGTA
GAGTGTCAAAAACCCCGCTGCCTAGATACAACAGTGTTCAGCGGGTGCATTTGGAGTGCCAGTGGCT
TGCTGCAGTTCTCTGGTGCACACTTTCGATGCGATTTCTTACAGTGCAGTCCCGTAAACAGCAGCTATTAAT
GTTGCGATAGATGGCGTGTAGTCCAGAGCTGAAAATCATGATGTCGGCAGGTAACCGGATAAGATAGA
ACATCGGTTTCAGTTCATCTTAATTTTCGTTGCGAAAAAATAAG! **P1617**

AATCGAGGCATCGGTACGGACGCTCA
GAATCGAGGCATCGGTACGGACGCTCA

cDNA1

I AAAACTGCAATTATAAGAGTACACGCACAGATTGTGGTCTTGGCAGGCACAGACTTTCCTGCGTGTGA
AAAACTGCAATTATAAGAGTACACGCACAGATTGTGGTCTTGGCAGGCACAGACTTTCCTGCGTGTGA

CAGCGATCGTAGTGCAAGTTACCCGTTTCGAGTCAAAGTGACACAGGCATCAGGATGAGCGCACCTGGC
CAGCGATCGTAGTGCAAGTTACCCGTTTCGAGTCAAAGTGACACAGGCATCAGGATGAGCGCACCTGGC
M S A P G

ATGGACAAGAGAAAACTGTCGTAAGTATTTGTAGTGTCTCCTTCATTTTCTCCACGGCGCACACAC
ATGGACAAGAGAAAACTGTC
M D K R K L S

Xho

Eco

GCGCGTTCGGCAGAGTACACACTCAGCCCGTGGCGAGTGTGAGTAGCAGCTGCGCGAGGCAGCGCG
GTCGCGCGCAAATGATTTTTTCGCGGCAGAAAGTTTTCTCGAGCCAGCAGGCACCTTTCCTTTCCAGTTCGG
GATAAACAAGGAACCGGGTACAGGGTAATAATGGGCTCCGGTAGTGGGAAGGGGAGGGCAGCTGCGGCTG
GAGTTTGTATTCGGACAAGCGAATTCGTTCTGGGCAAGGCCAAGGACAAATTTGGCCATTTGACCGAATT
CGATTTTTATTTGATTTCAATAATCGTTAGTTAAATCTTAGTGGCATAGTTTCAACTTATGTGCATTA
GGCAGGAAAATGTAAAAGGTAGAAAAAAGGCTACGCACATCATCGATCAAGACTCGAGCCGATATCATTC
AGATATGTGCTATGTAATACATACAGACCATTATAGAATTACACATTATAACTACACAGTATGAGAATT
TCCTCTTCCTTCTCCTCTCCTCTTGCATCTCTCCTCGGTTGGCCACACCTCTTTTGCCCGAAAATCGCA
CGATTTCAATTTGTTTAAATAGAAAAAATGAGTTCGAATACCTTCATTTTATAAATATTGTTCTATTTAAAT
TGTTCAATGTTTGGGTCTTCGTGCAACACATACCGATTCCGGCATAAGTGGCGGATAACAACAGACCTAC
AGATCCAATAACAGACAACCAACTAACTAACAGCCTGGCCGTATTCGGACAGAAAGTTTTACGGCCGC
GTTAGCCGTTCTATAATTTGACCCATATAGTAATGCCAGCACTAACCGCTTCAGTTTGGCCAGGC

Eco **AATTC**GAGTTGGCTTAGATTGTCATGATGCCTGCCAATGTCCTTGGCCCTGTGCAGTCGCCACCGCCCA
GTGTCCCTGGGGCAGCATCCGCTTGGAGCCTGTAATCACCCCTCATCATCGTGGTCTCAACCACCTTTGTC
GAGCGCTCGCCGCTTATCAGCTCGCAGATTCTCAGAGCGGGTTTAGGCATACACAGCGTTGCACCCCAA
CCCCCTTAACCTACCAAGTTTATAAATAGCACCCACCTGCTCAAGAAAATCCATACAGATTGCAATTTAT
GTTGCACGCGACCCTGCTGCAGAGCCAACAATGCCAGTTGCTTTCGAACTGGACGCCCTCAATGCCAACG
CCTAGTCCGTGGGTGCAGGCAAGCCCTGAGGGCCAAGTGTCTGCCCGGATGAGCTCCCATCGCGTGCCAC
GGCTAACTGTTGCTGCGGTGAGTCATAGTCCAATACTACTTGCATGGCTGGGCTTATCGCCCTCTGTC
AGAATGTAACATACGCAGCTGAAGGAATGTCGAGGCACAGTGCAACTGCGCTAGGCAGGTCCACGCAGT
GGTTCCTGAGGTCTTACCTGTGCGTGGTTATCAACCTTTAATTCAAAATGCGGAGACGTGGATAGTAATC

CTACGCAATACAGAGACCATGTTCACTTGATTTTCATTTATTAG**GACATCTGGCGACTCGCTTACGAG**
GACATCTGGCGACTCGCTTACGAG
T S G D S L Y E

II **ATCTTAGGACTTCCGAAGACAGCCACCGGAGATGATATTAAAAAGACTTACCGGAAACTCGCACTCAAAT**
ATCTTAGGACTTCCGAAGACAGCCACCGGAGATGATATTAAAAAGACTTACCGGAAACTCGCACTCAAAT
I L G L P K T A T G D D I K K T Y R K L A L K

ACCATCCCATAAGAACCCGGACAATGTGGATGCGGCTGATAAGGTAATAATTTCCGAGAAATGGGTCC
ACCATCCCATAAGAACCCGGACAATGTGGATGCGGCTGATAAG
Y H P D K N P D N V D A A D K

ATGCGTATTAATATATTAATATAATATAATAATATAATAATATAATTAATATATTTGCAG**TTCAAGGAAGTCAA**
TTCAAGGAAGTCAA
F K E V N

Bsp **CCGGGCCC**ACTCGATATTGAGCGACCAGACGAAGCGCAACATATACGACAACACTACGGCTCTTTGGGCTTG
CCGGGCCCACCTCGATATTGAGCAACCAGACGAAGCGCAACATATACGACAACACTACGGCTCTTTGGGCTTG
R A H S I L S N Q T K R N I Y D N Y G S L G L

III **TACATAGCCGAGCAGTTTGGCGAGGAGAATGTCAACGCATACTTCGTGGTCACTTCACCGGCTGTAAGAG**
TACATAGCCGAGCAGTTTGGCGAGGAGAATGTCAACGCATACTTCGTGGTCACTTCACCGGCTGTAAGAG
Y I A E Q F G E E N V N A Y F V V T S P A V K

TCAGGAATCGCGGTATTTTCGCATGCCTAGGCACATTAATTAATCTCTGATTCTCCTTGCAG**GCGGTGGTT**
GCGGTGGTT
A V V

IV **ATCTGCTGTGCCGTGATCACTGGATGCTGTTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTTGCAACTTCTGCTGCG**
ATCTGCTGTGCCGTGATCACTGGATGCTGTTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTTGCAACTTCTGCTGCG
I C C A V I T G C C C C C C C C C C C C N F C C

GCAAGTTCAAGCCCGGTCACCGAGTCGCACGATCAGTATTCACATCTGAATGTGAGTGAAGTTACTTG
GCAAGTTCAAGCCCGGTCACCGAGTCGCACGATCAGTATTCACATCTGAAT
G K F K P P V N E S H D Q Y S H L N

GCTTAGCCAAGTCCAAATATAATACCCGCCCAACACAGCCCGCAATAAAGTAAATCATTTTATTGATTTAG
TTAAGAAAAGAGAAAACAAGAAAACCAATCCGGTGCAAAAGCTAAAACATTAACCTTTAACGCATGCTTCCC
ATCCACCCACACACTGTACTATTACGAACCTAACAAAACCAACTTTGATGATTTTGTGGGGAGATCTGTA
TCATTTTCCCTCTGAGAAGCTAATGTTTAGTCAAAAACGAGCCCTACATCTGACATCAACGCTTACTT
AACAGTGCACCAGAAAATAAACGCTAACCATTTTTAGTATAAATTTTCCCTGGGTATCAGCTATCTTGG
CACACCATCTCCCTCGATTGGTTTTCCCTTACTCACACTACTCGTACAAAACACTACTCTGATTGCACATG
CTTTGTAATTAGTTTATTTTGGGTAAGTATGAAGTTTGGTTTTGGTTTTCCGATTATCAATCTCCAGACA
CTGAAGTAATCAGAATACTGATTTTTGAGACCAGAGGTAACACGACTAACCTAAAACCTTTTCCGATCC
ATCGAACAAATTTTTGTATAATTTATTGTTAGTGTGTTTTGTTTGTATATATGTACTTCACGAAAATCATCAA
ATGCTTCCAACGTTTCTCTCCATAAAAAAATAATAAATAACGTCAACACATACACGCTCGGATTTCT
CGAGACAGACAGTGAACGATTATTGTTTTTCCACGATTGCTTTTCTTGTTTTTTAAGTGTCCATTGC
GCATACAAATTTATTTTGAACCACCCAGATTAGAAGTCTTCTCCTTTGCTAGTTTGCAAGCTAAGGAA
CAGAAGCTATAGACTTACGTTTCTATTTTTGGTTAACTTCTTTTTTTTTCTCAAAAATCTTTGCGATCGA
CTCATCATATCCACCACCTACTACCACCCACAACCACACATTCGCTCTCGACCTCGCCGTCAG**CGCC**
CGCC
R

V **CCGATGGCAATCGGGAGGGCAACGATATGCCAACGCATCTGGGACAGCCGCCACGCTT**GTAAGTATGCA
CCGATGGCAATCGGGAGGGCAACGATATGCCAACGCATCTGGGACAGCCGCCACGCTT
P D G N R E G N D M P T H L G Q P P R L

AATCGAAAATAATACCAGCACGAGTACCGCATGAAAAGGTGCAAGATCACCTGCGGCCTGCCTACCGCC
TCCACCTGGCTCAAGGCACCCACCCACCCACCCAAATAACACAAAGCCAATAACCAATCCGAACTC
TACTTAAACGGTAACCAATCGAAATTTATATGTTCCAAGGGAACACGTCTTACTAAGCTAACATTCAGTC
GCAAAAATAACTTGATCGAGAGAACAGAGGAAGAGATGACAAAATAAAAAAACGTCGTTTTTTTTGAAAGT

ACTGCTGTAATACTTGGTAAATGTTTTATGATTTTCTTTCAATGCTGTGCATCTGGCTGATTTTAAATTT
GTAGTATTTGGCTTGAAGGGTCTTCTATCCATCAGCACAAAGAGTAATGTAGTGGTGCCTAACTAAACCGT
AGAATAGTGTACATACATGGCTTGTAGGCAGCCACCGAAAGTTTTTGGACTAAACATTGGTTAAGGGACC
TTCCTCCAAAGCTCTCAAACTTGTCTGCAGAACTAAAATACCGGCAGAAATCCTAATCCCACCTCTTTTG

TGTCCCAGCAGGAGGACGTTGACCTAGACGACGTTAACTTGGGTGCGGGCGGAGCCCCGTTACCTCACAG
GAGGACGTTGACCTAGACGACGTTAACTTGGGTGCGGGCGGAGCCCCGTTACCTCACAG
E D V D L D D V N L G A G G A P V T S Q

VI CCGCGGGAACAGGCCGAGGACAGCCTGTTTTCGCCATGCCGCGCCAGTGGAGCCGTGGGAGTAAACC
CCGCGGGAACAGGCCGAGGACAGCCTGTTTTCGCCATGCCGCGCCAGTGGAGCCGTGGGAGTAAACC
6D6 P R E Q A G G Q P V F A M P P P S G A V G V N

CCTTCACCGGCGCCCCTGTAGCAGCTAACGAGAATACGTCGCTAAACACAACGGAGCAGACCCTTACAC
CCTTCACCGGCGCCCCTGTAGCAGCTAACGAGAATACGTCGCTAAACACAACGGAGCAGACCCTTACAC
ab49 P F T G A P V A A N E N T S L N T T E Q T T Y T

GCCAGGTATATAAGCAATTGGTCCAGAAGTCAACCACACAGCCAGCCTCCGCTAGTTTGGCAATCCGACA
GCC
P

AAGCGTCTTTGACCATCGAACTTGTATTGTGCATATATCGAACAAATATTGTTTCCTTCGGTTCGCTGGA
TAGTGGCGAAGGCATTTCAGTACCAGTCCGACATACCCCGTCCAGCGATCAGATCAACACCCCTTAGCA
GTAAGCTCGTGTATCCGGCAAGGTATTTTTTAGTCACTTTCTGTACATGTCCACGCGAATATGGATCCA
TTTACTTAGATCTGCATGCTGAATTACATTACCACACACTGCCGAGCTGCAGGATGACCAATGAATAGA
TTGATTGACTCAGCCTTTTCGTTCCCTTAGGTCTGCGCCAGCCGACTCAAGTCCCCATTTTAAAGACCTC
Sal CTTTCAAGATGTTTTCCAGCTTTCGCAAATTAATGAAATGAAAATTTTAAATTTCCATCCAAGACATA
Bam TTCAAAGAATGTAGCTTAAGTTGACGGATTTAGTTTTATCGTTTTCTTATGCAACGCGTACATTTTGAT
Hind TTCTTTTCACTTATCACTGTCTACTTCTCTCCCCCTCTTCACTCTAGATATGGTTAATCAAAAATA

AGATATGGTTAATCAAAAATA
AGATATGGTTAATCAAAAATA
D M V N Q K Y

TTAGTCAAGTGCTGCGAGCGAGTCAAGACCCGGGTGCTTGCCTACACCACACATTAGATACAGACACAG
TTAGTCAAGTGCTGCGAGCGAGTCAAGACCCGGGTGCTTGCCTACACCACACATTAGATACAGACACAG
*

AAAAACAAGCCCCTAAATCGTAAACAGAAGAGAAAACCAGATTTATTTTATAAATTATTAGTGTGTTTTT
AAAAACAAGCCCCTAAATCGTAAAGAAGAGAAAACCAGATTTATTTTATAAATTATTAGTGTGTTTTT

AAAATGCGCGATATGTTGAAGCGAGTAAACATAGAAAACCAATGTATTTATTTTAAAGCCGTAGCACTTAGC
AAAATGCGCGATATGTTGAAGCGAGTAAACATAGAAAACCAATGTATTTATTTTAAAGCCGTAGCACTTAGC

TCTAATTTTAAACTATCGAACTTTCGTGGCCGCCCTCCGGTCAAGTCAAGTTGATTTGGTCCACTTCGGGC
TCTAATTTTAAACTATCGAACTTTCGTGGCCGCCCTCCGGTCAAGTCAAGTTGATTTGGTCCACTTCGGGC

AATCGATTACCAATTCCATGTTCAAGCCATGCATCTAGCCTTGCAGCTGTACCACTATACAACCTCGAA
AATCGATTACCAATTCCATGTTCAAGCCATGCATCTAGCCTTGCAGCTGTACCACTATACAACCTCGAA

TGCATAGCCAAAGCCGGAAGCCACCATCTCCACCTATCCAGTCAAGTCAATCAACAAAACACCATTTCGGT
TGCATAGCCAAAGCCGGAAGCCACCATCTCCACCTATCCAGTCAAGTCAATCAACAAAACACCATTTCGGT

Bam GTTGATGAAATGTATATCGGAAGTTTGTCTAGACATTTGCTTGGGGATCGGATCCCTTGCAGCTTAGCC
GTTGATGAAATGTATATCGGAAGTTTGTCTAGACATTTGCTTGGGGATCGGATCCCTTGCAGCTTAGCC

CGTGAGTTGGGATTCAGTCGCGAAGAGAGGCACTGTAATTATATATATGTATATGATATGTGTATCTAGT
CGTGAGTTGGGATTCAGTCGCGAAGAGAGGCACTGTAATTATATATATGTATATGATATGTGTATCTAGT

VII TTGTGGCATTGTGTGTCGCTTAGTCTAGCTAATTTGTTCTCGAGATCTCCTCTTACCGATTGTTTCT
TTGTGGCATTGTGTGTCGCTTAGTCTAGCTAATTTGTTCTCGAGATCGCCTCTTACCGATTGTTTCT

GTTATTTTGCCTAAATGTTAAAGCCAGAACTACTTATGTAAAAAGGATGAATTGTGAGCGACGCGCC
GTTATTTTGCCTAAATGTTAAAGCCAGAACTACTTATGTAAAAAGGATGAATTGTGAGCGACGCGCC

CAGCAGATTGCTCCGATCCGATCTAATGCAAAATGTAATACGAGTTAAACAATTAAGCATCACACAGTT
CAGCAGATTGCTCCGATCCGATCTAATGCAAAATGTAATACGAGTTAAACAATTAAGCATCACACAGTT

AAACAGAGGAGGACGAAGAAGAGGACACTTTGAAGGGCGATCCAATTAACGCAAAATATAAATATATAAC
AAACAGAGGAGGACGAAGAAGAGGACACTTTGAAGGGCGATCCAATTAACGCAAAATATAAATATATAAC

AGATATTAATAAATCCCCTCTATATATAAAACAATTAATACGAGTAAATCAAAAAGTTGAATTGTAACCCCC
AGATATTAATAAATCCCCTCTATATATAAAACAATTAATACGAGTAAATCAAAAAGTTGAATTGTAACCCCC

TGTCGAACACCCCTCTGCACGGGCGAGGGAAAAATTTGGCAAGATGCCTAAGAAATCTCGAAGCACTCGAT
GATGACGATGATGTTGACGGGCATGGCCCCGCATGAGTGTGTGCTCATTGGTGGACTCTTCTCGGTGT
AGTGCGATCCATGACCGGCAAAGGCAGCGCAACACAGCAGCGCCACGACATCGACTTGATGAAGTACAT
TGGATAATGACGCCAGAAAAATACACGGCGCATAAAATTATTCAATTTACAAAAATCCAACCTTTTGTAA
TAAGTATTTCTCATCAGAATGCCCCACAAAGCAACCATTTCATACTCAGTAAAAAAATATTTATATACGA
ATACACCTGTCTTTCAGTTTTTATTTAGTTATTTACGAAGCCACTAAATTACGATCCTGTAAAGTAGAAG
GTATCTGTTGGCCAAAGACTGCGACCTAAGTCTTTGTAAGGAAGTGTTCGCGAGTGTATCACTAAG
GAAAACATATCGGCGGGCATGGGTTCTAGGTGATCCACACACCTCACCCCTGCCGGACTGTGAGCGGGCG
AAGACTAACTTAGTTGTGACAAAAAAGAAACAAAAAG/CAGAACAGAAATACT(CGCGAGTTG
GAAACGGCTGCGCCTTGGCCGCTCAGGAAGAGGCGGCAAAAACAAAAGCAAAAGCCATTCCGACATTCT
/AT04041.5/ (AT21386.5)

**CGCGGACGCAACTGAACGAATCGGACGAGCGAGGAAAGATACTCGCGCAGATACAGATACAGATACTTTT
CATATTTTCAGATTTTCCGCCGTGGCATATATTTATTTATTTACCCCGCTCGGGCCACTGTTATGTAAGG
AGAGTGTGTGACGCTGGTGTGTGTTTCGACAAACTCGTTTCGGCGGTGTCCGTGATGCAAGTGGGGGT
CTACGAAAGTCAAGGTGCGCACCCCTACACGACGCCCACAGCCATCCCTGTTACTGCGCCAGTTGC**
AT02150.5 (gegen 3' Fehler in EST-Klon)

Eco CATGAATTCGCGAAGGTCTAATCGGAAATGTGCGAATCGAGCAGTGAATCGAATCAGAAATGGAT
AT25594.5

GACTTTGGCTCGACCGCATCCGACTTGGAAAGAGGCCACCTGCCCATGCAGGCCAATGCCACGTTACGA
TCGA)TTGGCGAGTGACCCGTGCTGGACCCTGTTGGATCTCTATCTTGGCTACATGAACCGCTACACAT
Bam CTTGCTATCACTAGCCGGCAGGCTGCATCTTCTAAGCCGGCAC/ATCCTGGTACTCTCGGCCAGGATCCG
ATTTTTATGGGTGTGCTGCAGGGCAGCCTGTTAATGCTCTTCTCTTCTGATGCACCTGCTGCGGCTGT
GGAGCTGTGGATACGCAAGTTGAGCGGCGCTGAACCCACTCCGGACGTGGCAAAAGAGCTGAGCTGCGA
CTTCAACTTCGCTCCGAGCAAGAGAAGCGAGCTGCCAAGAAGCCGACGAGGCTCTGCTAGAGGTT
GAGGAGAAGAAGCGCCGCAAGCGGTTTACAAAGAAGCGCAACTGCGTGTCCGCCGGGCGCATCCTTATTG
CCTTGGCCATCAGTCTAAGCGACCAAGCACCATCGTCACGCTGCTTACCCTTTGAGCCCGTTACCC
CGGGGAAATAATCCTGGATACCTACTTGGCCGCGGGAACTGCCGCTCACGATAAGACTGCCTCAGTTG
AT15559.5

Eco GCGGAGCCGGTCAAGGAAGAGGAAGTCCGAATATATCGAGCTTAAGTGGGTTGCAACGGGAATTCACAG
AGTTTACATTTTAAAACATGTATTGTTCCCTGTCAACTAATGGCCAAACCTTTTTTTTACAGATCGG
AGCCCCGGGGACCCTCAGTACGACCGACGAAATTTACCCGGATTGCTCCGACAGCAGTCTTTACGTTT
AGACGAGGAGCAGGAAGACGCCCTCAGTATTGCCGCGTGGATACCATCCAGTAGTCATCGGAGACATA
TTTGACAACCGGTTTCGAGTGGTCAGAAAACGGGCTGGGGCCATTTTCCACTGTCTGGCTATGCCGG
ATCTCAAGTATGTGATGAAATGTCGAACCTACCATAAAAACAAGCTCTTTCAAACCTTCATGCTTTCCCCAG
AGATGAGAAGTACGTGGCCCTCAAGGTTGTTAAGAGTGTCCGCATTACA TAGAGACGGCAGCGGACGAG
ATCCGGCTCTTGAAGCTATCCGTGACGCAGACCCATGGACGTTAAGCGGGAGAGGATCGTGGCGGTGA
TGAACCATTTCACTGTGCGCGGTGTGAATGGAATGCACACCTGCTGGTTTTTCGAGGCCCTGGGCTGAG
CTTGTATAAGCTGATAGTGAAGAACAACCTACAGGGTCTGGCCATCGCTCAGGTGCGTAACATATCCGC
CAGGTTTTGGAGGACTGGACTACCTGCACAGCAAGTGTAGCATCATACACACGGACATTAGCCGGAGA
AT04078.5

Sal ACATCCTGCTGGTGTGATCGATAATGCCCGCGGATGAACCGCAGATCGACGATGAGATCAACAGTCTGCC
AT29722.5

Sal CGTGAAGGGTGTGCGACTTCCCCGACTCGTACAGTATCAGTATCCAAGTTGAGTTGCCAATGGCTAA
TGCGTTCACCCCTTAGTTCAGCTCCATCGAGAAGCAGACCAAGTCCGCGGGCCAAGTGGCCACTGATCGAGC
Sal CAAATGGATCGACCAACACCAACTAACACTAGCAATAGCACGGCAGCAATCCAATTCGTCGACTCC
GCTGGCCCGCTGATCATGTCCACGCTGGACAAGGAGGACACCAGACAACCACCTCGTCCACGCTCAAT
TCCAACACCACATCATCGCTGGCCCTCAAGTACTCCAGTCTGTTGGGGACAGCGAGTGCAACGGAGGCC
TCGGCGGATCAGCGAACATAAAACAACCGCTACCGAACGGAGAAGAAAATCACTGCCAAGGTAAGATTGCT
TTCAAACAGGTCGCCCTGCCACACTCGAAAGCACTGGCCAGGATTACATATACGTTGTGGTGTGTCAT
GGAAAGCATTTGCACCTCCACATTTGTAGGCCACTGCAAAACACACACTGCACACCAAGGAACAGCAA
ATTCTTACGTTTTACTTTTTGTTTCAATTTTATTTTCGCGTTATCTTTGCCTTTGGTTGACACTCGTATCA
GTCTTCTGGGATTGCGACGAAGATGCCGAGTCCGACACGCTGGGCGAGCAGACACCTTGGCGAGCACC
ATGGATTGCCACCGATCTCGATCCCGAACCCGAACCTCGATTCCAAGCCAAACCCGTACCCGAGCCAA
GTGAAGGACCGATCCAGAGGTAAAGTGGGTTGGATGCGGGATAGTTGTTAGTGTATAGCCCGGTCATTAG
AAAGAACCCTGGATAATCTGTTCCACTTTGGATTATATGTGTTGTTATTTGGGGGCAAAATCCGCCCTC
TGCTGTTTACTTAACGTTTTGGATTATCGCTTTTCGTTGAAATTTGTTGCTCTCAGCCTCACACACT
TAACCCACATGCTTTTTCAAGGCAATTTTCTGATCGAAACGCCAAATGCTTGATTGATTGTGGGCA
TGGCCATCTTTTTATGTGCTGTAACGGGTTCTGTGATGTGCTTAACGTTTGCATTGCTACCTGCTAAT
TGCATACACATCTTATTGGTGTCTCATGGATCTGTGGCTACAGAAGTGAAGAAAGTTCAAATGGTCTAA
AAATAATGATAGCTATTTGTAATTTTCGAGATAAGATAAAACGCCATTGAGTAATGTACAGTGAATTATG
CATAAATATAAATGTATATGTTAATAGATTGCAATGCATCATACTTTAAATTTAAATTAACATTTTAC
Eco CCTATTTGTTATTAGTACTACAATAGAAATGAATTCATTGAACCTCTTTGGCCACACCTACATATAT
GATTGAAATGTGTTTAGGCTAAAATGTTTTATTGTAACCTATATTGTTAGAGGCATTTCTATATTAAC
CTCCAGTGGCATGTCCAACCTCAGCATATCACTGGGAGAGTAATCCGTGGCAATCACCGCTAGGGTTTCGA
CACGCAATCCGAGCGTTGACTGCCACGCTGTTGTTGTTTTCGTTAATTGCACCAACTAGATAAACCTTCAA
AGAAGCAAACCAACATTTGTGATTTCTTTTTCTCTTTCTTTGTTGTAACCAATTTACATGTATGCAACA
CACTGCTATACAAACACGATGCAGCAGCCCACCCGAACTCCACCAATAGCTCCTGCCCTCCCAACA
CAGCCACGATAGTAAAGTCCAAGATCAACTCGAATATTCTGAGCAGTGCACGTCCTTGACATCGACCAA
CGAATACTGTTTACCAACACGAACACCACAACAGCCTCCACACCAAGTGGCCCTCCAAGTGGCACTCT
TCCTCCGCCCTGCTTAGCCTCTGCCACGCCCCCAGCACGTGCACGCCCTCGTTACGCAAAATAGCTC

CTTCTGCAACAGCTCCGGCTACCAGTACAACCTGTACAACATCAGCCGAGTTCATGATGGCGATCATAA
AACAAACAAGCACATCAACAACAACAACATCCAATGCGATATCCTCCGCAACAACAACAACCGCGACAACG
ACAACAGCAATCGCTAAACTAAATGTCCATGCTAATGCCATTCCTTCGCAGAACAGAGTCAGAGTAGCC
AGAACAACACCTACACGATCCAGTCGCTCATTGACAACAGCAACGTTCCGGTAAAGATCGCCGACTTGGG
Hind GAACGCCTGTACGACGTGAGTATCCTTTTTAGATGCTTAAAGCTTCAAATATATATATTTTTCGCGTCAGA
TAAACACATCATCATGATTTCACTCGTAGATTATGACTCAGTATGACTCAATAAAAGTATATATGTATGTA
TATTCATAATCAGGAATGCAAACTAGAAAATTTCAATATCCAAAATTTGTTTTATTTGCGCGTGGCAGTTT
TGATTATTGGCAACATCTGGAATCAGCCTAATCTCAACATTCGAGCTTTTTATAGGTCTGAGATCGAGTA
GTTTCATACGGACAGAAGAACAACGAACATGGCTATATGGCATCCAAAATAACACTTCACTCTACCTGTT
ACATACTTTCAATGATTCTAGTGAACCTTTTACTTTTAAAGGGGGTATGGAGTTATTTGACTTT
TAGATTCTTCCGATTCCGGTATAAACCAATTTTTGCCATTATCTATTACGGTTTTTATTTTATAGAAAT
GGGACCAATTGTCTATAGAAAATGCAAAATCAGAAAATTTCAAGAAAATCAGGTCTACCTAAATAGTGGACG
TGGGAGGGATAATTTCCGAATGAGGGCGTGACAGTTTTTTGTGGTTTGTAGGCATTAGAGTGGGCAAA
ATGTTTTGGCATATCAATAGAAATGCAAGGAGAAGGACATGGCCAGATAAACTCTTCTAGTAATCCTG
ACCGAGAATATATACCTTTTAAAGTCCGAAACACGACCCCGCACATGGTTTTCAAAGTAATAAGTCCGT
TTTTCGGCTTCTATGAATCTCAGTACCATCACTTTACTGAGGACATTCAGACTCGCCAGTATCGATCAA
TCGAGTTCTTTTGGGAGCGCGTACAATTATACCGCCGACATCTGGAGCACAGCTGTTTTGGCCTCGA
GCTGGCCACCGGCGACTACCTGTTCCGACCTCAGCCGGAGAGTCTTACAGTCGGGACGAGGACCACTTG
GCGCATATTGTGGAGCTGCTGGGCTCCATACCGCAGTCGGTGATCTTCCGCGGTAAGCACGGGCTGAAGT
ACTTCACCAGCTATGGTAGGTATCAAATCGAATTTAGCTCAAGGAATGGTGTGTGATGTGTGACCCCTGT
TGATTCCCATTGTCAGGTAGCTGAGGAACATCACAAGCTGAAGCCCTGGAGTCTAATGAACGTGCTGG
TGGAGAAGTACGACTGGGACCCGGTGGAGGCCAAGAAGTTCTCCGACTTTCTGCTGCCC**ATGCTTGAGTA**
CAATCCGGTTATACGGGCGTCGGCAGCGGAGTGCTGCAGCATCCGTGGTTGGAGCAGGAGGAGTTCGTC
TAAGAGGCTCATGGAGTACTAGACAGCCAGAGACACAGGCATAGGCACAGTAAAAATTTGCATACAT
AACATACGTATTTCTGACTCGTATTGTATTTCTAGGCTTAACTTTTATATGCAACAATTTGCCATAAAG

GH05834.5 AT02150.3

Hind **AGGAGGTAGCAGGAAAATGGGATGAGGAGCTAGCATTAAAGGACTCGATCGAAGCACACACATTTTACAC**
TTACGAAATGCGGACGATGTGGGGCGTTCCCGCTCGAATTTTTTAAAGCTTTTAAATTTTTGTACTTGAG
AGCTTTAAATGTAATTACTAAAGAAGCGATTTACTTTTAAACGACAAAAGCAAACGAGAGAAGTAGCGC
AAATGTTTTCAAGTTTTTTCGACGAGTCATATAAGTATATACATACATACATATATTTTTT
ATTAAGTGGAAAACAAAACAAAAGACAATGACGACAATTTTTAGTCAACAGATGCCTAAACTGACTGAC
TGAAAAGGAATACATTTTTCATGCGAAAACCAAGTAAAACCAAATCAGTGAGAAATGCTAAATAGATTGTAC
GAACTAGCAAAATATTCAGCATCACATAAATAACAATACCTTCTATAATATTAATAAGCAAGTATGTGTA
TAATTAACGAAACCCATT**GTAGATATCGAGAATGTTCAAAATACAGATGTAAACTCAAATATTGACAG**
CTTTTTAGCAGAGTGTAGTATTTTGGTACATTTAACCGAACCCATTTGTAGATGTTTAGGCCTATGTTG
ATTACGAGCAGATTTGAAAAGATGCCCTACTTACCCGATTTCCGGTTTGCAAACTTATCATTTAACCATC

GH08190.3

CGTGAAAAGAACCTATCCAGATCATGTAATTCAAAAAGAATTAAAAAACAATAATAAATCATTGCATAA
AAGTCTTTGTATCGGAATTGAAAACCTCAAATCGAAATTTAAATACTACCAATGATAACTACTGAGAAAT
CATATTACAAAATAACGAAAACATATTTTACTACTTGCCTACAGTATTTGTACACAAGCCTACAAAGTA
ACATTGAACGTGACCAAATAATTTAATATTGCGGAAGATTTTTCCCCCAAACCTCATATTTAATATACACA
CACGTGTGCGCATGTGTCCAAATGAAATTTAACAGAAATTTGAAGCGGAGGAGCTGCACGTTCCGCGGAGT
GGACACATATTTCAATAAGCCGAAATAAAGAATATACATACCGATCCGATCTAGAGACAGCTTATTAATG
TGGGATACTTATTTGGGTTGTATAAGCACTTTATTTCGAAGTCGTACGAGTATAAAAAATGCAGAGTCTAGA
ATACATTTGGGTATGTTTAAACAGTTTTTAAAGTATGTTAGATTAGCATAGTATCGATAGTTCGATCGGCGG
ATAAACTACATAAGCATTATGTGAATACACAGATCGGCTCCATTTAGAGTGCCAGCCCTAAGATCTGTT
CCTGCTTGTATACGCCATGGTACGCGTTGCGTATAAGCACGTAGGGAAAGCAGGACTCAAGCAGATCCAT
TGTGAGGAAGGGCAGATTGTTTACGATTTTCGTCAGCAGCAAAATAGATGGACTCTCGGTTCCGTGTCGCC
TCTTTGTGCGACTCCTGGCCAAGCGCAGTAGGGAAGAATGCCAGAGCAAGGAACCTTTTATGCGGT

9. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCM	Baylor College of Medicine
BDGP	Berkley Drosophila Genome Project
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
ca.	circa
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EST	expressed sequence tag
flp	Flippase
FRT	flippase recognition target sequence
g	Gramm
G	Guanin
GFP/YFP/RFP	green/yellow/red fluorescent protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
kb	Kilobasen
l	Liter
μ	micro
m	milli
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minuten
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	beliebiges Nukleotid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD _x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
PCR	Polymerase chain reaction
pH	pH-Wert
poly(A)	Adenosyl-Polynukleotid

RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
sn	small nuclear
ss	einzelsträngig
T	Thymin
U	Unit
UAS	upstream activating sequence
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
xg	mal Erdbeschleunigung

Abkürzungen der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Publikationen

Pohar N, Godenschwege TA, Buchner E.

Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human.

Genomics. 1999 Apr 15;57(2):293-6.

Godenschwege TA, Pohar N, Buchner S, Buchner E.

Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of *Drosophila*.

Eur J Cell Biol. 2000 Jul;79(7):495-501.

Arnold, C, Reisch, N, Becker, S, Leibold, C, Palm, D, Buchner, S, Buchner, E. (2003). Structure-function analysis of the Cysteine String Protein in *Drosophila*: the cysteine string, linker, and C-terminal domain. (*in Vorbereitung*)

Kongressbeiträge

Tanja A. Godenschwege, Björn Brembs, Roman Ernst, Bert R. E. Klagges, Jean-René Martin, Natascha Pohar, Gabi Putz, Markus Reif, Dietmar Reisch, Michael Schaupp, Erich Buchner (1999) The *Synapsin/Timp* locus of *Drosophila*: Structure and Function, *Meeting Abstract: Molecular Neurobiology of Drosophila, Cold Spring Harbor, USA*

Godenschwege, T.; Pohar, N.; Buchner, E. (1998): Analysis of the *Drosophila Synapsin* locus and characterization of mutants ", *Meeting Abstract: The 7th European Symposium on Drosophila Neurobiology, Warwick, UK*.

Godenschwege, T.; Pohar, N.; Klagges, B.; Wustmann, G.; Buchner, E. (1998): "Analysis of the *Drosophila Synapsin* Locus by Targeted Mutagenesis", *Göttingen Neurobiology Report 1998. Proceedings of the 26th Göttingen Neurobiology Conference 1998; Volume II; Edited by N. Elner and R. Wehner, S. 587*.

Lebenslauf

Name: Nataša Reisch, geb. Pohar
Geburtsdatum: 27. Juni 1973
Geburtsort: Grünstadt/Pfalz
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1980 – 1982 Volksschule Schwabach
1982 – 1983 Gemeinschaftsgrundschule Reichshof Wildbergerhütte
1983 – 1984 Gemeinschaftsgrundschule Reichshof Hunsheim
1984 – 1993 Städtisches Wüllenweber Gymnasium Bergneustadt
Abschluss: Abitur

August 1993: Praktikum bei der Firma *Schmidt + Clemens Edelstahlwerk*,
Grundpraktikum „Metall“

Studium:

11/1993- 07/1998 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians Universität
Würzburg
Schwerpunkte: Genetik, Zell- und Entwicklungsbiologie und
Mikrobiologie
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Würzburg
Thema: „Klonierung eines potentiellen TIMP-Homologs im
Synapsinlocus von *Drosophila melanogaster*“
Abschluss: Diplom

Seit 09/1998 Promotion am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Julius-
Maximilians Universität Würzburg

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen angewandt wurden.

Ich habe die Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre ferner, dass ich bisher außer dem, durch die beigefügte Urkunde belegten, Universitätsdiplom, keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Nataša Reisch

Danke

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Erich Buchner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Vertrauen bei den zahlreichen Projekten dieser und vergangener Arbeit. Danke auch für die Gespräche und Diskussionen über CSP und Gott und die Welt, die mir einiges erleichtert und eine andere Sichtweise offenbart haben.

Nicht zu vergessen Danke an alle Buchners: Natalja, Saskia, Christine, Sonja, Christian, Dietmar, Tanja, Kristina, Kerstin, Heike, Sören, Thomas, Isabell, Dieter, Dagmar, Susanne... und alle die noch dazu gehören und nicht das Glück hatten Kellerkinder zu sein.

Andreas Keller möchte ich für seine Hilfe, Geduld und die Kinoabende danken. Dankschön auch an Sigi, die trotz Laborferne immer noch ein offenes Ohr für kleinere und größere Problemchen hatte.

Danke

Meinen Eltern und meinem Bruder

Dietmar für ein unbeschwertes Leben am Zürisee und so vieles mehr...

Meinen Schwiegereltern und dem Reisch-Clan für aufbauende Worte und Unterstützung während der ausgedehnten letzten Laborphase.